

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Dezember 2009 (10.12.2009)(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/147093 A1

PCT

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 33/535 (2006.01) *G01N 27/403* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01) *C12Q 1/42* (2006.01)
G01N 27/49 (2006.01)

(72) Erfinder; und

(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **NEBLING, Eric** [DE/DE]; Heinrich-Boschen-Strasse 8, 25421 Pinneberg (DE).
ALBERS, Joerg [DE/DE]; Dorfstrasse 28 H, 25576 Brokdorf (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/056616

(74) Anwälte: **LEONHARD OLGEMOELLER FRICKE** et al.; Postfach 10 09 62, 80083 Muenchen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:

29. Mai 2009 (29.05.2009)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

(26) Veröffentlichungssprache:

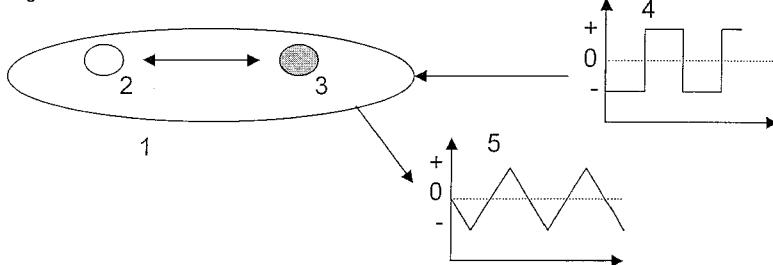
Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2008 027 038.5 6. Juni 2008 (06.06.2008) DE

(71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Hansastrasse 27c, 80686 Muenchen (DE).*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING CHEMICAL OR BIOLOGICAL SPECIES AND ELECTRODE ARRANGEMENT THEREFOR(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUM DETEKTIEREN VON CHEMISCHEN ODER BIOLOGISCHEN SPECIES SOWIE ELEKTRODENANORDNUNG HIERFÜR

Figur 1



1. Messposition bestehend aus einer Elektrode
2. Redox-Mediator oxidiert
3. Redox-Mediator reduziert
4. Auf die Elektrode aufgegebene niedrig frequente Wechselspannung
5. Auslesung des generierten Redox-Stroms über die Zeit

1 Measurement position consisting of an electrode**2 Redox mediator oxidized****3 Redox mediator reduced****4 Low-frequency alternating current applied to the electrode****5 Read-out of the generated redox current over a time period**

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for detecting one or more chemical or biological species which can either undergo a redox reaction or can directly or indirectly generate a molecule which can undergo a redox reaction, with current generated by said redox reaction being detected at at least one electrode, comprising the following steps: 1. positioning a temporally varying amount of the species or of the molecule on, or in the vicinity of, the at least one electrode within a time period t_1-t_2 , 2. repeated switching of the at least one electrode during the time period t_1-t_2 between two different potentials such that it assumes potentials with respect to a reference electrode which lie within the range of the oxidation potential of said species or of said molecule or lie above or within the range of the reduction potential of said species or of said molecule or lie below it, as a result of which said species / said molecule is alternately reduced and oxidized, and 3. detecting of the current which is formed in the at least one electrode over the time period t_1-t_2 by repeated

reduction and oxidation of the species / of the molecule. The invention also provides an electrode array for carrying out this method, comprising at least one measurement position and at least one measurement electrode per measurement position and also a reference electrode, with the electrode array being designed such that the measurement electrode can be switched, with respect to the reference electrode, alternately as a cathode and as an anode.

(57) Zusammenfassung:*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*


Veröffentlicht:

GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Detektieren einer oder mehrerer chemischer oder biologischer Species, die entweder eine Redox-Reaktion eingehen können oder direkt oder indirekt ein Molekül generieren können, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, wobei durch die genannte Redox-Reaktion generierter Strom an mindestens einer Elektrode detektiert wird, umfassend die folgenden Schritte: 1. Positionieren einer zeitlich variierenden Menge der Species oder des Moleküls auf, an oder in der Nähe der mindestens einen Elektrode innerhalb eines Zeitraums t_1-t_2 , 2. mehrfaches Hin- und Herschalten der mindestens einen Elektrode während des Zeitraums t_1-t_2 zwischen zwei unterschiedlichen Potentialen derart, dass sie gegenüber einer Referenzelektrode Potentiale einnimmt, die im Bereich des Oxidationspotentials der genannten Species oder des genannten Moleküls oder darüber bzw. im Bereich des Reduktionspotentials der genannten Species oder des genannten Moleküls oder darunter liegen, wodurch die genannte Species / das genannte Molekül abwechselnd reduziert und oxidiert wird, und 3. Erfassen des über den Zeitraum t_1-t_2 durch wiederholte Reduktion und Oxidation der Species / des Moleküls in der mindestens einen Elektrode gebildeten Stroms. Außerdem stellt die Erfindung ein Elektrodenarray zum Durchführen dieses Verfahrens bereit, umfassend mindestens eine Messposition und mindestens eine Messelektrode pro Messposition sowie eine Referenzelektrode, wobei das Elektrodenarray derart ausgebildet ist, dass die Messelektrode gegenüber der Referenzelektrode abwechselnd als Kathode und als Anode geschaltet werden kann.

Verfahren zum Detektieren von chemischen oder biologischen Species sowie Elektrodenanordnung hierfür

- Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Detektieren einer oder mehrerer chemischer oder biologischer Species, die entweder eine Redox-Reaktion eingehen können oder direkt oder indirekt ein Molekül freisetzen können, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, wobei durch die genannte Redox-Reaktion generierter Strom an mindestens einer Elektrodenposition detektiert wird.
- Stand der Technik sind Träger mit einer oder mehreren Messpositionen, bestehend aus einer Elektrode, an der nur eine Oxidation oder eine Reduktion eines Mediators stattfindet. Die Herstellung der Elektroden für dieses Verfahren ist einfach (z.B. Golddraht, Leiterplatten, mit Metall bedampfter Kunststoff), aber die erhaltenen Stromsignale sind oft nicht sensitiv genug.
- In den letzten Jahren sind ultrafeine, interdigitale Elektrodenarrays entwickelt worden, wobei jede Messposition zwei Elektroden mit jeweils einer fingerartigen Struktur aufweist und die beiden fingerartigen Strukturen derart ineinandergreifen, dass – in der Regel parallele – Elektrodenstreifen der einen und der anderen Elektrode abwechselnd nebeneinander zu liegen kommen. Die Abstände zwischen den beiden Elektroden können im günstigen Fall deutlich unter 1 µm liegen. Ein derartiger Sensor mit Strukturbreiten der Elektroden im Sub-µm-Bereich ist beispielsweise in DE 43 18 519 A1 beschrieben. O. Niwa et al., Anal. Chem. (1993) 65, 1559-1563 konnten zeigen, dass bei der cyclovoltammetrischen Detektion von 4-Aminophenol, das durch die enzymatische Spaltung von 4-Aminophenylphosphat durch alkalische Phosphatase entstanden war, an Elektroden mit Strukturbreiten von 3-5 µm und mit einem Abstand der Finger von 2-5 µm das Messsignal gegenüber der Detektion unter Verwendung einer üblichen, einzelnen Elektrode deutlich vergrößert war.
- EP 886 773 B1 offenbart ein Verfahren zum Detektieren von Molekülen oder Molekülkomplexen in einem Verdünnung- oder Lösungsmittel, wobei eine Messprobe mit einer interdigitalen Ultra-Mikroelektrodenanordnung in Kontakt gebracht wird. Für das Verfahren wird durch Anlegen eines elektrischen Potentials an die Elektrodenstrukturen ein elektrisches Wechselfeld erzeugt, und es werden die Strom- oder Potentialveränderungen gemessen, die durch in der Messprobe vorhandene oder entstehende Species verursacht werden. Dabei wird der resultierende Stromfluss hauptsächlich von den detektierten Molekülen und Molekülkomplexen im

elektrodennahen Raum beeinflusst. Die Beeinflussung kann durch Diffusion, durch Anlagerung oder durch Bindung der zu messenden Species erfolgen. Die Messungen erfolgen insbesondere mit Hilfe der Impedanzspektroskopie. Das zur Detektion benutzte elektrische Feld kann durch Wechselspannung mit sehr kleinen 5 Amplituden zwischen ca. 10 mV und 50 mV erzeugt werden; die Frequenzen können zwischen 1 mHz und 10 MHz betragen.

Die zu messenden Moleküle können auf den Mikroelektrodenflächen selbst gebunden werden. Dies kann durch physikalische (Adsorption) oder chemische 10 Bindung erfolgen, wobei z.B. Thiolverbindungen auf Goldelektroden aufgebracht und vermessen werden. Auf den Elektroden können jedoch auch Antigene oder dergleichen aufgebracht werden, die mit einem Antikörper in der Messprobe reagieren, oder es lassen sich Hybridisierungsreaktionen in der Nucleinsäurechemie verfolgen.

15

Als Ausführungsbeispiel zeigt die oben genannte Druckschrift die Detektion der Anbindung von β -Galaktosidase-Streptavidin an eine S-biotinylierte Elektrodenoberfläche aus Gold. Nach der Anbindung des modifizierten Streptavidins an das Biotin wird die Änderung der Impedanz anhand eines sogenannten Nyquist- 20 Plots gemessen, der die Störung des Dielektrikums zwischen den Elektroden durch das komplexierte Molekül zeigt und damit die vollzogene Bindung zwischen dem Biotin und dem Streptavidin-Enzym-Komplex repräsentiert. Die Ultra-Mikroelektrodenanordnung kann die Anbindung des β -Galaktosidase-Streptavidins an das Biotin außerdem amperometrisch anhand der Detektion von p-Aminophenol 25 messen. Hierfür wird das elektrische Wechselfeld mit einem gleich bleibenden Potential überlagert, durch den die eine Elektrode auf ein Potential von +250 mV gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode gebracht wird, mit dessen Hilfe das Aminophenol zu Chinonimin aufoxidiert wird.

30

Die voranstehend geschilderten sowie weitere mögliche Messprinzipien unter Verwendung von Interdigitalelektroden seien nachfolgend genauer erläutert:

35

1. Mit der reinen Impedanzspektroskopie wird der komplexe Wechselstromwiderstand gemessen. Dies wird in der Elektrochemie hauptsächlich für die Charakterisierung des zwischen den Elektroden befindlichen Mediums und/oder von speziellen Belegungen der Elektrodenoberflächen genutzt, die mit Fängermolekülen (z.B. über Thiolbrücken an Goldelektroden gebundenen biologischen Fängermolekülen) besetzt sind. Mit einer Messposition, bestehend aus

den genannten Interdigitalelektroden, lässt sich das Vorhandensein einer an die Fängermoleküle bindenden Species im Detektionsfluid auffinden, weil sich durch die Anbindung die Leitfähigkeit für Elektronen und/oder Protonen in der Umgebung der Elektroden ändert. Sind mehrere Messpositionen vorgesehen, so können diese

5 gegebenenfalls mit unterschiedlichen Fängermolekülen belegt werden, die unterschiedliche Species binden, so dass mehrere Species in einem Detektionsfluid detektiert werden können. Typischerweise werden die Elektroden selbst durch die Bindung der zu detektierenden Species an den Fängermolekülen chemisch nicht verändert. Für diese Messtechnik wird eine möglichst kleine Wechselspannung (in
10 der Regel bei oder unter 50 mV) benutzt, die generell nicht auf eine Referenz bezogen sein muss. Teilweise wird die Frequenz über sehr weite Bereiche variiert, um daraus weitere Abhängigkeiten abzulesen. Ein Diagramm, in dem diese Messung anhand der Koordinaten Potential [V] gegen die Zeit [s] aufgetragen ist, ist in
15 **Figur 2a** dargestellt.

2. Die Impedanzspektroskopie kann zusätzlich Oxidations- und/oder Reduktionseinflüsse nutzen, wie z.B. in der obigen Druckschrift erwähnt. Wie bei der reinen Impedanzspektroskopie wird ein Wechselstromwiderstand mittels einer geringen Wechselspannung im Bereich von meist ca. 10-50 mV gemessen.

20 Gleichzeitig wird aber mit Gleichspannung mindestens auf eine der beiden Elektroden ein definiertes Potential aufgebracht (typischerweise mittels Referenzelektrodenbezug), das gezielt eine Reduktion oder eine Oxidation eines vorhandenen oxidierbaren, reduzierbaren oder einer Redoxreaktion zugänglichen Mediators bewirkt, was wiederum Gleichströme hervorruft, die jedoch nicht unbedingt 25 ausgewertet werden. Gemessen wird in der Regel nur deren zusätzlicher Einfluss auf die Impedanz. Ein entsprechendes Diagramm, in dem wiederum das Potential [V] gegen die Zeit [s] aufgetragen ist, ist in **Figur 2b** dargestellt.

3. Anstelle der Impedanz kann als Messprinzip bei diesen Anordnungen auch die 30 cyclische Voltammetrie zu Einsatz kommen. Hierfür werden die Elektroden sehr langsam – in der Regel über mehrere Sekunden oder sogar Minuten hinweg – von einer vorgegebenen positiven Spannung bis zu einer vorgegebenen negativen Spannung und wieder zurück geschaltet. Das dabei erhaltene Diagramm der gemessenen Strommenge gegen die Spannung lässt Rückschlüsse auf das 35 Vorhandensein von zu detektierenden Molekülen zwischen den Interdigitalelektroden zu. Die Cyclovoltammetrie ist im Prinzip ein sehr langsames elektrochemisches Redox-Verfahren mit entsprechendem Stoffumsatz, bei dem Oxidations- und/oder Reduktionsmaxima der jeweiligen Substanz ermittelt werden.

4. Von diesen Methoden unterscheidet sich das Redoxcycling, auch Redoxrecycling genannt. Hierfür werden die beiden Elektroden jeweils konstant mit einem Oxidations- und einem Reduktionspotential (mit Referenzelektrodenbezug) 5 beaufschlagt, das bei oder oberhalb des Oxidations- und bei oder unterhalb des Reduktionspotentials des zu detektierenden Redoxmoleküls liegen sollte. Aufgrund der extremen Nähe der beiden Elektroden wandert das oxidierte Molekül zur gegensinnig geladenen Elektrode, wird dort reduziert und wandert wieder zurück. Gemessen werden die beiden Ströme, die direkt durch die Oxidation bzw. Reduktion 10 der Redoxmoleküle an den Elektroden erzeugt werden. Durch die mehrfache Oxidation und Reduktion kann jedes einzelne Molekül mehrfach erfasst werden, was zu einer Verstärkung der Messsignale führt. Ein entsprechendes Diagramm, in dem wiederum das Potential [V] gegen die Zeit [t] aufgetragen ist, ist in **Figur 2c** dargestellt.
- 15 Der Nachteil an den vorgenannten Techniken liegt darin, dass die interdigitalen Elektrodenstrukturen im Sub- μm -Bereich hergestellt werden müssen, um die jeweils unterschiedlich geladenen Elektroden sehr nahe aneinander bringen zu können. Aber nur dann kann mit einer ausreichenden Empfindlichkeit gemessen werden. Dies 20 geschieht zur Zeit mittels aufwändiger Halbleitertechnik im Reinraum, siehe z.B. E. Nebling et al., Anal. Chem. (2004) 76(3), 689-696. Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass die große Nähe der Elektroden zueinander die Gefahr von Kurzschläüssen birgt: sollten sich Anode und Kathode bei einem Abstand von oft nur noch ca. 400 nm berühren, ist die jeweilige Messposition insgesamt unbrauchbar. Sollen mit der 25 Elektrodenanordnung mehrere Species in einer Flüssigkeit detektiert werden, wobei mehrere Messpositionen mit unterschiedlichen Fängermolekülen belegt derselben zu untersuchenden Flüssigkeit ausgesetzt werden, so muss der ganze Test mit einer neuen Elektrodenanordnung wiederholt werden.
- 30 Um Kurzschlüsse auszuschließen, werden die Elektrodenstrukturen häufig im Substrat eingebettet. Dies ist aber natürlich mit nochmals erhöhtem Aufwand bei der Herstellung verbunden.
- 35 Es ist daher Aufgabe der Erfindung, hier Abhilfe zu schaffen und die Messung von Molekülen oder sonstigen Species wie Molekülkomplexen, Peptiden, Proteinen (insbesondere Enzymen), Antigenen, Nucleinsäuren oder Nucleinsäure enthaltenden Species etc. mit Hilfe einer Technik zu verwirklichen, die hinsichtlich der einzusetzenden Vorrichtungen zuverlässiger und weniger anspruchsvoll ist.

Gelöst wird die Aufgabe durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum Detektieren einer oder mehrerer (chemischer oder biologischer) Species, die entweder eine Redox-Reaktion eingehen können oder direkt oder indirekt ein Molekül freisetzen können, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, wobei durch die genannte Redox-
5 Reaktion generierter Strom an mindestens einer Elektrodenposition detektiert wird, worin die mindestens eine Elektrodenposition, auf der oder in deren Nähe sich die zu detektierende Species befindet, mehrfach zwischen zwei unterschiedlichen Potentialen derart hin- und hergeschaltet wird, dass sie gegenüber einer Referenzelektrode Potentiale einnimmt, die in der Nähe bzw. unter / über dem
10 Redoxpotential der genannten Species oder des genannten Moleküls liegen, so dass die genannte Species / das genannte Molekül (letzteres nach dessen Freisetzung) an oder in der Nähe dieser Elektrodenposition beim Hin- und Herschalten abwechselnd reduziert und oxidiert wird. Dabei wird der über die Zeit hinweg durch die wiederholte Reduktion und Oxidation der Species / des Moleküls gebildete Strom
15 erfasst und ggf. mit einer Elektrodenposition verglichen, an der oder in deren Nähe sich die genannte Species oder das genannte Molekül nicht befindet. Das Erfassen und Auswerten der Strommengen und die Folgerung, dass die gesuchte Species - qualitativ oder quantitativ bestimmbar -- vorhanden ist oder nicht, erfolgt in der Regel gemäß den Merkmalen des Anspruchs 1, vorzugsweise gemäß Anspruch 2
20 und ggf. auch gemäß Anspruch 3. Dabei soll unter dem Ausdruck "Positionierung einer zeitlich variierenden Menge der Species" verstanden werden, dass sich die Menge der Species auf, an oder in der Nähe der Elektroden während des Zeitraums $t_1 - t_2$ ändert und vorzugsweise zunimmt.

25 Gegenüber dem üblichen Redox-Cycling unterscheidet sich das erfindungsgemäße Verfahren also dadurch, dass keine interdigitalen Elektroden mit einer fest eingestellten Potentialdifferenz eingesetzt werden müssen, sondern dass die Spannung an nur einer Elektrode zyklisch so variiert wird, dass diese gegenüber einer Referenzelektrode abwechselnd jeweils als Kathode und Anode fungiert. Dies
30 ist schematisch in **Figur 2d** dargestellt. Durch das – in der Regel mit z.B. 0,1 bis 10 Hz relativ niedrigfrequente - Hin- und Herschalten zwischen zwei unterschiedlichen Potentialen auf dieser Elektrode wird dann, wenn sich auf oder in ihrer Nähe eine Species oder ein Molekül befindet, das einer Redoxreaktion zugänglich ist, diese(s) durch das eine Potential oxidiert und durch das andere
35 reduziert. Die dabei generierten Ströme – ein positiver Oxidations- und ein negativer Reduktionsstrom – werden in ihrer Summe gemessen (siehe **Figur 1**, worin 1 eine aus einer Elektrode bestehende Messposition, 2 den oxidierten Redox-Mediator, 3 den reduzierten Redox-Mediator, 4 eine auf die Elektrode aufgegebene niedrig

frequente Wechselspannung und 5 die Auslesung des generierten Redox-Stoms über die Zeit schematisch darstellen).

Ausgewertet wird dabei meist die zeitliche Veränderung des aufaddierten Gesamt-

5 Stromsignals (Summe aus den Beträgen von Oxidations- und Reduktionsstrom, resultierend in einer Stromsteigerung über die Zeit), was einer Änderung der Konzentration des Redox-Mediators entspricht. Der auftretende kapazitive Umladestrom wird nicht berücksichtigt, da er unabhängig von den Redox-Strömen des Mediators ist. Er relaxiert zwar nach jeder Umladung schnell, ist aber bei jedem 10 neuen Messzyklus nahezu identisch und ändert sich somit nicht über die Zeit.

Die Empfindlichkeit dieser Anordnung entspricht in etwa der des "herkömmlichen" Redox-Cyclings auf interdigitaler Anode und Kathode. Der komplizierte Herstellungsprozess von interdigitalen Elektroden-Arrays durch z.B. Halbleitertechnik 15 entfällt hierbei jedoch. Eine oder mehrere Elektroden mit zyklisch wechselnden Potentialen können als eine Messposition oder als ein komplettes Array mit unterschiedlichen Messpositionen Anwendung finden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich einerseits Moleküle (direkt)

20 detektieren, die in einem Detektionsfluid vorhanden sind, sofern diese Moleküle eine Redoxreaktion eingehen können. Anderseits können solche Species detektiert werden, die direkt oder über Fänger moleküle an die Elektroden oder an deren Umgebung anbindbar sind und nach ihrer Anbindung direkt oder indirekt Moleküle freisetzen, die ihrerseits eine Redoxreaktion eingehen können.

25

Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich dementsprechend für die Detektion von Molekülen einsetzen, die in einer Messflüssigkeit oder einem anderen Detektionsfluid vorhanden sind und einer Redoxreaktion zugänglich sind. Unter Detektionsfluid sollen dabei Flüssigkeiten, Gele oder andere höherviskose Materialien sowie Gase 30 verstanden werden. Es ist günstig, wenn das Detektionsfluid in einem Fluidkanal über die eine oder die mehreren Messelektroden geführt wird. Es können ggf. mehrere Detektionsfluide gleichzeitig vermessen werden, wobei jeder der Fluidkanäle über eine der Messelektroden geführt ist. Dabei kann es günstig sein, über eine der Messelektroden ein Vergleichsfluid zu führen, dessen Gehalt oder 35 Abwesenheit an Molekül, das einer Redox-Reaktion zugänglich ist, bekannt ist. Dies erleichtert halbquantitative oder quantitative Aussagen.

So kann beispielsweise 4-Aminophenol in einer Messflüssigkeit direkt detektiert werden, indem man diese Flüssigkeit in die Nähe von Messelektroden strömen und dort verweilen lässt. Jede Elektrode wird zwischen den Redoxpotentialen von p-Aminophenol +200 mV und –350 mV mit 1,0 Hz kontinuierlich hin- und hergeschaltet. Als Bezug kann beispielsweise eine Iridium/Iridiumoxid-Referenzelektrode dienen. Eine Gegenelektrode, an beliebiger Stelle angebracht, leitet Differenzströme ab. Auch bei dieser Ausgestaltung können mehrere Elektroden vorgesehen sein, die sich jeweils in getrennten Fluidkanälen befinden.

- 10 Alternativ bindet die zu detektierende Species an die erfindungsgemäße Elektrodenstruktur und/oder deren Umgebung direkt an, beispielsweise durch sogenanntes "self-assembling", z.B. über funktionelle Gruppen auf dieser Oberfläche und/oder funktionelle Gruppen an dieser Species (z.B. binden Proteine mit SH-Gruppen an Goldoberflächen), oder die Elektrodenstruktur bzw. ihre unmittelbare
15 Umgebung wird - über vergleichbare Mechanismen - mit einem Fänger-Molekül belegt, das mit der zu detektierenden Species reagiert und diese bindet oder komplexiert, wobei ein Produkt entsteht, das seinerseits ein zugesetztes Substrat in ein Molekül umwandelt, welches einer Redoxreaktion zugänglich ist (auch als Redox-Mediator bezeichnet), während das Fänger-Molekül bei Abwesenheit der zu
20 detektierenden Species dasselbe Substrat nicht umwandeln kann. Der Redox-Mediator kann dabei chemisch, physikalisch oder enzymatisch generiert werden. So können z.B. Goldelektroden vorgesehen sein, auf denen ein Protein durch Adsorption gebunden ist. Ein Beispiel: Saure Phosphatase spaltet 4-Aminophenylphosphat in das Redox-Molekül 4-Aminophenol, β-Galaktosidase
25 spaltet p-Aminophenyl-β-galaktopyranosid in dasselbe Molekül. Natürlich sind beliebige Redox-Moleküle für die vorliegende Erfindung einsetzbar; solche, die sich durch Enzyme spalten lassen, sind jedoch für die Detektion von Enzymen oder enzymhaltigen Komplexen besonders geeignet. Weitere Beispiele für brauchbare Redox-Moleküle sind Ferrocenderivate, Kaliumhexacyanoferrat(II),(III) und
30 organische Ruthenium- und Osmiumkomplexe wie Rutheniumhexamin, Osmium-bispyridyldichlorid. Es können aber auch sonstige organische und ggf. auch anorganische Redox-Moleküle eingesetzt werden; die letzteren liegen vorzugsweise in verkapselter Form vor, wobei die Kapseln, z.B. Liposomen, z.B. eine Gruppe tragen können, die nur mit einer Kombination aus Fänger-Molekül und zu
35 detektierender Species reagiert, nicht aber mit dem Fänger-Molekül allein. Solche Bindungsmöglichkeiten bieten z.B. sogenannte Interkalationsverbindungen, die aus der DNA-Technologie bekannt sind und nur mit doppelsträngiger Nucleinsäure, nicht aber mit einsträngiger Nucleinsäure reagieren. Der Fachmann kennt eine Reihe von

Möglichkeiten, diese Techniken zu verwirklichen, siehe z.B. WO 2002/081739 oder WO 2002/082078.

Für dieses Verfahren lässt man vorzugsweise in einem ersten Schritt das die

- 5 Species enthaltende Detektionsfluid über die eine oder mehreren Elektroden fließen, die bereits mit den Fänger molekülen belegt sind. Werden mehrere Elektroden verwendet, lassen sich die Elektroden mit unterschiedlichen Fänger molekülen belegen, die unterschiedliche Species binden/komplexieren können. Mit diesem Verfahren können deshalb mehrere unterschiedliche Species in einem
- 10 Detektionsfluid detektiert werden, was insbesondere in der DNA-Analytik von Bedeutung ist. Selbstverständlich können die mehreren Elektroden in diesem Fall in einem gemeinsamen Fluidkanal oder in unterschiedlichen Fluidkanälen angeordnet sein.
- 15 Eine oder mehrere der als Messpositionen dienenden Elektroden können in dieser Ausgestaltung ohne Fänger moleküle bleiben. Diese eignen sich dann als Vergleichselektrode, um die jeweiligen Messwerte gegen einen geeigneten Nullwert vergleichen oder eichen zu können, was quantitative oder halbquantitative Detektionsergebnisse ermöglicht.
- 20 Die Elektroden / Messpositionen können aus einem beliebigen leitenden Material, z.B. aus einem Edelmetall wie Gold oder Platin, aber auch aus Kohlenstoffverbindungen wie Graphit oder Nanotubes bestehen; günstig ist Gold, da viele biologisch relevante Species über eine Thiolbrücke an Gold anbindbar sind. Werden
- 25 die Messpositionen mit Biomolekülen belegt, können sie als Plattform für einen biologischen Test dienen. Der Redox-Mediator wird hierbei z.B. durch eine Enzymmarkierung positionsspezifisch generiert bzw. in seine elektrochemisch aktive Form umgewandelt.
- 30 Auch die direkte Umgebung der Elektroden / Messpositionen kann, wie ebenfalls bereits erwähnt, so ausgestaltet sein, dass sie in der Lage ist, Fänger moleküle zu binden. Hierfür eignen sich beispielsweise Materialien wie Oxide mit Hydroxid-Oberflächen oder modifizierte Silane/Siloxane oder anorganisch/organische Hybridmaterialien wie die siliciumhaltigen Ormocere®. Diese lassen sich auf ihrer
- 35 Oberfläche leicht mit für die vorliegende Erfindung geeigneten Gruppen ausgestalten oder modifizieren, z.B. mit Aminen, Hydroxygruppen, Carboxylgruppen. In den vorgenannten Fällen wird man in der Regel von einer Anbindung von Fänger molekülen auf der/den Elektroden absehen, muss dies aber nicht.

Die direkte Umgebung der Elektroden / Messpositionen kann alternativ oder zusätzlich auch hydrophob ausgestaltet sein, um den Randwinkel von auf Elektrodenmaterial aufgebrachten Tröpfchen (insbesondere zur Anbindung von

- 5 Fängermolekülen) möglichst groß zu halten. Stattdessen oder zusätzlich können die Elektroden / Messpositionen auch mit Ringen oder Stegen umgeben sein, die ebenfalls ein Verlaufen der Fängermaterial-Tröpfchen vermeiden helfen. Eine solche Ausgestaltung ist beispielsweise in DE 199 16 867 A1 beschrieben. Die Ringe oder Stege können bleibend oder intermediär vorgesehen sein. Dieselbe Druckschrift
10 beschreibt auch die Verwendung von Stempeln für das Aufbringen von Fängermolekülen und den Aufbau von Mikrokapillarreaktoren; Ausgestaltungen, die sich gleichermaßen für die vorliegende Erfindung eignen.

Die Elektroden / Messpositionen können auf einem beliebigen Trägermaterial
15 angeordnet sein, beispielsweise auf einem organischen Substrat wie Kunststoff, aber auch auf Leiterplatten oder dgl.. Gegebenenfalls kann selbstverständlich auch ein Siliziumwafer oder dgl. als Träger dienen, auch wenn dies in der Regel nicht notwendig sein wird. Günstig ist die Kombination von Goldelektroden und einem Kunststoffsubstrat. Die Elektroden können in einfacher Weise auf das Substrat
20 aufgebracht sein, desgleichen die Leiterstrukturen. Die Leiterstrukturen können aus Gold, aber – z.B. um Kosten zu sparen – auch aus Kupfer oder Aluminium oder einem anderen gängigen Material bestehen.

Die Gestalt der Elektroden / Messpositionen ist unkritisch, weshalb sie eine beliebige
25 Form aufweisen können. Sie können beispielsweise flächig sein und eine runde, ovale, rechteckige, länglich- gestreckte, quadratische oder sonstige mehreckige Form besitzen, je nach Anforderung an den Test und die sonstigen Bedingungen wie Anordnung eines oder mehrerer Fluidkanäle. Sie können durchgehend sein oder Aussparungen aufweisen, deren Oberfläche beispielsweise wie oben beschrieben
30 zur Anbindung von Fängermaterialien geeignet ist. Sie können bei Bedarf in das umgebende Substrat eingebettet sein, beispielsweise zur Verbesserung der Strömungsverhältnisse im Fluidkanal, in dem sie sich befinden. Alternativ können sie auf das Substrat aufgebracht, beispielsweise aufgedampft, gedruckt, aufplattiert, aufgelötet oder in sonstiger Weise aufgebracht sein. Diese Varianten sind gegenüber
35 der Einbettung deutlich kostengünstiger. Die Elektroden / Messpositionen können eine beliebige Größe besitzen. Um eine Vielzahl von Elektroden gleichzeitig ansteuern und vermessen zu können, beispielsweise auf einem Chip, ist es jedoch günstig, die Fläche der Elektroden relativ klein auszugestalten, z.B. mit einer

Oberfläche von ca. 0.05 bis 0.5 mm². Die Elektroden können dabei ggf. als Mikroelektroden oder Ultramikroelektroden (mit Längen- und/oder Breitenabmessungen im µm- oder Sub-µm-Bereich) ausgestaltet sein. Schließlich ist anzumerken, dass die Elektroden / Messpositionen gegebenenfalls auch eine

5 dreidimensionale Struktur aufweisen, z.B. als Tropfen, Lötbump, Draht oder Plättchen ausgestaltet sein können.

Das Verfahren benötigt typischerweise eine Referenzelektrode, die sich jedoch nicht auf demselben Substrat wie die Messelektrode(n) befinden muss. Es ist ausreichend,

- 10 wenn sich die Referenzelektrode über das Detektionsfluid (z.B. Puffer mit oder ohne Redox-Species) in leitender Verbindung zu den Messelektroden befindet. Die Referenzelektrode wird nicht mit Strom beaufschlagt. Sie besteht aus einem für das jeweilige Verfahren geeigneten Material, beispielsweise Iridium/Iridiumoxid, Kalomel, Ag/AgCl. Für das Verfahren wird weiterhin eine Gegenelektrode benötigt, die zum
- 15 Aufbringen des gewünschten Stroms auf die Messelektroden auf einen entsprechenden Gegenwert aufgeladen wird. Auch diese Elektrode muss sich nicht notwendigerweise auf demselben Substrat befinden wie die Messelektroden. Sie besteht typischerweise – aber nicht zwingend – aus Gold.

- 20 Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass eine elektrische Auslesung auf in ihrer Form beliebig gestalteten Elektroden mittels Redox-Cycling erfolgen kann, deren Sensitivität der einer Auslesung auf interdigitalen Elektrodenstrukturen vergleichbar ist. Die Herstellung der Elektroden kann bei Vermeidung digitaler Strukturen deutlich einfacher und kostengünstiger erfolgen, da
- 25 auf teure Halbleiter- und Beschichtungstechniken mit Masken, Polymerauftrag, Belichtungen und Auswaschungen für die benötigten Sub-µm-Elektrodenstrukturen für das herkömmliche Redox-Cycling verzichtet werden kann. Außerdem steigt die Produktions-Ausbeute dieser Elektroden, da kein Ausschuss durch elektrische Kurzschlüsse entstehen kann, die bei den herkömmlichen Sub-µm-
- 30 Interdigitalstrukturen z.B. durch die versehentliche Anlagerung von Partikeln aus den Reinraumprozessen entstehen können.

- Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise für die sogenannte Chip-Technologie eingesetzt. Hierbei befinden sich eine, vorzugsweise mehrere
- 35 Messpositionen in Form von Elektroden auf einem Chip, der beispielsweise die Größe von etwa 50 bis 200 mm² aufweist. Jede Messposition ist über einen Fluidkanal mit einem Detektionsfluid oder einem Vergleichsfluid, z.B. reinem Puffer, beaufschlagbar. Die Referenzelektrode und die Gegenelektrode können, müssen

aber nicht, ebenfalls auf dem Chip angeordnet sein. Alle Elektroden auf dem Chip sind mit elektrischen Leiterstrukturen für das Beaufschlagen mit den Potentialen und das Auslesen der Stromveränderungen verbunden.

- 5 Die elektrische Ansteuerung kann über einen separaten Potentiostaten erfolgen, sie kann aber auch als elektronisches Bauteil auf einem separaten Chip (2-Chip-Lösung) angeordnet sein. Dieser Chip wird mehrfach verwendet, während der Chip mit den Messpositionen in der Regel nur einmal verwendet und dann verworfen wird, insbesondere, wenn die Elektroden oder deren Umgebung mit Fängermaterial belegt
10 wurden. Schließlich ist es auch möglich, die Elektronik direkt in dem Chip anzuordnen, der auch die Messpositionen trägt. All diese Varianten sind aus dem Stand der Technik bekannt, siehe beispielsweise E. Nebling et al., "Electrical Detection of Viral DNA Using Ultramicroelectrode Arrays", Anal. Chem. (2004), 76(3): 689-696, J. Albers et al., "Electrical biochip technology – a tool for microarrays and
15 continuous monitoring", Anal Bioanal. Chem. (2003), 377(3): 521-7 oder R. Hintsche et al., "Fully electrical microarrays", Electrochemistry of Nucleic acids and Proteins, Toward Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics, 247-277, Herausgeber E. Palecek, F. Scheller und J. Wang, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- 20 Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

- 25 Auf einem Trägermaterial, beispielsweise passiviertem Silizium, sind mehrere Goldelektroden (Durchmesser 0,5 mm), eine Gegenelektrode und eine Iridium/Iridiumoxid-Referenzelektrode aufgedampft. Jede Goldelektrode entspricht hierbei einer Messposition. Auf die Elektroden 1 – 8 ist ein unspezifisches Protein (BSA) durch Adsorption gebunden. Auf den Elektroden 9 – 12 ist das Enzym
30 β -Galaktosidase durch Adsorption gebunden. Die Goldelektroden können mittels einer mikrofluidischen Durchflusszelle, verbunden mit einer Mikropumpe, Schläuchen und einem Verteilerventil mit diversen flüssigen Medien überspült werden.
- Die 12 Goldelektroden werden mit einem 16-Kanal Multipotentistaten mit den
35 benötigten Potentialen versorgt und die resultierenden Ströme im nano-Ampere-Bereich ausgelesen. Dieser Potentiostat besteht aus 2 8-fach Multiplexern, die die Elektroden nach erfolgter Aufgabe der jeweiligen Potentiale in kurzer Zeit sequenziell auslesen. An jeder Elektrode wird zwischen den Potentialen von +200 mV

und -350 mV mit 1,0 Hertz kontinuierlich hin- und hergeschaltet. Als Bezug dient die Iridium/Iridumoxid-Referenzelektrode. Die Gegenelektrode leitet Differenzströme ab. die Redoxpotentiale des Mediators p-Aminophenol liegen innerhalb des Bereiches von +200 mV und -350 mV.

5

Nach dem Waschschritt mit Puffer (PBS pH: 7,0) wird ein Enzymsubstrat gelöst in Puffer (1,0 mg/ml in PBS pH: 7,0) über die Elektroden gegeben. Dieses Substrat ist p-Aminophenyl- β -D-Galactopyranosid (pAP- β -gal) und wird durch das Enzym β -Galaktosidase von einer elektrochemisch inaktiven Form in den elektrochemisch aktiven Redox-Mediator p-Aminophenol überführt. Während der elektrochemischen Messung wird der Flüssigkeitsstrom gestoppt. Als Resultat wird an jeder Goldelektrode unabhängig von den anderen je nach Anwesenheit oder Abwesenheit des Enzyms ein Redox-Strom generiert oder nicht. Dieser Strom steigt an den Enzym tragenden Elektroden über die Zeit kontinuierlich an, da das Enzym stetig das Substrat umsetzt und so den Redox-Mediator freisetzt. Man erwartet demnach an den Elektroden 1 – 8 keinen Anstieg des Stroms über die Zeit (Vergleichselektroden) und an den Elektroden 9 – 12 einen Strom-Anstieg über die Zeit (Messelektroden). Die hierbei verwendete neuartige elektrochemische Auslesung ist in **Figur 3** gezeigt.

10

15

20

Figur 3a zeigt die parallele Strom-Messung über die Zeit an jeder einzelnen von 12 Goldelektroden mit Redox-Cycling auf jeder Elektrode anhand der resultierenden, übereinander liegenden Messwerte der Stromsignale für alle Elektroden. Gemessen wird der Umsatz von p-Aminophenol individuell an jeder Elektrode (+200 mV, -350 mV mit 1,0 Hz). Nachdem das gelöste Substrat die Goldelektroden vollständig überspült hat, wird der Flüssigkeitsstrom gestoppt (Sekunde 28, siehe Pfeil), die Messung des Stroms läuft jedoch weiter. Je nach angelegtem Potential erhält man einen Oxidationsstrom-Peak (positiv) oder einen Reduktionsstrom-Peak (negativ). Die Hauptkomponente ist der kapazitive Umladestrom, der jedoch bei der Auswertung später herausgemittelt wird.

25

30

Figur 3b zeigt die Summe der Stromsignal-Beträge aus Oxidations- und Reduktionsstrom für jede einzelne Elektrode (Pfeil: Stoppen des Flüssigkeitsstroms). Die Positionen 1 – 8 zeigen einen weitestgehenden waagerechten Verlauf der Stromsignale. Die Positionen 9 – 12 zeigen hingegen einen Anstieg des Stroms über die Zeit nach Abschalten des Flüssigkeitsstroms (Pfeil). Da bei den Elektroden 1 – 8 das Enzym fehlt, wird hier kein aktiver Redox-Mediator gebildet und es resultieren somit keine Redox-Ströme. Auf den Elektroden 9 – 12 generiert das Enzym den aktiven Redox-Mediator, und dadurch steigt der Strom an diesen Positionen über die

Zeit kontinuierlich an. Die Elektroden 1 – 8 zeigen einen unterschiedlich hohen, nahezu konstanten Strom. Dieses ist der kapazitive Umladestrom, der nach jeder Umladung zwar schnell im Millisekundenbereich abklingt, seine absolute Höhe pro Position bleibt aber bei jedem Messvorgang nahezu identisch. Die unterschiedliche

5 Höhe dieses Umladestroms von Elektrode zu Elektrode resultiert daraus, dass die Potentiale an jeder Elektrode gleichzeitig umgeschaltet werden, die Auslesungen durch die Multiplexer aber leicht zeitversetzt sind. An den Elektroden, die kurz nach dem Umschalten gemessen werden (1, 2), ist dieser Umladestrom noch hoch, da seine Relaxation noch nicht abgeschlossen ist.

10

Figur 3c zeigt die Auftragung der Änderung der Stromwerte über die Zeit (Stromsteigung) für jede Position individuell als Balkengrafik. Die waagerecht verlaufenden Ströme der "negativen" Elektroden 1 – 8 zeigen hier unabhängig von ihrer Höhe (Figur 3b) nahezu keine Veränderung. Der Strom an den "positiven" Positionen 9 - 12 hingegen steigt über die Zeit deutlich an. Dies zeigt eindeutig die Anwesenheit des Enzyms. Der Mittelwert der Stromsteigung der Positionen 9 – 12 beträgt etwa 15 209 nA/min.

Das Redox-Cycling auf Interdigitalelektroden ergibt bei vergleichbarer
20 Versuchsanordnung eine Stromsteigung von etwa 300 nA/min. Misst man nur die Oxidation des Mediators bei +200 mV, ergibt sich eine Stromsteigung von etwa 20 nA/min.

Die oben beschriebene Erfindung ist somit zur sensitiven elektrischen Auslesung von
25 Redox-Mediatoren auf nicht interdigitalen Elektroden geeignet und ist deutlich empfindlicher als nur die Oxidation auf solchen Elektroden, während die Sensitivität der Auslesung derjenigen auf interdigitalen Elektroden vergleichbar ist.

Beispiel 2

30

Zur Durchführung eines biologischen Tests werden die Goldelektroden zuerst mit geeigneten Fängermolekülen adsorptiv belegt. Ein spezifisch an diesen Fänger molekülen gebundenes Zielmolekül wird durch ein Enzym markiert (z.B. β -Galaktosidase). Das zugeführte Substrat wird durch dieses Enzym in den 35 aktiven Redox-Mediator umgesetzt. Dieser kann elektrodenspezifisch mit der oben beschriebenen Methode sensitiv gemessen werden.

Ansprüche:

1. Verfahren zum Detektieren einer oder mehrerer chemischer oder biologischer Species, die entweder eine Redox-Reaktion eingehen können oder direkt oder indirekt ein Molekül generieren können, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, wobei durch die genannte Redox-Reaktion generierter Strom an mindestens einer Elektrode detektiert wird,
umfassend die folgenden Schritte,
 - Positionieren einer zeitlich variierenden Menge der Species oder des Moleküls auf, an oder in der Nähe der mindestens einen Elektrode innerhalb eines Zeitraums t_1-t_2 ,
 - mehrfaches Hin- und Herschalten der mindestens einen Elektrode während des Zeitraums t_1-t_2 zwischen zwei unterschiedlichen Potentialen derart, dass sie gegenüber einer Referenzelektrode Potentiale einnimmt, die im Bereich des Oxidationspotentials der genannten Species oder des genannten Moleküls oder darüber bzw. im Bereich des Reduktionspotentials der genannten Species oder des genannten Moleküls oder darunter liegen, wodurch die genannte Species / das genannte Molekül abwechselnd reduziert und oxidiert wird,
 - Erfassen des über den Zeitraum t_1-t_2 durch wiederholte Reduktion und Oxidation der Species / des Moleküls in der mindestens einen Elektrode gebildeten Stroms.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Erfassen des über den Zeitraum t_1-t_2 durch wiederholte Reduktion und Oxidation der Species / des Moleküls gebildeten Stroms die folgenden Schritte umfasst:
 - mehrfaches Hin- und Herschalten der mindestens einen Elektrode während eines Zeitraums t_0-t_1 vor dem Positionieren der Species oder des Moleküls darauf, daran oder in ihrer Nähe zwischen zwei Potentialen wie in Anspruch 1 definiert,
 - Messen des Stromflusses in der mindestens einen Elektrode in dem Zeitintervall t_0-t_1 ,
 - Messen des Stromflusses in derselben Elektrode im Zeitintervall t_1-t_2
 - Auftragen des Stromflusses im Zeitintervall $t_0-t_1-t_2$ gegen die Zeit,
 - Aufsummieren der Absolutbeträge der Stromsignale, wobei man eine Kurve erhält, die den Absolutbetrag des Stromflusses über die Zeit angibt,
 - Vergleichen der Absoluthöhe der Stromsignale zwischen t_0-t_1 und t_1-t_2 .

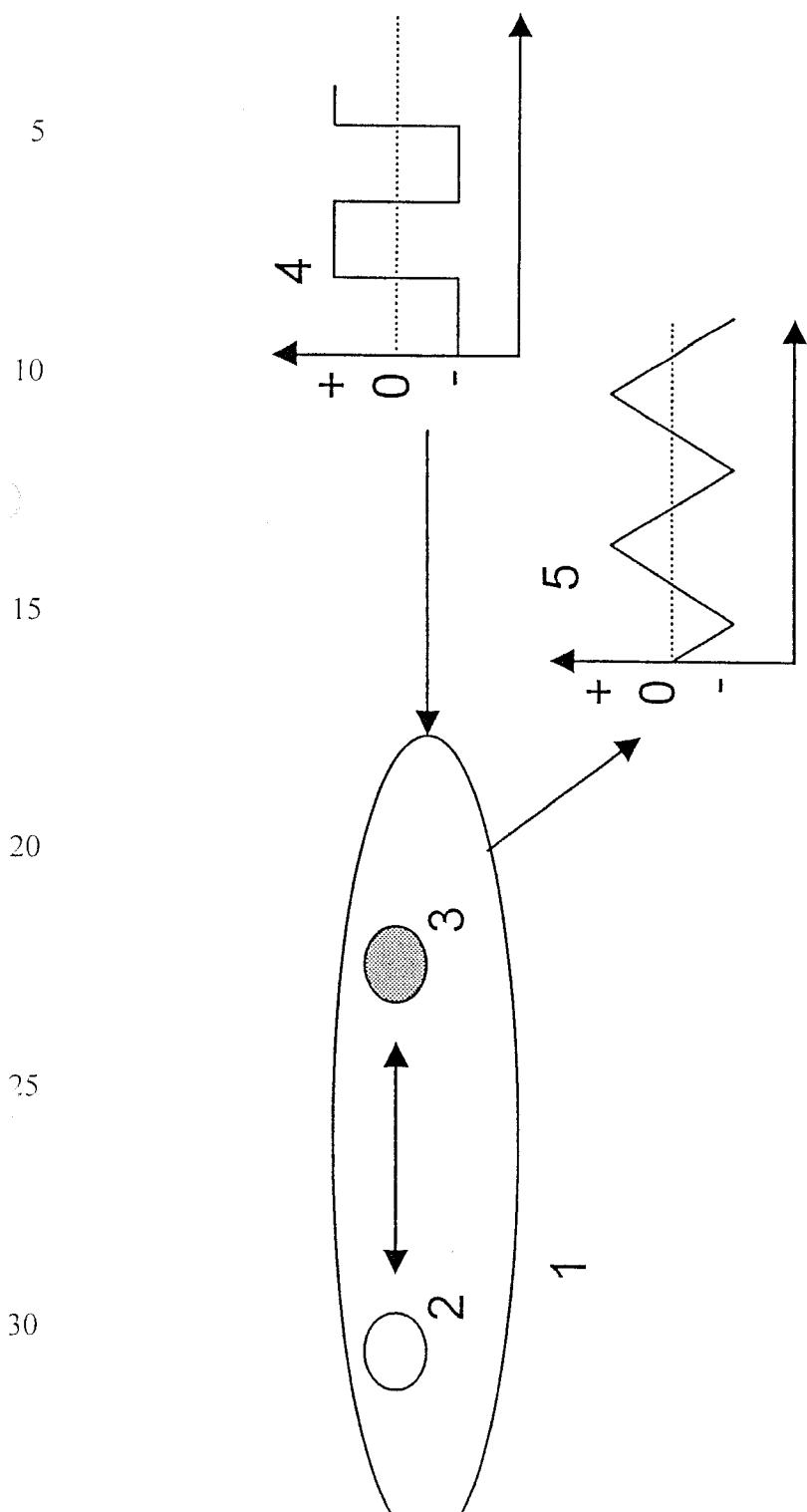
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man für eine qualitative Detektion der Species beobachtet, ob die Kurve im Bereich t_1-t_2 gegenüber der Kurve t_0-t_1 höher liegt, oder dass man für eine quantitative Detektion der Species die Steigung der Stromwerte im Bereich t_1-t_2 oder das unter den Stromwerten liegende Integral misst und mit Referenzwerten vergleicht.
5
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das mehrfache Hin- und Herschalten mit einer Frequenz im Bereich von 0,1 bis 10 Hz erfolgt und/oder dass die Anzahl der Schaltvorgänge im Zeitintervall t_1-t_2 zwischen 10 und 100 und vorzugsweise zwischen 15 und 50 liegt.
10
5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die eine oder mehreren Species eine Redox-Reaktion eingehen kann/können, dadurch gekennzeichnet, dass das Positionieren der Species das Überleiten eines die Species enthaltenden Fluids über die mindestens eine Elektrode umfasst.
15
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die eine oder mehreren Species eine Redox-Reaktion eingehen kann/können, dadurch gekennzeichnet, dass das Positionieren der Species die folgenden Schritte umfasst:
 - Das Bereitstellen von Fängermolekülen auf der mindestens einen Elektrode oder in der unmittelbaren Umgebung der Elektrode,
 - Das Überleiten eines die Species enthaltenden Fluids über die mindestens eine Elektrode oder deren unmittelbare Umgebung derart, dass die Fängermoleküle die Species durch Anbinden oder Komplexieren einfangen.
25
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die eine oder mehreren Species direkt oder indirekt ein Molekül generieren kann/können, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, dadurch gekennzeichnet, dass das Positionieren des Moleküls die folgenden Schritte umfasst:
 - Das Überleiten eines die Species enthaltenden Fluids über die mindestens eine Elektrode oder deren unmittelbare Umgebung derart, dass die Species an der mindestens einen Elektrode oder in unmittelbarer Umgebung der Elektrode gebunden wird,
 - Das Generieren des Moleküls, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, durch die Species.
30
35

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass auf der mindestens einen Elektrode und/oder deren unmittelbarer Umgebung Fänger moleküle angebracht sind, die in der Lage sind, die Species durch Anbinden oder Komplexieren einzufangen.
5
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass zum Generieren des Moleküls, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, ein Fluid über die mindestens eine Elektrode und ggf. ihre unmittelbare Umgebung geleitet wird, das ein Vorläufer-Molekül enthält, aus dem die Species das genannte Molekül generieren kann, das eine Redox-Reaktion eingehen kann.
10
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, worin die Species ein Protein, insbesondere ein Enzym ist oder enthält.
15
11. Verfahren nach Anspruch 10, worin das Enzym p-Aminophenol freisetzen kann und vorzugsweise ausgewählt ist unter Phosphatasen und β-Galaktosidase.
12. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Species eine Ribonucleinsäure ist, gekennzeichnet dadurch, dass das Molekül, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, durch die folgenden Schritte generiert wird:
20
 - Überleiten eines Fluids über die mindestens eine Elektrode und ggf. ihre unmittelbare Umgebung, das ein Molekül enthält, welches an die Verbindung oder den Komplex aus Fänger molekül und Species, nicht aber an die Fänger moleküle allein binden kann und welches das Molekül, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, in gebundener oder verkapselter Form enthält,
 - Freisetzen des Moleküls, das eine Redox-Reaktion eingehen kann.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 12, worin das Freisetzen des Moleküls, das eine Redox-Reaktion eingehen kann durch Überleiten eines weiteren Fluids über die mindestens eine Elektrode und ggf. ihre unmittelbare Umgebung bewirkt wird, wobei das Fluid in der Lage ist, das Molekül, das eine Redox-Reaktion eingehen kann, freizusetzen.
35
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine Elektrode eine Oberfläche aus Platin oder Gold besitzt.

15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich auf der Oberfläche der mindestens einen Elektrode Fänger moleküle befinden, die in der Lage sind, die zu detektierende Species zu binden oder zu komplexieren, wobei die Fänger moleküle vorzugsweise über Thiolbrücken an die Elektrode angebunden sind.
10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich in unmittelbarer Nähe der mindestens einen Elektrode ein nichtleitendes Substrat befindet, das derart aktiviert ist, dass es die Species und/oder Fänger moleküle binden oder adsorbieren kann.
15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Elektroden vorhanden sind, die mehrfach während des Zeitraums t_1-t_2 zwischen den genannten unterschiedlichen Potentialen derart gleichsinnig hin- und hergeschaltet werden, dass sie gegenüber einer Referenzelektrode Potentiale einnehmen, die im Bereich bzw. unter/über dem Redoxpotential der genannte Species oder des genannten Moleküls liegen, wodurch die genannte Species / das genannte Molekül gleichzeitig an jeder der mindestens zwei Elektroden abwechselnd reduziert und oxidiert wird.
20. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden oder zwei der Elektroden mit unterschiedlichen Fänger molekülen belegt sind, die unterschiedliche Species binden oder detektieren können.
25. Elektrodenarray zum Durchführen eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche mit mindestens einer Messposition und mindestens einer Messelektrode pro Messposition und einer Referenzelektrode, das derart ausgebildet ist, dass alle Messelektroden gegenüber der Referenzelektrode gleichsinnig abwechselnd als Kathode und als Anode geschaltet werden können.
30. Elektrodenarray nach Anspruch 19, umfassend ein Substrat in Chip-Format und eine oder mehrere Messelektroden, die aus Gold oder Platin bestehen oder mit Gold oder Platin beschichtet sind.
35. Elektrodenarray nach Anspruch 19, umfassend ein Substrat in Chip-Format und eine oder mehrere Messelektroden, die aus Gold oder Platin bestehen oder mit Gold oder Platin beschichtet sind.

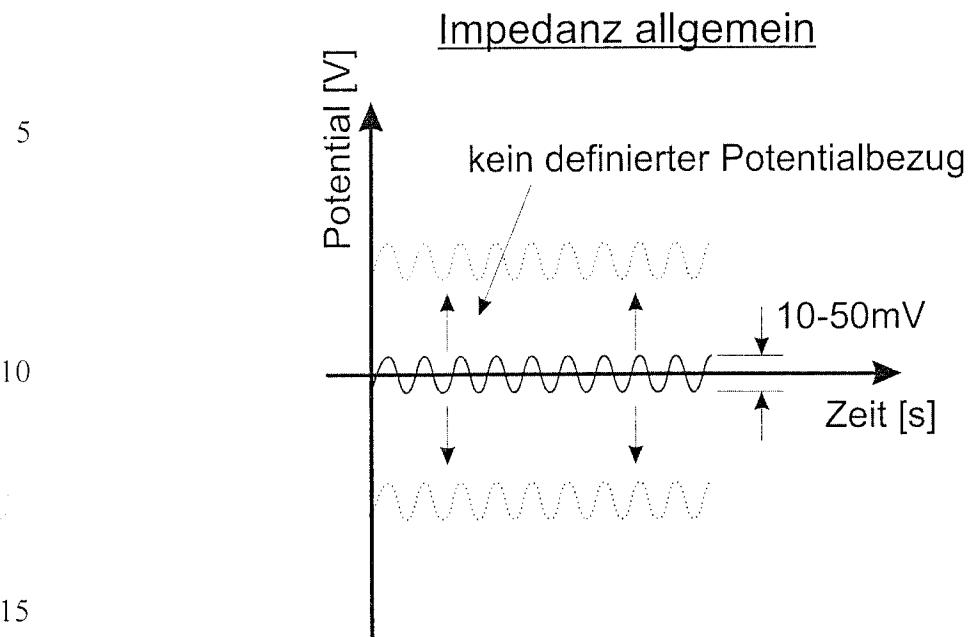
21. Elektrodenarray nach Anspruch 19 oder 20, worin die Messelektroden Abmessungen im µm-Bereich oder unterhalb des µm-Bereichs aufweisen.
22. Vorrichtung zum Durchführen eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 18, umfassend ein Elektrodenarray nach einem der Ansprüche 19 bis 21, eine Gegenelektrode, eine Referenzelektrode sowie eine Schaltungsanordnung, die die Messelektrode(n) gegenüber der Referenzelektrode gleichsinnig abwechselnd als Kathode und als Anode schalten kann.
23. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Schaltungsanordnung ein Potentiostat ist.
24. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Schaltungsanordnung eine elektronische Schaltungsanordnung ist, die sich auf oder in einem Substrat befindet, das nicht das Substrat für die Messelektroden ist.
25. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Schaltungsanordnung eine elektronische Schaltungsanordnung ist, die sich auf oder in demselben Substrat befindet, das die Messelektroden trägt.

25 * * *



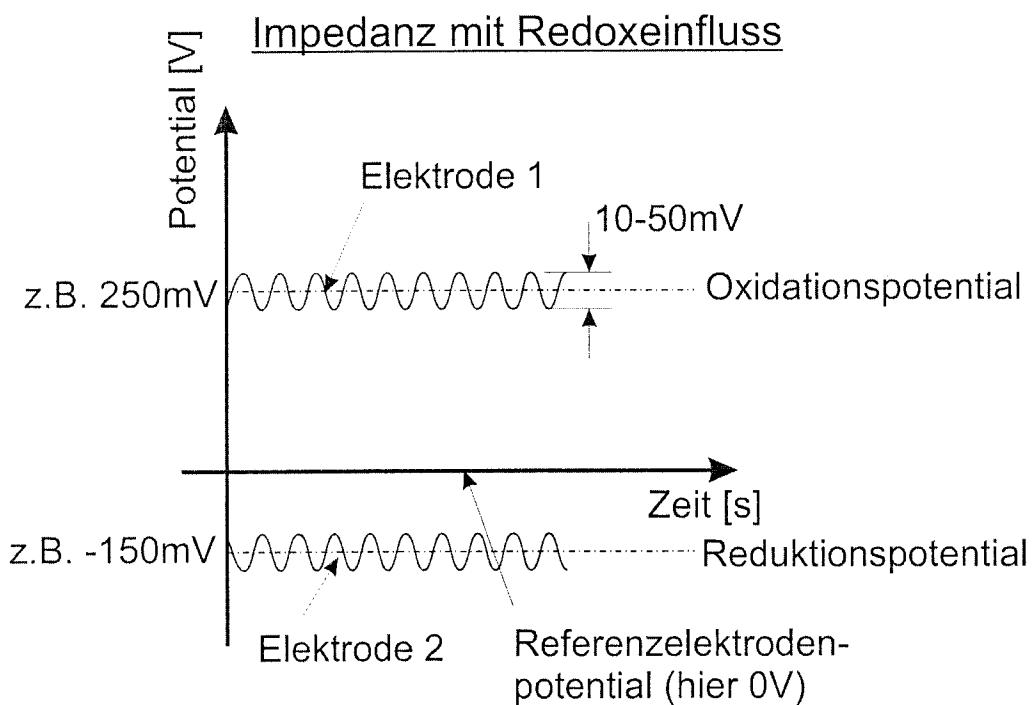
1. Messposition bestehend aus einer Elektrode
2. Redox-Mediator oxidiert
3. Redox-Mediator reduziert
4. Auf die Elektrode aufgegebene niedrig frequente Wechselspannung
5. Auslesung des generierten Redox-Stroms über die Zeit

Figur 1

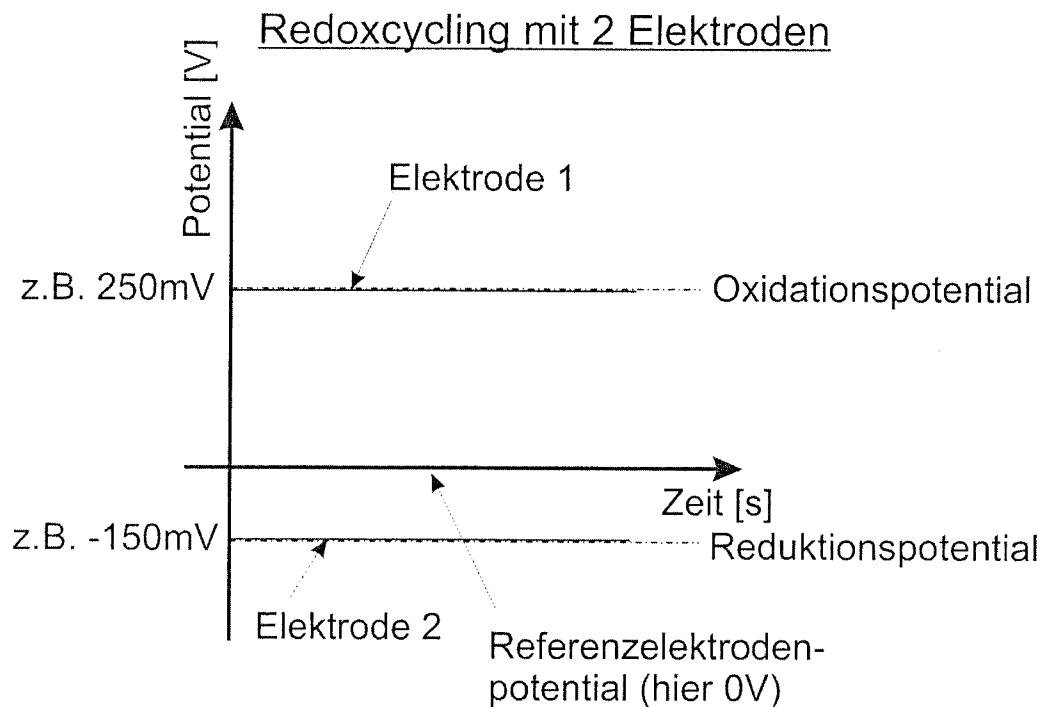


Figur 2a

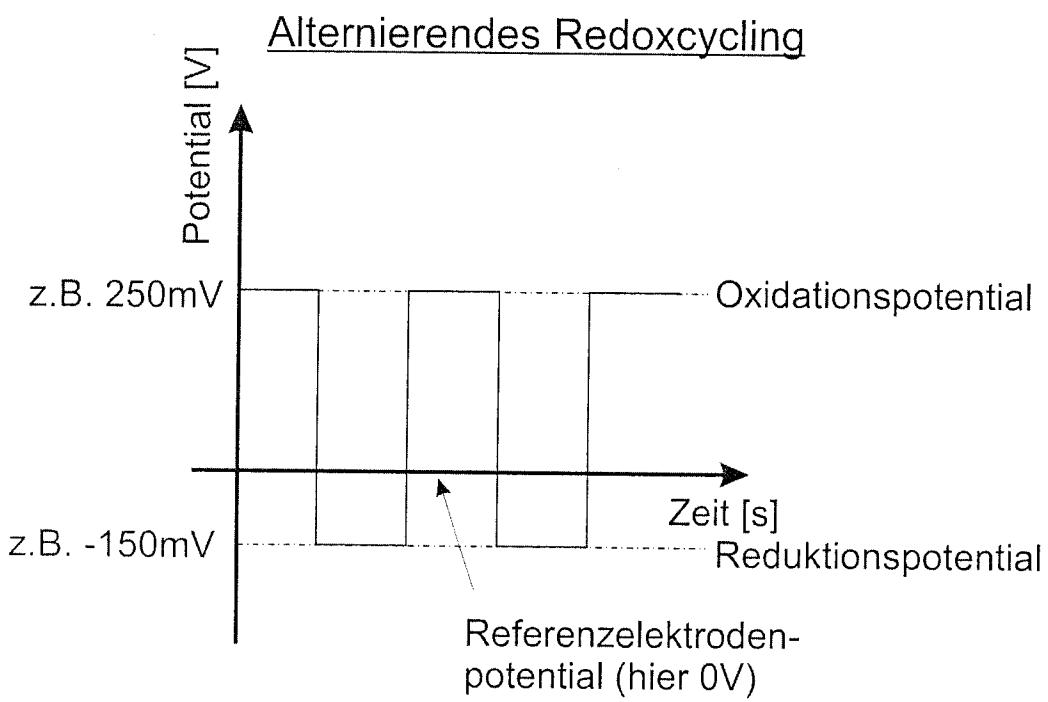
20



Figur 2b

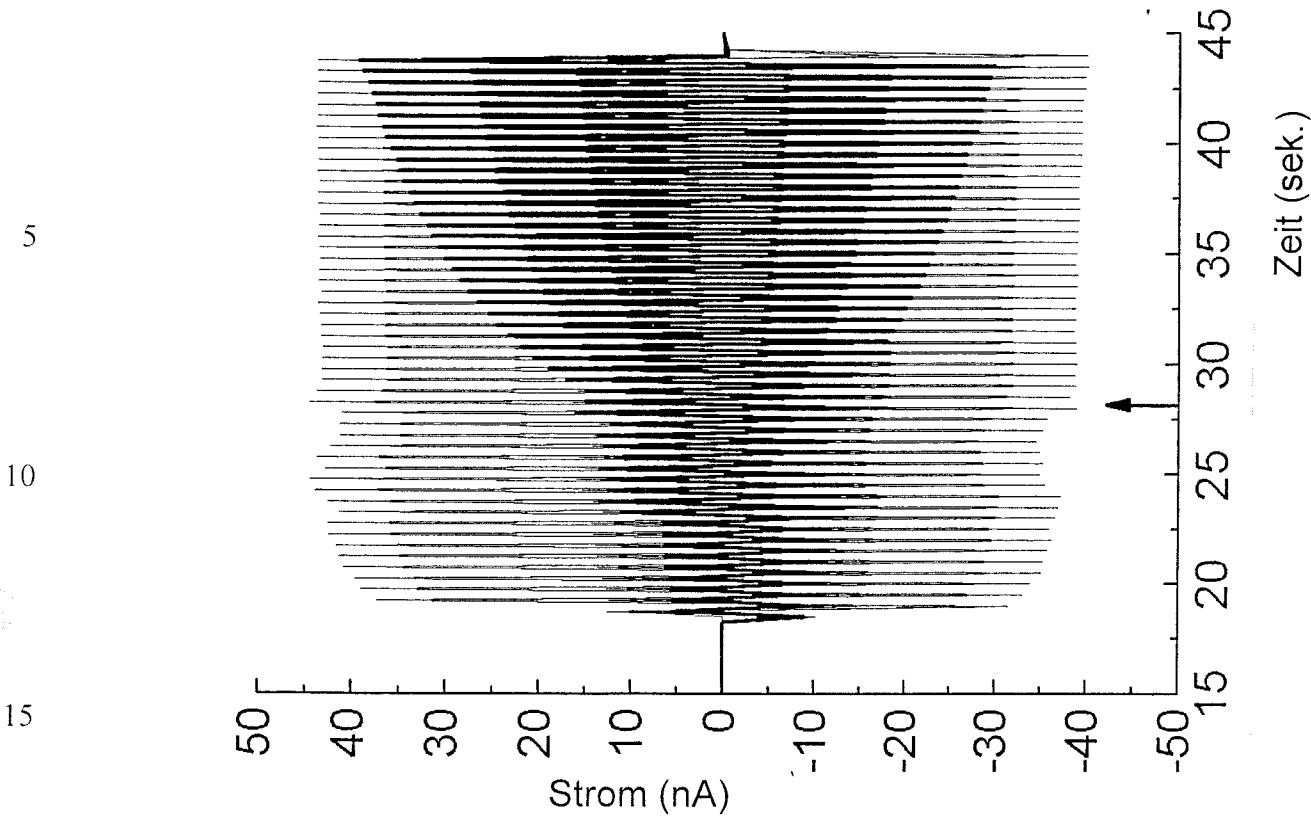


Figur 2c

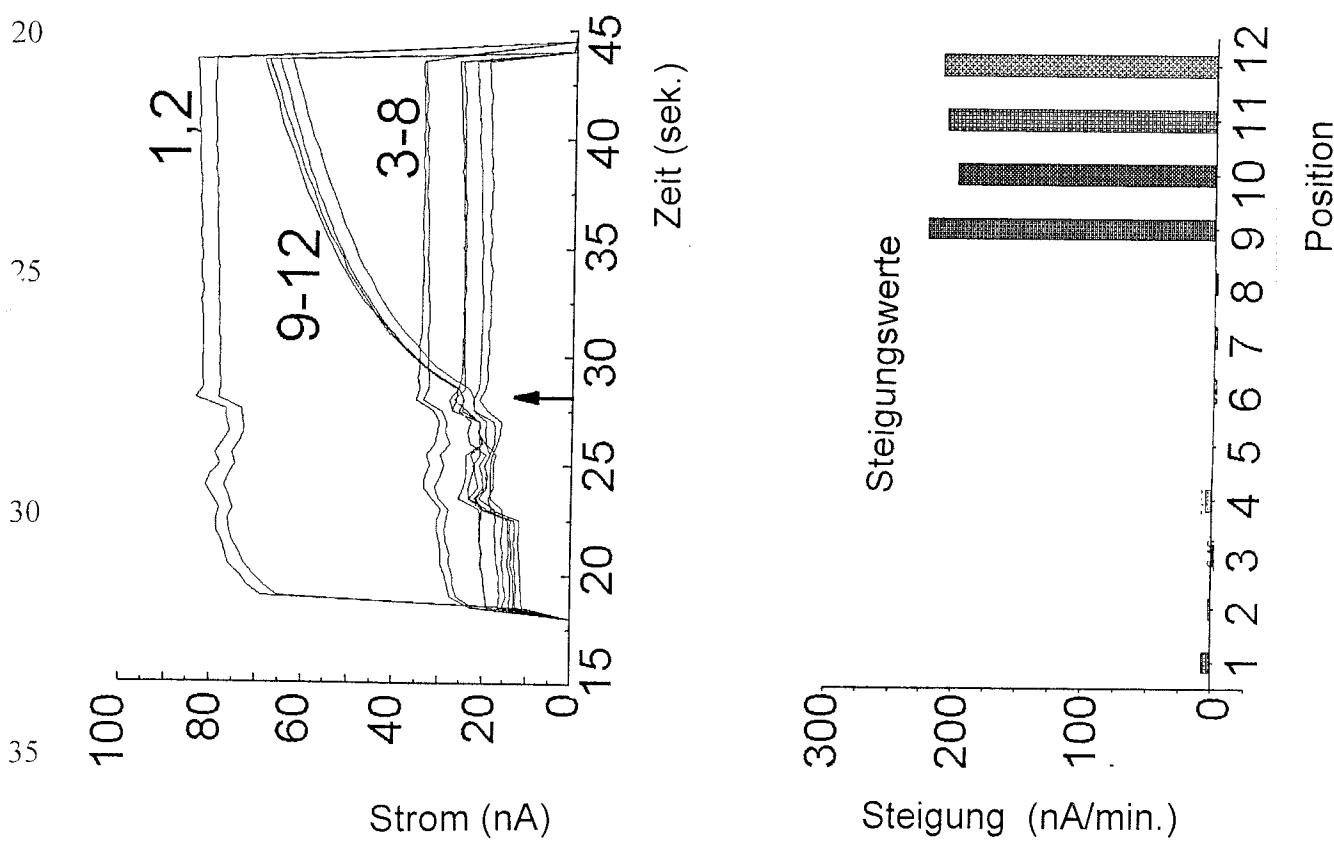


Figur 2d

4/4



Figur 3a



Figur 3b

Figur 3c

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/056616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	INV. G01N33/535 C12Q1/00	G01N33/543 C12Q1/42	G01N33/58	G01N27/49	G01N27/403
-------------------------------------	--------------------------	---------------------	-----------	-----------	------------

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/014931 A2 (SIEMENS AG [DE]; BARLAG HEIKE [DE]; MUND KONRAD [DE]; GUMBRECHT WALTE) 8 February 2007 (2007-02-08) page 2, line 21 – page 6, line 34 page 8, line 1 – page 22, line 27 claim 1 figures 1-5,7,13,16	1-25
X	WO 2005/073708 A2 (SIEMENS AG [DE]; BARLAG HEIKE [DE]; GUMBRECHT WALTER [DE]; MUND KONRA) 11 August 2005 (2005-08-11) page 3, line 15 – page 11, line 8 page 14, line 20 – page 18, line 30 figures 1,9	1,4-25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report

10 September 2009

23/09/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Johnson, Keith

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/056616

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages.	Relevant to claim No.
X	US 2007/111202 A1 (HENKENS ROBERT W [US]; O'DALY JOHN P [US]; WOJCIECHOWSKI MAREK [US];) 17 May 2007 (2007-05-17) paragraph [0086] - paragraph [0117] paragraph [0225] - paragraph [0253] paragraph [0288] - paragraph [0313] figures 1,7	19-25
A	DAS J ET AL: "Electrochemical immunosensor using p-aminophenol redox cycling by hydrazine combined with a low background current" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 79, no. 7, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 2790-2796, XP7909735 ISSN: 0003-2700 the whole document	1-18
A	LIMOGES B ET AL: "Theory and practice of enzyme bioaffinity electrodes. Chemical, enzymatic, and electrochemical amplification of in situ product detection." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 130, no. 23, 20 May 2008 (2008-05-20) , pages 7276-7285, XP002545113 ISSN: 1520-5126 the whole document	1,6-11, 14-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/056616

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007014931 A2	08-02-2007	CN 101283277 A DE 102005037436 A1 EP 1910831 A2	08-10-2008 15-02-2007 16-04-2008
WO 2005073708 A2	11-08-2005	DE 102005003911 A1 GB 2428484 A US 2008099347 A1	25-08-2005 31-01-2007 01-05-2008
US 2007111202 A1	17-05-2007	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/056616

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV.	G01N33/535	G01N33/543	G01N33/58
C12Q1/00	C12Q1/42		

G01N27/49

G01N27/403

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2007/014931 A2 (SIEMENS AG [DE]; BARLAG HEIKE [DE]; MUND KONRAD [DE]; GUMBRECHT WALTE) 8. Februar 2007 (2007-02-08) Seite 2, Zeile 21 – Seite 6, Zeile 34 Seite 8, Zeile 1 – Seite 22, Zeile 27 Anspruch 1 Abbildungen 1-5,7,13,16 -----	1-25
X	WO 2005/073708 A2 (SIEMENS AG [DE]; BARLAG HEIKE [DE]; GUMBRECHT WALTER [DE]; MUND KONRA) 11. August 2005 (2005-08-11) Seite 3, Zeile 15 – Seite 11, Zeile 8 Seite 14, Zeile 20 – Seite 18, Zeile 30 Abbildungen 1,9 ----- -/-	1,4-25



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
10. September 2009	23/09/2009
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Johnson, Keith

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/056616

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2007/111202 A1 (HENKENS ROBERT W [US]; O'DALY JOHN P [US]; WOJCIECHOWSKI MAREK [US];) 17. Mai 2007 (2007-05-17) Absatz [0086] - Absatz [0117] Absatz [0225] - Absatz [0253] Absatz [0288] - Absatz [0313] Abbildungen 1,7 -----	19-25
A	DAS J ET AL: "Electrochemical immunosensor using p-aminophenol redox cycling by hydrazine combined with a low background current" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 79, Nr. 7, 1. April 2007 (2007-04-01), Seiten 2790-2796, XP7909735 ISSN: 0003-2700 das ganze Dokument -----	1-18 1,6-11, 14-15
A	LIMOGES B ET AL: "Theory and practice of enzyme bioaffinity electrodes. Chemical, enzymatic, and electrochemical amplification of in situ product detection." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 130, Nr. 23, 20. Mai 2008 (2008-05-20) , Seiten 7276-7285, XP002545113 ISSN: 1520-5126 das ganze Dokument -----	1,6-11, 14-15
1		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/056616

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2007014931 A2	08-02-2007	CN 101283277 A DE 102005037436 A1 EP 1910831 A2	08-10-2008 15-02-2007 16-04-2008
WO 2005073708 A2	11-08-2005	DE 102005003911 A1 GB 2428484 A US 2008099347 A1	25-08-2005 31-01-2007 01-05-2008
US 2007111202 A1	17-05-2007	KEINE	