


Teststreifenanalyse Hot Paper

 Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 26287–26297

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202110744

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202110744

Streifenschnelltest mit ppt-Empfindlichkeit durch Kombination von Elektrochemilumineszenz-Detektion mit Aptamer-gesteuerter Indikatorfreisetzung aus mesoporösen Nanopartikeln

Estela Climent* und Knut Rurack*

Abstract: Die Kombination aus elektrogenerter Chemilumineszenz (ECL) und Aptamer-gesteuerter Indikatorfreisetzung (gAID) aus magnetischen mesoporösen Silica-Nanopartikeln, die in mit Poly(ethylenglycol) und N-(3-Triethoxysilylpropyl)diethanolamin funktionalisiertes Glasfaserpapier eingebettet sind, ermöglichte die Entwicklung eines Schnelltests, mit dem sich Penicillin direkt in verdünnter Milch bis auf 50 ± 9 ppt in < 5 min nachweisen lässt. Die kovalente Bindung der Aptamer-Kappe an das Siliciumdioxid-Gerüst ermöglichte den Verschluss der Poren durch nicht-kovalente elektrostatische Wechselwirkungen mit Oberflächen-Aminogruppen. Die Bindung von Penicillin führte zu einer Faltung des Aptamers, wodurch der zuvor in das Material geladene ECL-Reporter $Ru(bpy)_3^{2+}$ freigesetzt wurde und nach lateralem Fluss von einer Smartphone-Kamera nach elektrochemischer Anregung mit einer in einen 3D-gedruckten Halter eingesetzten Siebdruckelektrode detektiert wird. Der Ansatz ist einfach, generisch und bietet Vorteile hinsichtlich Empfindlichkeit, Messunsicherheit und Robustheit gegenüber konventioneller Fluoreszenz- oder elektrochemischer Detektion, insbesondere für Point-of-Need-Analysen anspruchsvoller Matrices und Analyten im Ultraspurenbereich.

Einleitung

Vor allem durch ihre Schlüsselrolle bei der Eindämmung der SARS-CoV-2-Pandemie, insbesondere durch die schnelle Identifizierung ansteckender, aber potenziell asymptomatischer Personen, haben Schnelltests in den letzten anderthalb Jahren weltweit eine vielleicht beispiellose gesellschaftliche Aufmerksamkeit erhalten.^[1] Neben ihrer derzeitigen Bekanntheit im Bereich der medizinischen Diagnostik haben Schnelltests und Assays jedoch auch in anderen Bereichen wie dem Lebensmittelsektor,^[2] der Land- und Forstwirtschaft,

der inneren Sicherheit und Forensik^[4] oder der Umwelt^[5] im letzten Jahrzehnt an Bedeutung gewonnen. Ihr Vorteil besteht darin, dass sie außerhalb eines Labors von ungeschultem Personal direkt am Bedarfspunkt eingesetzt werden können, wodurch die Zeit zwischen dem ersten Verdacht und der ersten Entscheidung minimiert wird. In dieser Hinsicht sind papierbasierte Sensoren eine attraktive und zukunftssträchtige Geräteklasse,^[6] da sie die Voraussetzungen des ASSURED-Prinzips der Weltgesundheitsorganisation erfüllen: Sie sind erschwinglich, empfindlich, spezifisch, benutzerfreundlich, schnell und robust, (nahezu) gerätefrei und für den Endnutzer erhältlich.^[7] Die physikalischen, chemischen und mechanischen Eigenschaften von Zellulose- oder Glasfaserpapier sowie ihre einfache Herstellung machen diese Materialien gerade im Hinblick auf kostengünstige und umweltfreundliche Produktionsverfahren von solchen Geräten sehr interessant.^[8] Darüber hinaus hat die heutige Omnipräsenz mobiler Kommunikationsgeräte mit leistungsstarken Rechenkapazitäten und eingebauten Kameras dazu geführt, dass eine große Mehrheit der Weltbevölkerung im Prinzip einen leistungsstarken Detektor in der Hand hat, der sich besonders für das Fotografieren und Analysieren von kleinen, flachen Substraten wie Papierstreifen eignet. Während die Verwendung von Smartphones als Detektoren bereits vor einem Jahrzehnt begann,^[9] hat erst das Aufkommen erschwinglicher 3D-Drucktechnologien und OTG- (On-The-Go) Elektronik das Feld beflügelt.^[10] Die Herstellung von passenden Adaptern für ein Telefon ist dadurch einfach und kostengünstig und die Anpassung an jedes neue Telefonmodell mit einer anderen Größe oder Kameraposition unkompliziert.^[11] Darüber hinaus ermöglicht die OTG-Elektronik eine einfache und autonome Integration von Mikroelektroden und Leuchtdioden (LEDs) für elektrochemische und Fluoreszenzmessungen in solche Halterungen,^[12] was mehr Spielraum für die Assay-Entwicklung lässt als das Fotografieren farbiger Bereiche.

Aufgrund dieser Vorteile wurden viele Ansätze ausprobiert, um sensorische Nanomaterialien zu entwickeln und in Papiermatrices für die Point-of-Care-Diagnostik zu integrieren.^[13] Durch die Abstimmung der Eigenschaften der Membranen in Kombination mit dem Einsatz von Mobiltelefonen zur Datenanalyse^[14] wurde die Leistungsfähigkeit solcher Geräte verbessert.^[15] Die meisten der aktuellen Papierstreifen-Schnelltests basieren auf kolorimetrischer,^[16] Fluoreszenz-^[17] oder elektrochemischer Detektion.^[18] Viele dieser Assays weisen jedoch Schwächen in Bezug auf Spezifität, Empfindlichkeit, Genauigkeit und Präzision oder die Fähigkeit zur Multiplex-Detektion auf.^[19] Während die Spezifität


[*] E. Climent, K. Rurack


Fachbereich Chemische und Optische Sensorik, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)

Richard-Willstätter-Str. 11, 12489 Berlin (Deutschland)

E-Mail: estela.climent@bam.de

knut.rurack@bam.de

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.202110744> zu finden.

 © 2021 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

von der Erkennungs-(Bio-)Chemie abhängt, basiert die kolorimetrische Detektion, die immer noch die am weitesten verbreitete Methode bei Streifenschnelltests ist, fast ausschließlich auf Gold-Nanopartikeln (AuNPs), die mit biomakromolekularen Erkennungseinheiten, hauptsächlich Antikörpern, dekoriert sind. Obwohl AuNPs deutlich höhere molare Absorptionskoeffizienten als organische Farbstoffe oder farbige anorganische Ionen besitzen, sind solche Assays hinsichtlich der Empfindlichkeit limitiert, insbesondere bei visueller Inspektion durch das bloße Auge. Darüber hinaus werden solche kolorimetrischen Tests auch in erster Linie für biomolekulare Analyten eingesetzt, da die üblicherweise verwendeten Immunoassay-Formate, Sandwich- und kompetitiv, bei der Analyse kleiner Moleküle oft eine ungenügende Sensitivität aufweisen.^[20] Des Weiteren erfordert das Multiplexen von AuNP-basierten kolorimetrischen Assays eine räumliche Trennung und gelingt nicht über die Identifizierung verschiedener Farben. Die Fluoreszenzdetektion hingegen kann problemlos mit einer Smartphone-Kamera erfolgen und ermöglicht ein Fluoreszenz-Farbmultiplexing, hat jedoch Nachteile beim Signal-Rausch-Verhältnis, insbesondere beim Verwenden von Papierträgermaterialien. Die elektrochemische Detektion hingegen würde zusätzliches Zubehör erfordern und die Multianalyt-Detektion wäre eine Herausforderung. Ein vielversprechender Ansatz ist daher die Kombination beider Techniken in der elektrogenierten Chemilumineszenz oder Elektrochemilumineszenz (ECL)-Detektion.^[21] ECL verzichtet auf eine Lichtquelle zur Anregung, reduziert damit das Rauschen deutlich und besitzt im Vergleich zu den weit verbreiteten kolorimetrischen Assays alle Vorteile der Fluoreszenz.^[21,22] Obwohl die ECL-Detektion für papierbasierte Schnelltests vor einem Jahrzehnt bereits realisiert wurde^[22] sind bisher nur wenige Berichte bekannt, die meisten davon für den Nachweis von Schwermetallionen, DNA oder Protein-Biomarkern sowie ganzer Zellen.^[23] Viele dieser Berichte zeigen jedoch die Anwendbarkeit der ECL-Erfassung nur prinzipiell und viele der Beispiele zeichnen sich durch vergleichsweise hohe Nachweisgrenzen aus.

Bei der ECL wird ein Lumineszenz-Signal durch eine chemische Reaktion erzeugt, die durch Anlegen eines elektrischen Potentials initiiert und kontrolliert wird. Da die Signalerzeugung nur an der Elektrode und nur für die Dauer des angelegten Potentials stattfindet, ist ECL eine hoch lokalisierte und kontrollierte Detektionsmethode. Der größte Vorteil von ECL gegenüber Fluoreszenz besteht darin, dass ECL zur Anregung keine Lichtquelle benötigt, wodurch außergewöhnlich hohe Signal-Rausch-Verhältnisse erreicht werden können. Dies ist in zweierlei Hinsicht besonders wichtig, zum einen für Trägermaterialien wie Papier, die nicht transparent sind und das Licht stark streuen, und zum anderen für trübe Proben wie Milch, Abwasser oder Körperflüssigkeiten, wenn diese ohne Reinigung analysiert werden müssen. Da nur vergleichsweise wenige Verbindungen unter Umgebungsbedingungen in wässrigen Medien eine ECL-Emission zeigen, ist Tris(2,2'-bipyridin)ruthenium(II)-chlorid ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) der am häufigsten verwendete ECL-Reporter.^[24] Darüber hinaus ist eine leistungsstarke ECL-Erfassung nur möglich, wenn $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ mit einem Co-Reaktanden wie einem sekundären oder tertiären Amin kombiniert wird,^[25]

was zu einer gewünschten Verstärkung des ECL-Signals führt und den Nachweis in wässriger Lösung unter konstantem Potential ermöglicht. Ein weiterer praktischer Vorteil der $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -basierten ECL ist der Wellenlängenbereich der Emission (600–750 nm), der von Smartphone-Kameras leicht erfasst werden kann.^[26]

Basierend auf unserer Erfahrung bei der Entwicklung leistungsstarker und dennoch einfacher Teststreifen-basierter Sensorsysteme für Point-of-Need-Szenarien^[27] bleibt der Ultraspurennachweis von Zielanalyten in komplexen Matrices wie z. B. von Schadstoffen wie Pestiziden oder Antibiotika in Lebensmitteln wie Milch eine Herausforderung. Stellen Sie sich einen Milchwagenfahrer vor, der bei jedem Stopp auf einem Bauernhof beim Sammeln frischer Milch auf der täglichen Tour einen Test durchführen kann, um das Vorhandensein von Antibiotika wie Penicillin zu überprüfen, bevor er die Milch in den Tank pumpt, um so eine mögliche Kontamination der gesamten Ladung zu vermeiden. Die wirtschaftlichen und gesundheitlichen Vorteile liegen auf der Hand. Ein solcher Test sollte für eine ungeschulte Person einfach zu handhaben sein, in kurzer Zeit ein zuverlässiges Ergebnis liefern, das Ergebnis zu Dokumentationszwecken automatisch erfassen und sehr empfindlich sein, da beispielsweise der Rückstandshöchstgehalt (MRL) für Penicillin in Milch nur $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ beträgt.^[28] Um einen solchen Test zu entwickeln, haben wir uns entschieden, die Vorteile der ECL-Detektion mit unserem hochempfindlichen, selektiven und modularen Nanopartikel-basierten Signalerzeugungsansatz zu kombinieren, der auf einer gesteuerten Indikatorfreisetzung beruht,^[27b] und diese auf einem Lateral Flow-Teststreifen mit Smartphone-Auslesung zu implementieren. Wie wir kürzlich gezeigt haben, kann ein solcher Ansatz leicht zu einem Test erweitert werden, der einfach bleibt, aber die gleichzeitige Analyse einer kleinen Anzahl von Analyten erlaubt.^[29] Ein solches Multiplexing von wenigen Zielverbindungen wäre auch für unseren Milchwagenfahrer sehr wünschenswert, da es die Überprüfung der potenziellen Ladung auf verschiedene Leitverunreinigungen in jedem Betrieb zeitsparend und unkompliziert ermöglichen würde. Wir berichten hier zum ersten Mal, wie es der synergistische Einsatz von ECL-Nachweis und gesteuerter Indikatorfreisetzung in schnellen papierbasierten Assays ermöglicht, Antibiotika wie Penicillin in einer anspruchsvollen Matrix wie Milch in weniger als 5 Minuten Gesamtmeszeit bis in den ppt-Bereich zu bestimmen.

Ergebnisse und Diskussion

Für das chemische Erkennungselement des Systems entschieden wir uns, ein Aptamer-gesteuertes Indikatorfreisetzung- (gAID-) System herzustellen, da Aptamere, also DNA-Sequenzen mit hoher Selektivität und Affinität für Zielproteine,^[30] kleine Moleküle^[31] oder Metallionen,^[32] eine attraktive Alternative zu antikörpergesteuerten Systemen sind und gleichzeitig eine größere Vielseitigkeit und Modularität aufweisen.^[33] Das Prinzip der Signalübertragung von gesteuerten Indikatorfreisetzungssystemen ist wie folgt (Schema S1, Hintergrundinformationen, Section 1).^[34] Ein

hochporöses Gerüstmaterial, meist mesoporöse Silica-Nanopartikel, wird mit Farbstoffmolekülen beladen und mit (bio)chemischen Einheiten als sogenannten Torwächtern beschichtet, die kovalent an die Außenfläche des Gerüsts gebunden sind. Sperrige Einheiten wie Biomakromoleküle werden dann normalerweise auf nicht-kovalente Weise an diese Torwächter gebunden, welche die Poren verschließen und die Freisetzung des Indikators blockieren (Schema S1a). Das System ist so ausgelegt, dass ein Zielanalyt stärker an Torwächter oder Abdeckung bindet als die beiden die Pore verschließenden Partner aneinander, was zu einer Dissoziation dieses Porenverschluss-Ensembles und damit zur Freisetzung des Indikators führt. Das Ergebnis ist eine chemische Signalverstärkung, da nur wenige Analytmoleküle mit den Porenverschluss-Ensembles reagieren, damit aber zur Abgabe einer hohen Anzahl an Reportermolekülen führen, die aus den Poren in die umgebende Lösung diffundieren.^[35] Insbesondere in Kombination mit biochemischem Verschluss haben solche Systeme in einfachen Assayformaten bereits eine sehr gute Empfindlichkeit und Selektivität gezeigt. In Bezug auf gAID-Systeme wurden bereits einige in der Literatur beschrieben.^[36] Allerdings ist in diesen Fällen das Aptamer als solches nicht-kovalent auf der Oberfläche des porösen Wirtsmaterials angehängt und wird nach Bindung des entsprechenden Analyten vollständig von der Oberfläche des anorganischen Gerüsts verdrängt, wobei der Bindungsvorgang eine Faltung des Aptamers zur Folge hat, die die Desorption von der Oberfläche erleichtert (Schema S1a).

Dieser Ansatz ist ungünstig, wenn andere Komponenten einer realen Probe zu einer unbeabsichtigten Desorption und damit zu einer falsch-positiven Freisetzung des Indikators führen können. Beim Nachweis von Antibiotika in Milch ist ein solches Szenario wahrscheinlich, da Milch einen beträchtlichen Elektrolytgehalt aufweist sowie verschiedene oberflächenaktive Verbindungen enthält. Anstelle von antikörperbasierten gAID-Systemen, mit denen wir bisher gearbeitet haben,^[27b,29] erschienen uns hier Aptamere attraktiver, weil sie bessere Möglichkeiten einer definierten kovalenten chemischen Anbindung an die äußere Oberfläche des porösen Wirts bieten, einschließlich der Einstellung der Linkerlänge zwischen Ankerpunkt und Bindungsregion. Das von uns verwendete Prinzip ist daher anders (Schema S1b, Schema 1). Im geschlossenen Zustand des Systems liegt das Aptamer in einer losen, offenen, ungefalteten Form vor und verschließt die Poren durch elektrostatische Wechselwirkung mit einem Überschuss an funktionellen chemischen Gruppen auf der Oberfläche, wie bei DNA-Einzelstrang-gesteuerten Systemen.^[37] Im Wesentlichen ist jedes Aptamer über seinen 5'-Terminus durch einen Ankerpunkt kovalent an die Partikeloberfläche gebunden (grünes Fragment, Schema 1a), während die negativ geladenen Phosphatgruppen am Oligonukleotid-Rückgrat (schwarze Punkte) mit positiv geladenen Ammoniumgruppen von überschüssigen Aminosilan-Einheiten der primären funktionellen Oberflächenbeschichtung (blaue Fragmente) nicht-kovalent wechselwirken können (rote Pfeile). Die Verwendung eines Propyl-Amido-Decyl-Linkers (magenta-farbenes Fragment) ermöglicht es dem Aptamer-Strang, sich zu biegen und horizontal zur Oberfläche auszurichten, so dass elektrostatische Wechselwirkungen

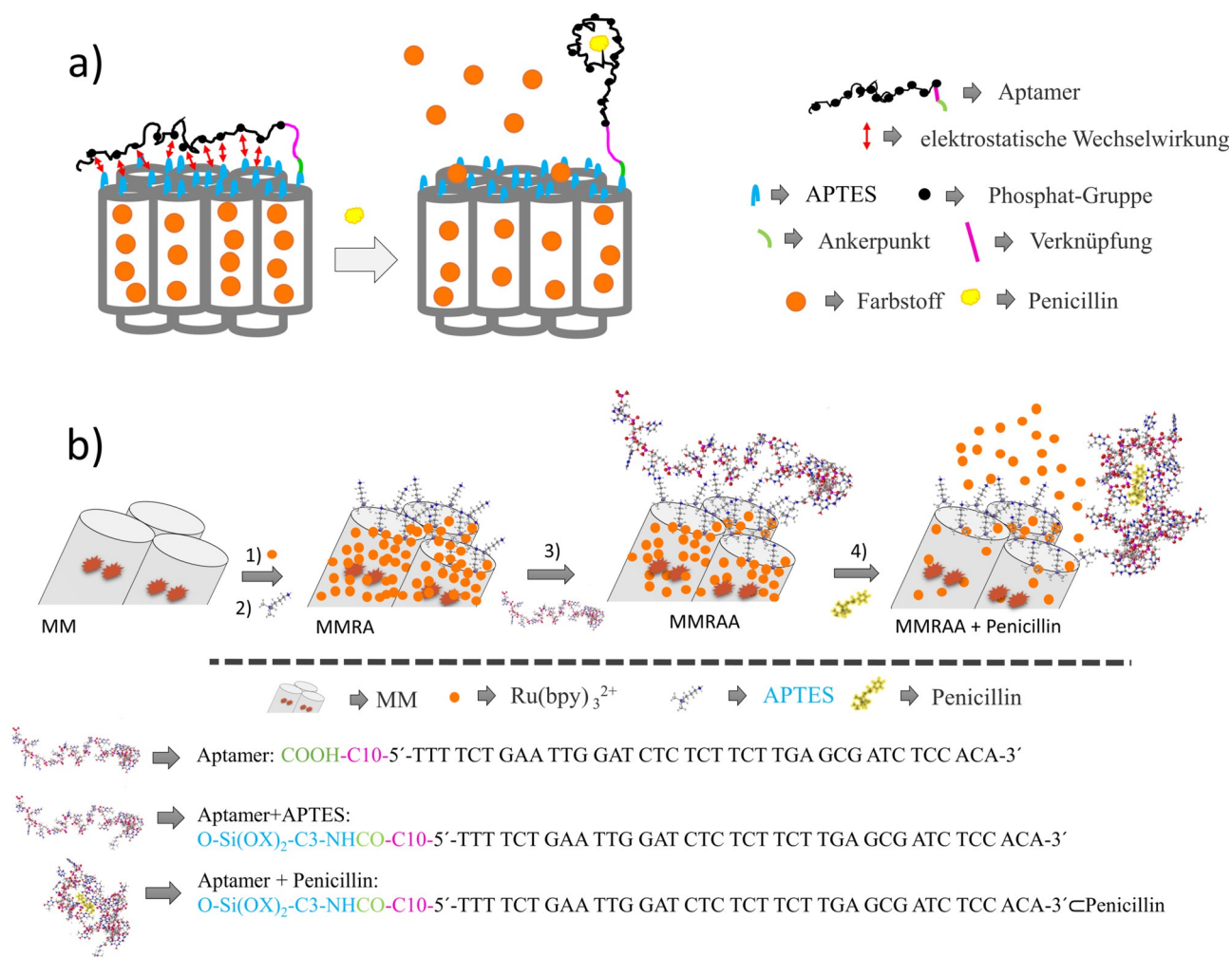
aufreten können (rote Pfeile). Während die kovalente Bindung das Aptamer fixiert, sind die multiplen nicht-kovalenten Wechselwirkungen dynamisch, wobei die vielen Aptamere auf einem Partikel so ein sich ständig änderndes monoschichtartiges Netzwerk von Nukleotidsträngen auf der Partikeloberfläche bilden. Kommt ein Analytmolekül (gelbe Form) in die Nähe der Bindungsregion und kann an das Motiv andocken, ändert der Aptamer-Strang seine Konformation. Dies führt zur Faltung des Aptamers im Komplex, weg von der Partikeloberfläche, was keine Ausbildung nicht-kovalenter Wechselwirkungen erlaubt, wodurch der Farbstoff aus den offenen Poren diffundieren kann (orangefarbene Punkte). Die kovalente Anbindung des Aptamers stellt somit sicher, dass die Analytbindung lediglich ein Aufschwingen des Tores bewirkt, anstatt das gesamte Tor aus den Angeln zu heben.

Konkret umfasst das neu entwickelte Material ein magnetisches, mesoporöses Siliciumdioxid-Nanopartikel (MSN)-Gerüst, das mit $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ beladen ist und ein Penicillin-selektives Aptamer^[38] enthält, das kovalent an die äußere Oberfläche gebunden ist und das Verweilen der Ladung in den Poren in Abwesenheit eines Analyten sicherstellt (Schema 1b). Bei Bindung von Penicillin ändert das Aptamer seine Konformation, faltet sich am distalen Ende der Oberfläche zusammen, öffnet so die Poren und führt zur Freisetzung einer großen Zahl von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Reportern. Die detaillierte Synthese, Funktionalisierung und Charakterisierung der Materialien finden sich in den Abschnitten 2–4, Abbildungen S1–S5, Tabellen S1, S2 in den Hintergrundinformationen.

Vor dem Testen der Leistungsfähigkeit des Materials wurde die ECL-Signalgebung von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ in Lösung auf Empfindlichkeit durch Screening mehrerer Co-Reaktanden und Siebdruck- (SPE-) Elektroden optimiert (siehe Abschnitte 5.1–5.3, Abbildungen S6–S8, Tabelle S3 in den Hintergrundinformationen). Als Ergebnis verwendeten wir für die weiteren Studien eine SPE-Elektrode mit Gold als Arbeitselektrode, Platin als Gegenelektrode und Silber als Referenzelektrode (AT250) in Verbindung mit N-Butyldiethanolamin (NBEA) als Reaktionspartner in einer Konzentration von 5 mM.

Das Sensormaterial **MMRAA** wurde durch Suspendieren magnetischer mesoporöser Nanopartikel **MM** vom MCM-41-Typ in einer hochkonzentrierten $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Lösung in Acetonitril hergestellt, um die maximale Farbstoffmenge in das kalzinierte Gerüst zu laden und **MMR** zu ergeben (siehe Abschnitt 3 in den Hintergrundinformationen). Mesoporöse Partikel mit magnetischem Kern wurden gewählt, weil sie dem System mehr Flexibilität bei der Partikelhandhabung verleihen. Als nächstes wurden Aminogruppen durch Kondensation von 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) kovalent an die äußere Oberfläche gebunden, was zu **MMRA** führte, bevor das Penicillin-selektive Aptamer, $\text{COOH-C10-5'-TTT TCT GAA TTG GAT CTC TCT TCT TGA GCG ATC TCC ACA-3'}$,^[38] kovalent durch eine Aktivester-Methode über seine terminale Carbonsäuregruppe an die Aminogruppen von **MMRA** gebunden wurde (siehe Abschnitt 3 in den Hintergrundinformationen).

Das Vorhandensein der mesoporösen Struktur von **MM** wurde durch Stickstoffadsorptions-Desorptions-Isothermen,



Schema 1. (a) Steuerungsmechanismus des gAID-Systems, wie im Text beschrieben. Zum besseren Verständnis sind die relevanten Dimensionen wie folgt: Länge des Aptamers mit 39 Nukleotiden = ca. 13 nm, Porendurchmesser = 2.4 nm (siehe Text), Wandstärke = ca. 2.2 nm (siehe Text), Länge der APTES-Gruppe = ca. 0.45 nm, Durchmesser von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ = ca. 1.2 nm, Verhältnis der Oberflächenbedeckung von Aptamer zu APTES = ca. 1:1000 (Tabelle S1). (b) Präparationsablauf (1–3) und Funktionsweise (3,4) des gAID-Systems. 1) Laden von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ in die Mesoporen. 2) Funktionalisierung der äußeren Oberfläche mit APTES-Einheiten. 3) Kovalentes Anbinden einer Aptamer-Einheit über ihren am 5'-Terminus angebrachten 1-Carboxy-Decyl-Linker an die Oberfläche mittels EDC/NHS-Kopplungschemie. 4) Bei Anwesenheit von Penicillin faltet sich das Aptamer zusammen und der Analyt wird in der dafür vorgesehenen Bindungstasche gebunden, wodurch die Farbstoffe freigesetzt werden. Da jedes Aptamer nur über eine kovalente Bindung, aber mehrere nicht-kovalente Wechselwirkungen an die Partikeloberfläche gebunden ist, faltet sich das Aptamer immer dann, wenn sich ein Analytmolekül nähert und an sein entsprechendes Bindungsmotiv bindet, zusammen, die Bindungstasche schließt sich und das Aptamer gelangt in eine Konformation, in der minimale elektrostatische Wechselwirkungen mit Oberflächen-APTES-Gruppen auftreten können. Die Pore ist offen.

Klein- und Weitwinkel-Röntgenstreuung (SAXS/WAXS), Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestätigt. REM- und TEM-Aufnahmen zeigten, dass die präparierten Nanopartikel **MM** kugelförmig mit Radien zwischen 70–110 nm sind, d.h., mit einer durchschnittlichen Größe von 205 ± 34 nm Eisenoxid-Nanopartikel (**IO-NPs**) mit Durchmessern von 6.5 ± 1.1 nm einkapseln. Darüber hinaus wurden die spezifische Oberfläche ($1009 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), der Porendurchmesser (2.4 nm) und das Porenvolumen ($0.67 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) durch porosimetrische Untersuchungen und Auswertung des Adsorptionszweiges der Isotherme gemäß den Modellen von Barrett-Joyner-Halenda (BJH) und Brunauer-Emmett-Teller (BET) bestimmt. SAXS-Messungen lieferten den Gitterzellenparameter (4.59 ± 0.06 nm), der zusammen mit der Porengröße eine Abschät-

zung der Wandstärke auf 2.18 nm ermöglichte (siehe Abschnitt 4 in den Hintergrundinformationen). Die jeweiligen Gehalte an APTES und $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ auf und im Material wurden aus Elementaranalyse, Thermogravimetrie und spektrophotometrischen Messungen auf 1.03 bzw. 0.26 mmol g^{-1} Feststoff für **MMRA** bestimmt. Die erfolgreiche Kondensation des Aptamers wurde durch Zetapotential- und STEM-EDX-Messungen nachgewiesen. Letztere zeigten eine Erhöhung des Phosphor- und Schwefelgehalts des Materials. Der Aptamer-Gehalt wurde spektrophotometrisch durch eine Standardadditionsmethode und Messung der Absorptionzunahme bei 260 nm bestimmt, was einen Gehalt von $0.7 \pm 0.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ Feststoff ergab. Dieser Betrag entspricht einer Kopplungseffizienz von ca. 70% des während der Synthese zugegebenen Aptamers (siehe Abschnitt 4 in

den Hintergrundinformationen). Zetapotentialmessungen wurden in Wasser und Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt (Wasser bei pH 7; MES 100 mM, pH 5; PB 10 mM, pH 8), wobei alle eine negative Verschiebung des Zetapotentials nach kovalenter Anbindung der Aptamer-Einheiten an die Oberfläche von **MMRAA** (Verschiebung von ca. 40 mV in beiden gepufferten Medien; 80 mV in Wasser) aufgrund der Reduktion der positiven Nettoladung der aminierten Partikel zeigten. Letzteres umfasst die Bildung kovalenter Amidbindungen sowie die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Phosphatgruppen des Aptamer-Rückgrats mit den überschüssigen Aminogruppen in ihrem protonierten Ammoniumzustand auf der Oberfläche. Nach Zugabe von 2 ppm Penicillin wurde bei neutralem pH-Wert eine geringfügige Verschiebung zu weniger negativen Zetapotential-Werten beobachtet (Verschiebung von ca. +4 mV in PB 10 mM; +15 mV in Wasser), was der Bindung an das Aptamer zugeschrieben wird, die eine Konformationsänderung hervorruft, welche wiederum zum Aufbrechen der nicht-kovalenten Wechselwirkungen und einer Faltung des Aptamers im Komplex führt, wodurch die Pore geöffnet wird.

Um zu beurteilen, ob die optimierte Menge an Co-Reaktand für die beste Leistung des gAID-Systems unter realistischen Bedingungen möglicherweise angepasst werden muss, wurde **MMRAA** getestet, indem das Material 5 min in Gegenwart und Abwesenheit von 1 ppm Penicillin in einer Mischung aus Puffer mit unterschiedlichen Mengen an Co-Reaktand (0.8–25 mM NBEA) und Milch (25 %) suspendiert wurde, wobei der pH-Wert kontrolliert werden sollte, da viele Aptamere ihre Integrität und ihr Bindungsverhalten nur bis ca. pH 9^[39] beibehalten und auf der anderen Seite die ECL-Emissionsausbeute von Ru(bpy)₃²⁺ bei pH 9 am höchsten ist (Abbildung S9). Abbildung 1 zeigt die emittierte ECL in Abwesenheit und in Gegenwart von Penicillin als Funktion der NBEA-Konzentration. Während $c_{\text{NBEA}} < 1.6 \text{ mM}$ kein signifikantes Signal hervorbringen konnten, wurde das Optimum wieder im Bereich von $3 \text{ mM} < c_{\text{NBEA}} < 6 \text{ mM}$ gefunden, woraufhin wir in den nachfolgenden Studien eine NBEA-

Konzentration von 5 mM einsetzen. Es sollte insgesamt beachtet werden, dass das Zusammenspiel von Elektrolytgehalt (Pufferkonzentration) und Co-Reaktand-Konzentration (der Co-Reaktand ist eine Base) für ein einwandfreies Funktionieren des Systems von entscheidender Bedeutung ist. Ein zu hoher Elektrolytgehalt könnte die nicht-kovalente Wechselwirkung von Aptamer und Oberflächen-Aminogruppen sowie die Komplexbildung beeinträchtigen^[40] und ein zu hoher oder zu niedriger pH-Wert würde diese Wechselwirkungen ebenfalls verstärken oder abschwächen (pK_a von APTES = 9.6),^[41] die das Diffundieren von Indikator aus den Poren in Abwesenheit des Analyten oder die Bindungskinetik beeinflussen würden.

Nachdem die chemischen Parameter des Assays in Suspension etabliert worden waren, wurde die Reaktionskinetik untersucht. Die Reaktionszeit ist ein wesentliches Merkmal jedes Schnelltests, da sie maßgeblich über die Akzeptanz beim Endanwender entscheidet. Die Experimente wurden wie zuvor erläutert durchgeführt, d. h., in gepufferter Lösung (10 mM PB, pH 8; 5 mM NBEA), die jeweils 25 % Kuhmilch enthielt. Abbildung S10a zeigt, dass die Anwesenheit von Penicillin die Öffnung der Poren mit anschließender Freisetzung von Ru(bpy)₃²⁺ induziert, während die Freisetzung in Abwesenheit des Analyten vernachlässigbar gering war und die Farbstofffreisetzung in der Größenordnung von mehreren Minuten erfolgte. Dies ist nicht sehr schnell, aber es ist zu beachten, dass sich die Reaktionskinetiken in Suspension in der Regel von denen auf Streifen unterscheiden, wobei letztere aufgrund des aktiven Transports in der lateralen Strömung oft schneller sind. Da nach 5 min ein zufriedenstellender Signalpegel erreicht war, fuhren wir mit diesem Timing fort. Die Kinetik wurde auch für verschiedene Penicillin-Mengen bei Endkonzentrationen zwischen 1 ppb und 10 ppm untersucht, was zeigt, dass sich die Reaktion mit der Analytkonzentration beschleunigt und damit auf eine Diffusionskontrolle solcher Assays in Suspension hinweist (Abbildung S10b).

Nach einem ähnlichen Verfahren wurde die Empfindlichkeit des Systems untersucht, indem die Farbstofffreisetzung aus **MMRAA** als Funktion der Penicillin-Konzentration nach 5 min Reaktionszeit sowohl durch ECL (Abbildung 2) als auch durch Fluoreszenz (Abbildung S11) aufgenommen wurde. In allen Fällen wurde eine Korrelation zwischen Farbstofffreisetzung und Analytkonzentration beobachtet, in Übereinstimmung mit Konformationsänderungen des oberflächengebundenen Aptamers nach Bindung von Penicillin unter Öffnung der Poren. Wenn die Dosis-Wirkungs-Kurven jedoch an eine vierparametrische logistische Funktion angepasst werden,^[42] wurde für ECL eine höhere Empfindlichkeit als für Fluoreszenz gefunden, mit Nachweisgrenzen (LODs) von $0.18 \pm 0.07 \mu\text{g l}^{-1}$ sowie $0.42 \pm 0.10 \mu\text{g l}^{-1}$ bei ECL mit dem Smartphone sowie der spectraECL-Zelle und $3.1 \pm 0.4 \mu\text{g l}^{-1}$ bei Verwendung eines Fluorometers (Abbildung S11). Dieser Unterschied von ca. einer Größenordnung wird vorläufig der Streuung von im Medium enthaltener Milch zugeschrieben, die die Fluoreszenzmessungen beeinflusst. Wenn Penicillin im unteren ppb-Bereich (7 ppb) vorhanden war, wurde ein Verstärkungsfaktor von 120 freigesetzten Molekülen Ru(bpy)₃²⁺ pro gebundenem Molekül Penicillin in der Probe geschätzt.

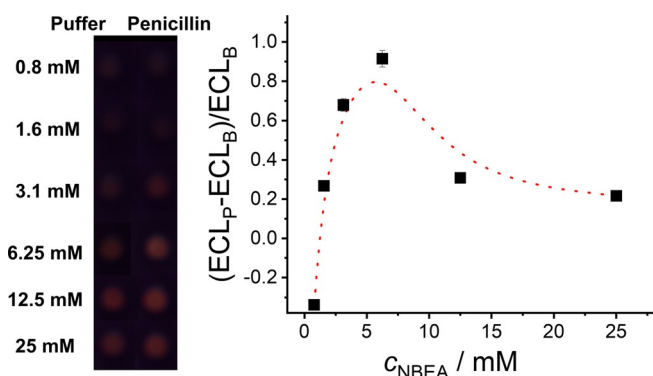


Abbildung 1. Links: Fotos, die das ECL-Signal von Ru(bpy)₃²⁺ zeigen, das von **MMRAA** in den Überstand in Abwesenheit und Gegenwart von 1 ppm Penicillin als Funktion der Konzentration an Co-Reaktand freigesetzt wird ($c_{\text{NBEA}} = 0.8\text{--}25 \text{ mM}$.) in PB (10 mM, pH 8) mit 25 % Milch. Die Fotos wurden während des Anlegens von 1.1 V für 10 s bei Amperometrie-Messungen aufgenommen. Rechts: Auftragung des entsprechenden ECL-Signals als Funktion der NBEA-Konzentration. Die Linie ist nur eine Orientierungshilfe.

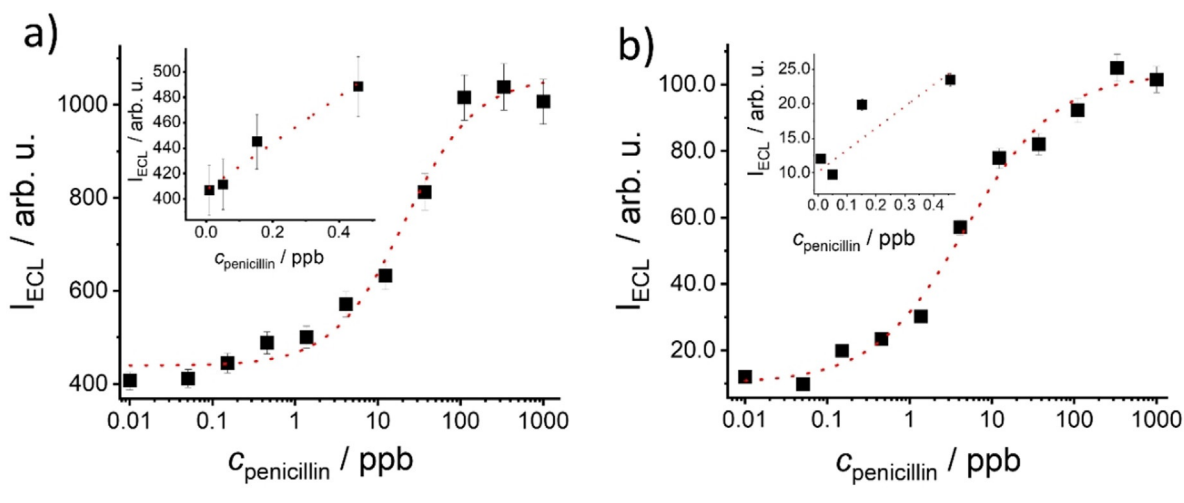


Abbildung 2. ECL-Signal von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ freigesetzt aus **MMRAA** als Funktion der Penicillin-Konzentration in gepufferter Milch (PB, 10 mM, pH 8; NBEA, 5 mM; 25% Kuhmilch) nach 5 min Reaktion gemessen mit a) der spectraECL-Zelle und b) dem Smartphone-Setup. Die Linien veranschaulichen vierparametrische logistische Anpassungen. Einschub: Vergrößerung der jeweiligen Regionen mit niedriger $c_{\text{penicillin}}$.

Bei Mengen von 1 ppb Penicillin wurde ein Verstärkungsfaktor von 350 erhalten.

Mit dem Ziel, unsere Theorie des Sensormechanismus zu untermauern, bei dem das Aptamer im geschlossenen Zustand des gAID-Systems in offener Form vorliegt und die Poren durch Wechselwirkung mit einem Überschuss an funktionellen Aminogruppen auf der Oberfläche verschließt, wurden zwei Kontrollmaterialien **MMRAAc** und **MMRCA** hergestellt. Für **MMRAAc** wurde eine Mischung aus zwei verschiedenen Oligonukleotiden auf die Oberfläche von **MMRA** gebunden, das für **MMRAA** verwendete Aptamer und eine kurze c-DNA, $\text{COOH-C10-5'-TTT TGT GGA GAT C-3'}$, die teilweise komplementär zur Sequenz des Penicillin-Aptamers ist (Schema S1c, S2). Bei Verwendung einer 1:1-Mischung von Aptamer und c-DNA wurde erwartet, dass das Aptamer (teilweise) mit der kurzen c-DNA hybridisiert, wodurch das Entweichen des Farbstoffs durch Basenstrangpaarung statt durch elektrostatische Wechselwirkung mit Oberflächen-Aminogruppen verhindert wird. Kinetische Kontrollexperimente zeigten eine nahezu identische Freisetzung des Farbstoffs für **MMRAA** und **MMRAAc** in Abwesenheit des Analyten, jedoch führte die Anwesenheit von Analyt zu einer langsameren und geringeren Freisetzung von **MMRAAc** im Vergleich zu **MMRAA** (Abbildung S12a). Wenn **MMRAAc** mit unterschiedlichen Penicillin-Konzentrationen ähnlich wie **MMRAA** behandelt wurde, wurde auch eine Farbstofffreisetzung in Abhängigkeit von $c_{\text{penicillin}}$ beobachtet. Die Empfindlichkeit von **MMRAAc** war jedoch ca. eine Größenordnung geringer als die von **MMRAA** ($\text{LOD} = 24 \pm 6$ ppb, Abbildung S13). Diese verringerte Sensitivität wird einer stärkeren Konkurrenz um das Aptamer zugeschrieben, d. h., sobald der kurze c-DNA-Strang am Aptamer hybridisiert hat, ist die Bindung von Penicillin erschwert.

Für das zweite Kontrollmaterial **MMRCA** wurde das Aptamer mit einer Aminogruppe am 5'-Terminus (anstelle von COOH wie bei **MMRAA** und **MMRAAc**) auf die Oberfläche von **MMRC** gebunden, die durch Behandlung von **MMRA** mit Bernsteinsäureanhydrid umfunktionalisiert

wurde, wodurch die Oberflächen-Amino- größtenteils in -Carbonsäure-Gruppen umgewandelt wurden (Schema S2). Das Ziel bestand darin, unsere Überlegungen zum nicht-kovalenten Verschluss der Poren durch elektrostatische Anziehung zwischen Oberflächen-Ammoniumgruppen und Phosphatgruppen am Aptamer-Rückgrat im Umkehrschluss zu beweisen, denn bei einer Carboxylat-reichen Oberfläche wurde erwartet, dass der Porenverschluss durch das anionische Phosphat-Rückgrat des auf **MMRC** gebundenen Aptamers in **MMRCA** weitaus weniger effizient ist. Bereits während der Herstellung wurde beim Waschen von **MMRCA** deutlich mehr Farbstoff freigesetzt als bei **MMRAA** oder **MMRAAc**, was darauf hindeutet, dass die Poren nicht richtig verschlossen waren. Darüber hinaus wurde in Bindungsstudien für **MMRCA** eine höhere Farbstofffreisetzung im Vergleich zu **MMRAA** oder **MMRAAc** in Abwesenheit des Analyten und eine viel geringere Freisetzung in Gegenwart des Analyten beobachtet, was darauf hindeutet, dass auch der Verschluss-Mechanismus nicht effizient war (Abbildung S12b). Zetapotential-Messungen der Kontrollmaterialien unterstützten diese Beobachtungen (Abbildung S4).

Während für **MMRAA** und **MMRAAc** negative Verschiebungen des Zetapotentials um ca. 75 mV und 85 mV (in H_2O , pH 7) nach kovalenter Anbindung des Aptamers bzw. der Aptamer/c-DNA-Einheiten an der Oberfläche von **MMRA** beobachtet wurden, zeigte **MMRCA** eine Verdrängung von nur ca. -40 mV bezüglich **MMRC**, vermutlich, weil die Konjugation eines Aptamers 39 Phosphatgruppen pro Carboxylat-Ankergruppe einführte und nicht wegen der Abschirmung durch nicht-kovalente Wechselwirkungen. Die Wirkung des Analyten war ebenfalls unterschiedlich, d. h., die kleinsten Änderungen des ZetaPotentials traten bei **MMRCA** auf, was zeigt, dass die Bindung von Penicillin durch das Aptamer eine Konformationsänderung und Porenöffnung für **MMRAA** und **MMRAAc** jedoch nicht für **MMRCA** erzeugt.

Nachdem wir das Nachweisverhalten in Lösung etabliert hatten, unternahmen wir den nächsten Schritt in Richtung

Anwendung und integrierten die Hybridpartikel in modifizierte Glasfaserstreifen. Basierend auf früheren Arbeiten, in denen wir gezeigt haben, dass die chemische Funktionalisierung einer Teststreifenmatrix die Assayleistung signifikant verbessern kann,^[27a,43] wurde die Matrix in mehreren Zyklen durch die sterische Adsorption oder kovalente Verankerung von PEG- und N-Alkyldiethanolamin-Einheiten an den Fasern optimiert, um zum besten hier verwendeten Material zu gelangen. PEG-Einheiten bewahren die Stabilität des Sensormaterials **MMRAA** in der Papiermatrix und ermöglichen den Transport von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ durch eine Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkung des positiv geladenen Farbstoffs mit einer netto negativ geladenen Silanol- bzw. Silanolat-Oberfläche des Glasfaserpapiers, während die N-Alkyldiethanolamin-Gruppen das ECL-Signal des Farbstoffs verstärken. Dazu wurden zunächst Glasfaserpapiere (Fusion 5 grade, **GF**) durch Adsorption von NBEA- und PEG-Gruppen an die Membranen modifiziert, wodurch **(NP)GF**-Membranen erhalten wurden. Alternativ wurden N-(3-Triethoxysilylpropyl)diethanolamin (NPEAS) und 3-[Methoxy(polyethylenoxy)propyl]trimethoxysilan (PEGS) in Toluol kovalent auf **GF**-Membranen gebunden, wodurch die Membran **NPGF** erhalten wurde (siehe Abschnitt 6, Abbildungen S14–S16, Tabelle S4 in den Hintergrundinformationen).

Die Erhöhung der ECL-Effizienz der modifizierten Papiere wurde untersucht, in dem 2.5 μl $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Lösung (1.2 mM) ca. 7 mm vom unteren Rand des Teststreifens aufgetragen wurden und der Streifen für 2 min in 300 μl einer Lösung von PB 10 mM (pH 8) oder PB 10 mM, die NBEA (25 mM) enthält, eingetaucht wurde, bevor die ECL- sowie die Fluoreszenzemission des freigesetzten $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ in Zone B gemessen wurden (Abbildung 3). Wie in Abbildung 3a,b zu sehen ist, wurde $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ lediglich an den Membranen stark adsorbiert, die keine Modifikation (**GF**) oder NBEA- und PEG-Einheiten sterisch adsorbiert (**(NP)GF**) enthielten. Im Gegensatz dazu wurde $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ weitaus weniger zurückgehalten, wenn NPEAS und PEGS kovalent an die Membranen (**NPGF**) gebunden wurden. Interessanterweise wurde in beiden Fällen für die kovalent funktionalisierten Streifen **NPGF** weniger Fluoreszenz beobachtet. Abbildung 3c zeigt die entsprechende ECL-Emission, die für drei unterschiedliche Streifen mit PB (10 mM) bzw. PB (10 mM) mit NBEA (25 mM) gemessen wurde. Der Signalanstieg von **GF** über **(NP)GF** zu **NPGF** ist offensichtlich, und insbesondere für **NPGF** wurde eine vielversprechend starke rötlich-orange ECL beobachtet, die hinsichtlich Handhabung und Messungen vor Ort von Vorteil ist. Darüber hinaus konnten sowohl die Anwesenheit von NBEA und PEG, die in **(NP)GF** adsorbiert sind, als auch die Anwesenheit von NPEAS und PEGS, die auf **NPGF** gebunden sind, die ECL-Effizienz erhöhen. Des Weiteren wurde in beiden Fällen eine weitere Verstärkung beobachtet, wenn NBEA auch in Lösung verwendet wurde (Abbildung 3c, Beispiele 2, 3). Somit wurden in den folgenden Experimenten **NPGF**-Membranen verwendet, die kovalent gebundene NPEAS- und PEGS-Einheiten enthielten.

Um die Leistungsfähigkeit über eine bessere Kontrolle des Flusses zu erhöhen, wurden hydrophobe Wachsmuster

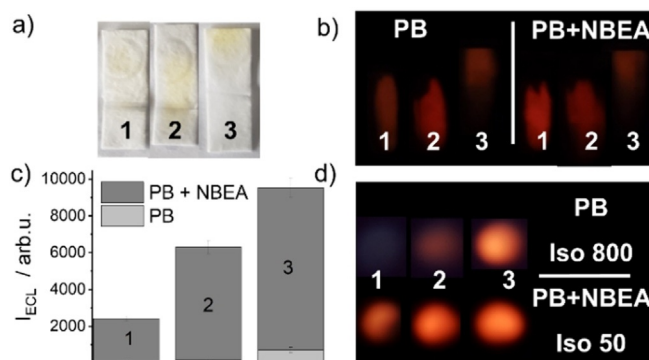
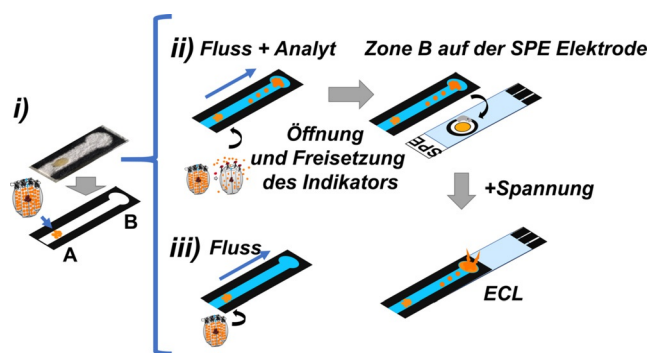


Abbildung 3. Aufnahmen unter a) normalem Tageslicht und b) LED-Anregung in einem 3D-gedruckten Halter aus unmodifizierten Glasfaserstreifen **GF** (1), **(NP)GF** (2) und **NPGF** (3). c) ECL-Signal von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, gemessen für die Streifen nach ihrer Entwicklung und Platzierung auf einer AT250-SPE-Elektrode, entweder unter Verwendung von PB (10 mM, „PB“) oder PB (10 mM) und NBEA (25 mM; „PB + NBEA“) als mobiler Phase mit der spectraECL-Zelle; Membrannummerierung wie in a,b). d) ECL-Bilder der entsprechenden Membranen, aufgenommen mit dem Smartphone-Setup (Nummerierung wie in a,b), ebenfalls nach der Entwicklung in PB oder PB + NBEA (siehe a,b) als mobiler Phase. Es ist zu beachten, dass bei Anwesenheit von NBEA der ISO-Wert ca. 16× reduziert wurde, um eine Sättigung des ECL-Signals auf den Fotos zu vermeiden.

durch Laminieren der gedruckten Muster auf Aluminiumfolie auf die **NPGF**-Membranen gedruckt. Das Aushärten der Streifen bei 110 °C für 1 h führte zu einem Einschmelzen des Wachses in die Membran, wodurch sich die Muster über die gesamte Dicke des Papiers einprägten. Das Sensormaterial **MMRAA** wurde dann auf die **NPGF**-Streifen aufgetragen, indem 5 μl einer Lösung von **MMRAA** in PB (2 mg ml⁻¹) in der Interaktionszone (Zone A) des Streifens, die ca. 5 mm von einem Ende des Streifens entfernt ist (Schema 2; siehe Abschnitt 6 in den Hintergrundinformationen), appliziert wurden. Die Membranen wurden mit einem Lichtmikroskop und mit REM analysiert, wobei gezeigt wurde, dass der Einbau von PEGS- und NPEAS-Gruppen und die anschließende Imprägnierung mit Wachs zu einer Expansion der Fasern führte (Abbildung S15a). Energiedispersive Röntgenspek-



Schema 2. Aufbau und Funktionsweise des LFA. i) Zusammensetzung der Streifen, die **MMRAA** in Zone A enthalten, und Arbeitsprinzip der Farbstofffreisetzung aus **MMRAA** in ii) der Anwesenheit und iii) der Abwesenheit des Analyten. Die Platzierung der Membran mit Zone B auf der Elektrode ist ebenfalls schematisch gezeigt. In Gegenwart eines Analyten wird beim Anlegen einer Spannung im Elektrodenbereich eine ECL-Emission erzeugt.

troskopie (EDX), Thermogravimetrie (TGA) und Elementaranalyse (EA) wurden durchgeführt, um die Mengen an PEGS- und NPEAS-Gruppen qualitativ abzuschätzen. Eine Zunahme des Massenverlusts von 6.7% für **NPGF** im Vergleich zu reinen **GF**-Membranen wurde durch TGA gefunden (siehe Abschnitt 6 in den Hintergrundinformationen). Darüber hinaus stimmte dieses Ergebnis gut mit der EA überein, die Mengen an PEGS- und NPEAS-Gruppen von 0.14 ± 0.02 und $0.09 \pm 0.01 \text{ mmol g}^{-1}$ Glasfasermembran lieferte, was einem Gesamtmassenverlust von 7.1% entspricht. Das Layout der Sensormembranen basierte auf Designs, über die wir kürzlich für gAID-basierte Lateral-Flow-Assays (LFAs) berichtet haben,^[27b,29] die zwei verschiedenen Zonen enthalten, eine Zone A, in der das Sensormaterial aufgetragen wird, und eine Zone B, in der sich die freigesetzten Indikatoren nach dem Wandern mit der Lösungsmittelfront am gegenüberliegenden Ende des Streifens sammeln. Die chemische Erkennung des Analyten erfolgt in Zone A und das ECL-Signal wird in Zone B gemessen (Abbildung 4a). Wenn der Streifen in eine Lösung getaucht wird, die keinen Analyten enthält, wird kein Farbstoff freigesetzt und in Zone B wird kein Signal detektiert, da **MMRAA** verschlossen bleibt. Bei Anwesenheit des Analyten in der Probe wird in Zone B ein Signal proportional zur Analytkonzentration detektiert, da sich Aptamer-Einheiten auf der Oberfläche umlagern und Farbstoffmoleküle freigesetzt werden. Die viel größeren **MMRAA**-Partikel verbleiben an der Auftragsstelle. Dadurch kann die ECL (bzw. die Fluoreszenz) der freigesetzten Reporter-moleküle mit der Kamera eines Smartphones quantifiziert werden, wenn dieses mit entsprechendem miniaturisiertem Zubehör ausgestattet ist. Darüber hinaus wurden die Streifen auch mit der spectraECL-Zelle ausgewertet, um die ECL-Spektren zu überprüfen.

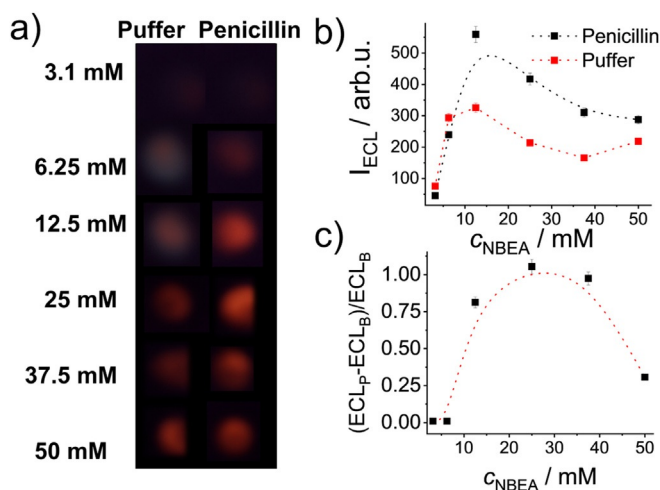


Abbildung 4. a) Fotos des ECL-Signals von Ru(bpy)₃²⁺ in der Nachweiszone B in Abwesenheit und Gegenwart von 1 ppm Penicillin als Funktion der Konzentration an Co-Reaktand ($c_{\text{NBEA}} = 3.1\text{--}50 \text{ mM}$) in der Kitlösung (PB 10 mM, pH 8) und einer Milchprobe im Verhältnis 3 + 1. Bilder wurden nach dem Anlegen von 1.1 V für 10 s im amperometrischen Modus registriert. b) Auftragung des integrierten ECL-Signals als Funktion von c_{NBEA} . c) Entsprechendes Diagramm der ECL-Verstärkung in Gegenwart von 1 ppm Penicillin (ECL_p) relativ zur ECL in Abwesenheit von Penicillin (ECL_B).

Wie bei **MMRAA** in Suspension musste die optimale Menge an Co-Reaktand für eine Eintauchzeit von 2 min gefunden werden, welche einen optimalen Kontrast ergibt (Abbildung S17). Abbildung 4 zeigt das entsprechende rötlich-orange ECL-Licht, das in Abwesenheit und Anwesenheit von Penicillin als Funktion der NBEA-Konzentration emittiert wird. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die in Suspension beobachtet wurden, wurde in den Papierexperimenten ein Quenching-Effekt erst bei viel höheren $c_{\text{NBEA}} > 25 \text{ mM}$ gefunden. Auch bessere Signal-Rausch-Verhältnisse wurden erst mit höheren Mengen an Co-Reaktand in der Lösung ($12.5 \text{ mM} < c_{\text{NBEA}} < 37.5 \text{ mM}$) erhalten. Auf dem Streifen induzierten geringere Mengen an NBEA (3–6 mM) nur ein mäßiges ECL-Signal; noch höhere Mengen (50 mM) führten dann auch in Abwesenheit des Analyten zu einer starken Freisetzung. Gemäß Abbildung 4 wurden 25 mM NBEA für weitere Studien ausgewählt. Dass die Signallöschung nur bei höheren NBEA-Konzentrationen auf dem Teststreifen im Vergleich zur Lösung auftritt, wird auf die Vorkonzentration des freigesetzten Farbstoffs in Zone B und auf ein teilweises Zurückhalten des Co-Reaktanden in der Fasermatrix selbst zurückgeführt. Um die Durchführung des Assays einfach zu halten, muss NBEA zusammen mit dem Puffer in einem einzigen Probenvorbereitungsschritt bereitgestellt werden, d. h., in einer 1 + 3-Verdünnung der Probe, so dass die Verwendung höherer Konzentrationen an NBEA erforderlich ist. Eine weitere Lösung zu pipettieren, um NBEA direkt auf Zone B aufzutragen, war für uns keine Option. Aufgrund des erheblich höheren Konzentrationsoptimums von NBEA für die Streifenexperimente wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Leistungsfähigkeit von **MMRAA@NPGF** untersucht, wobei 25 mM NBEA in Lösung pH 9 entsprachen, siehe oben. Auf dem Streifen mit seinen beschichteten Fasern kann der mikroskopische pH-Wert abweichen oder das Material kann eine gewisse Pufferwirkung haben. Da der pH-Wert in den Streifen jedoch schwer zu messen ist, wiederholten wir den Streifentest wie zuvor beschrieben für Eintauchlösungen mit unterschiedlich eingestellten pH-Werten im Bereich von 7.0–9.6 in Gegenwart und Abwesenheit von 250 ppb Penicillin in verdünnter Milch (Abbildung S18). Es wurde festgestellt, dass die Streifen zwischen pH 8.5–9.0 die besten und stabilsten Ergebnisse zeigten. Während das Verhalten zwischen pH 7.0–9.0 in erster Linie durch die ECL-Effizienz von Ru(bpy)₃²⁺ bestimmt zu sein scheint (siehe auch Abbildung S9), deutet das starke Hintergrundsignal in Abwesenheit des Analyten bei pH 9.6 darauf hin, dass der Verschluss der Poren nicht mehr effizient genug ist, da zu wenige Oberflächen-Aminogruppen noch in ihrer protonierten Form vorliegen; der pK_a von APTES beträgt 9.6.^[41] Bis pH 9.0 scheint die Bindungseffizienz des Aptamers somit weitgehend unabhängig vom pH-Wert zu sein.

Als nächstes wurde die Empfindlichkeit von **MMRAA@NPGF** im Assay bestimmt, indem Streifen in 300 µl gepufferte Lösungen (PB, 10 mM, pH 8; NBEA, 25 mM) getaucht wurden, die 25% Milch und, wie zuvor beschrieben, verschiedene Mengen an Penicillin enthielten. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, wurde in beiden Fällen bei ECL- und Fluoreszenzdetektion eine Zunahme der Farbstofffreisetzung in Abhängigkeit von der Penicillin-Konzentration beobachtet.

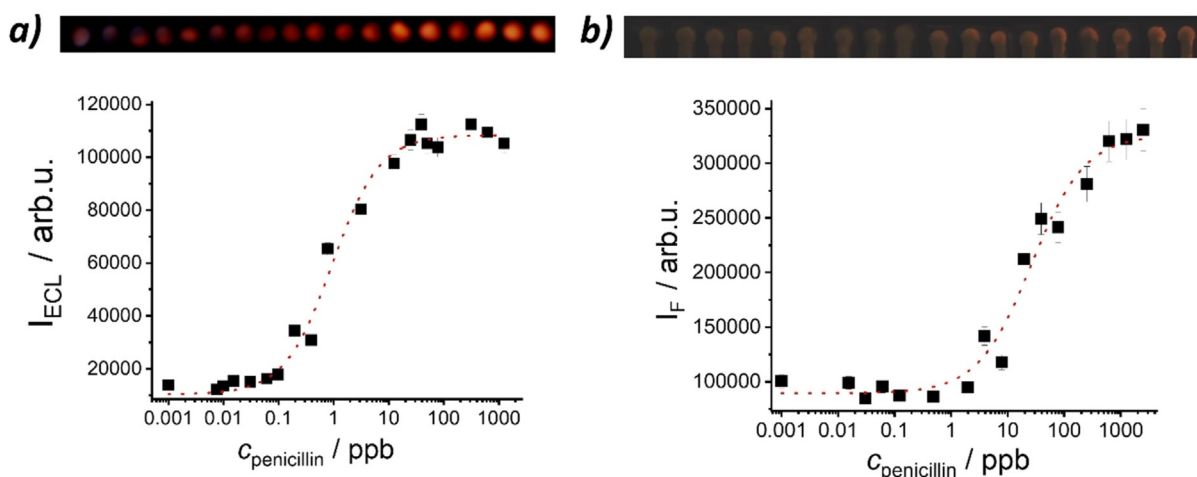


Abbildung 5. a) Integrierte Lichtdichte von $Ru(bpy)_3^{2+}$, freigesetzt aus **MMRAA** als Funktion der Penicillin-Konzentration in 1 + 3 mit Puffer verdünnter Milch (PB, 10 mM, pH 8; NBEA, 25 mM) auf **NPGF**-Streifen nach 2 min Reaktion und gemessen mit dem Smartphone für a) ECL oder b) Fluoreszenz. Die Linien veranschaulichen vierparametrische logistische Anpassungen. Oben: Entsprechende Bilder, die für die Datenerfassung analysiert wurden (ansteigende Analyt-Konzentration von links nach rechts). Bei b) wurde die Helligkeit zur besseren Visualisierung um 15% gegenüber den Originalbildern erhöht.

tration beobachtet. Wenn jedoch integrierte Dichtewerte gegen $c_{penicillin}$ aufgetragen wurden, wurde eine höhere Empfindlichkeit für ECL im Vergleich zur Fluoreszenz gefunden, wobei Quantifizierungsbereiche von 0.2–3.7 ppb und 6–119 ppb sowie LODs von $0.05 \pm 0.01 \mu g l^{-1}$ und $3.1 \pm 0.7 \mu g l^{-1}$ für die ECL- bzw. Fluoreszenzmessungen erreicht wurden. Darüber hinaus übertraf ECL nicht nur die Fluoreszenz erneut, sondern die Empfindlichkeit auf Papier war auch gegenüber dem gAID-System in Suspension verbessert. Ein Vergleich der Bilder in Abbildung 5,a,b zeigt zudem, dass die Verwendung einer Elektrode zur Anregung zu einem homogenen punktförmigen Signal führt.

Um die Signalverstärkung in Suspension (siehe oben in Verbindung mit Abbildung 2) und auf den Streifen zu vergleichen, wurde das ECL-Signal von **MMRAA@NPGF** bei den beiden oben verwendeten unterschiedlichen Penicillin-Konzentrationen, 1 und 7 ppb, mittels einer Kalibrierungskurve, die durch Auftragen bekannter Mengen an $Ru(bpy)_3^{2+}$ auf **NPGF** und Messung der ECL unter identischen Bedingungen erstellt wurde, in eine $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Konzentration konvertiert. Die gefundenen Verstärkungsfaktoren für das gAID-System im LFA waren mit 400 bzw. 1600 Molekülen $Ru(bpy)_3^{2+}$, die im Durchschnitt pro Analyt-Molekül für $c_{penicillin} = 7$ ppb bzw. 1 ppb abgegeben wurden, ca. 4-fach höher als für den Assay in Suspension, was auf eine bessere Konzentration des Farbstoffs in der Nachweiszone zurückzuführen ist.

Schließlich wurden Kreuzreaktivitäten gegen andere Antibiotika untersucht, indem mehrere Proben mit 250 ppb Ampicillin, Amoxicillin, Enoxacin, Oxacillin, Cefazolin, Cefapirin, Sulfamethazin und Sulfathiazol mit den Streifen **MMRAA@NPGF** analysiert wurden (chemische Strukturen siehe Abbildung S19). Abbildung 6 zeigt, dass nur Penicillin den Indikator signifikant aus den Poren freisetzen konnte, wobei Enoxacin und Sulfathiazol eine geringe Kreuzreaktivität zeigten. Die anderen Antibiotika zeigten eine vernachlässigbare Farbstofffreisetzung, ähnlich des Hintergrundsi-

gnals des gAID-Materials, was gut mit der publizierten Selektivität des Aptamers übereinstimmt.^[38a]

Für den praktischen Nutzen sind die Reproduzierbarkeit des Materialherstellungsprozesses und die Langzeitlagerung des Materials entscheidend. **MMRAA** zeigte eine unveränderte Performanz in Suspension, wenn es 1 Monat lang bei 8°C im Kühlschrank unter normaler Atmosphäre gelagert wurde, bevor bei längerer Lagerung die Freisetzung von Farbstoff auch in Abwesenheit des Analyten anstieg. In Bezug auf die Reproduzierbarkeit erhöhte sich der Fehler von 6–8% bei Wiederholmessungen mit einer einzelnen Materialcharge auf 7–15% für Messungen mit unterschiedlichen Materialchargen, was für solch einfache Tests akzeptabel ist. Auch wenn Streifen mit aufgetragenem **MMRAA** ca. 3 Mo-

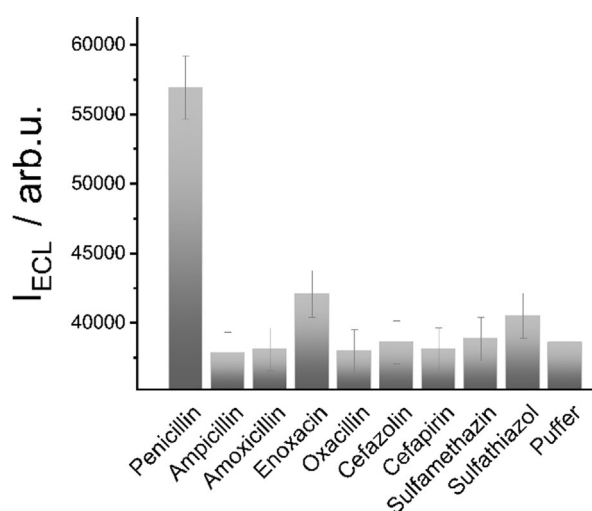


Abbildung 6. Integrierte Lichtdichte von $Ru(bpy)_3^{2+}$, freigesetzt aus **MMRAA** in Gegenwart der Antibiotika Ampicillin, Amoxicillin, Enoxacin, Oxacillin, Cefazolin, Cefapirin, Sulfathiazol und Sulfamethazin (250 ppb) in Puffer (PB 10 mM; NBEA 25 mM; 75%; pH 8) mit 25% Milch auf den Streifen nach 2 min Reaktion gemessen mit dem Smartphone im ECL-Modus.

nate unter gleichen Bedingungen wie oben gelagert wurden, zeigten sie eine gleichbleibende Performanz, bevor der Fluss bei längerer Lagerung langsamer wurde und Messfehler von ca. 5% für Wiederholmessungen mit zwei Streifen aus einer Charge bzw. von 6–12% bei Verwendung unterschiedlicher Chargen gefunden wurden. Bei einer Lagerung von ≥ 11 Monaten zeigte das System noch eine sehr gute Leistung bei nur leicht reduzierter Effizienz (LODs im unteren ppb-Bereich), wofür wahrscheinlich die Alterung der beschichteten Fasern und/oder Wachsbarrrieren verantwortlich ist. Da die allgemeine Leistungsfähigkeit jedoch unverändert bleibt, gehen wir vorläufig davon aus, dass die Stabilität des Materials sowie des fertigen Teststreifens bei einer Verpackung unter kA-Bedingungen (kontrollierte Atmosphäre) verbessert werden kann.

Zusammenfassung

Zusammenfassend berichtet die vorliegende Arbeit zum ersten Mal über die Synergismen, die durch die Kombination der elektrogenierten Chemilumineszenz (ECL)-Detektion auf papierbasierten Teststreifen mit Indikator-freisetzenden Materialien erzielt werden können. Im Sinne eines generischen Ansatzes wurden kovalent gebundene Aptamere für die Analyt-induzierte Freisetzung eines ECL-Reporters verwendet, was dem System eine hohe Robustheit verleiht, die die direkte Bestimmung von Penicillin in einer anspruchsvollen Matrix wie Milch ermöglicht. Der Assay ist durch schnelle Ansprechzeiten, gute Selektivität und außergewöhnliche Empfindlichkeit gekennzeichnet und erreicht eine Nachweisgrenze von 50 ± 9 ppt in einem LFA, der in < 5 min durchgeführt werden kann. Der Erkennungsmechanismus beruht auf der Faltung des Aptamers bei der Penicillin-Bindung, was zu einer Dissoziation nicht-kovalenter Wechselwirkungen führt, die die Poren ver- und den ECL-Farbstoff darin einschließen. Neben den intrinsischen Eigenschaften der chemischen Signalverstärkung von gAID-Systemen führte die Optimierung des ECL-Co-Reaktanden, der SPE-Elektrode und der Konzentrationen der Komponenten zu einem deutlichen Gewinn an Empfindlichkeit. Bei den Messungen mit Teststreifen konnte insbesondere die kovalente Modifikation der Papierfasern mit hydrophilen, aber ungeladenen PEG-Einheiten und die zusätzliche Immobilisierung von Co-Reaktand-Einheiten den Assay in Suspension über treffen. Im Vergleich zu anderen gAID-Systemen zur Detektion kleiner Moleküle schneidet der vorliegende Ansatz deutlich besser ab als z. B. Strategien, die eine Laborumgebung erfordern, und lediglich LODs wie 10.5 ppm für Adenosin erreichen.^[44] Selbst der empfindlichste laborbasierte gAID-Assay für Thrombin mit einer LOD von 0.13 ppb erfordert eine Analysezeit von > 120 min.^[45] Unser System übertrifft auch andere papierbasierte ECL-Assays mit Auslesung über mobile Kommunikations- und andere tragbare Geräte, da er um viele Größenordnungen empfindlicher ist.^[46] Darüber hinaus sind kommerziell erhältliche Lateral-Flow-Tests für Penicillin oder andere Antibiotika, die auf der Aggregation von Goldnanopartikeln beruhen, ebenfalls auf eine ppb-Sensitivität beschränkt.^[47] Bedenkt man, dass in der Li-

teratur über eine große Zahl von Aptameren für andere Arten von Analyten berichtet worden ist, lässt sich dieses Konzept leicht verallgemeinern, was es für die Point-of-Care-Diagnostik, Umweltanalytik oder die Analyse illegaler Drogen sehr attraktiv macht. Wie wir kürzlich demonstriert haben,^[29] birgt der Ansatz an sich ein enormes Potenzial für die simultane Bestimmung einer geringen Zahl an Zielanalyten (Multiplexing), was im konkreten Fall Fortschritte im Elektrodendesign und Reporterdesign erfordern würde, die derzeit in unserem Labor erforscht werden. Der erfolgreiche Nachweis von Penicillin in Milch legt nahe, dass solche Assays tatsächlich eine breite Anwendbarkeit haben können, insbesondere für komplexe realistische Matrices.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; CL 761/1–19) für finanzielle Unterstützung. Wir danken K. Gawlitza (Fachbereich Chem. Opt. Sens., BAM) für EDX- und TEM-Bilder, C. Tobias (Fachbereich Chem. Opt. Sens., BAM) und S. Benemann (Fachbereich Oberflächenanalytik und Grenzflächenchemie, BAM) für REM-Aufnahmen, G.J. Smales und B.R. Pauw (Fachbereich Synthese und Streuverfahren nanostrukturierter Materialien, BAM) für SAXS/WAXS-Messungen, A. Zehl (Humboldt-Universität Berlin) für Elementaranalyse, A. Zimathies (Fachbereich Strukturanalytik, BAM) für N_2 -Adsorptions-/Desorptionsmessungen, J. Bell (Fachbereich Chem. Opt. Sens., BAM) für Hilfe bei der Herstellung des Smartphone-Zubehörs, M. Grüneberg (Fachbereich Chem. Opt. Sens., BAM) für TGA-Messungen und S. Höfs (Fachbereich Umweltanalytik, BAM) für Diskussionen über Elektrochemie. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Elektrochemilumineszenz · Hybridmaterialien · Penicillin · Signalverstärkung · Teststreifenanalyse

- [1] a) G. Guglielmi, *Nature* **2021**, *590*, 202–205; b) R. Rubin, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *324*, 1813–1815.
- [2] a) C. A. Hermann, A. Duerkop, A. J. Baeumner, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 569–587; b) M. J. Raeisossadati, N. M. Danesh, F. Borana, M. Gholamzad, M. Ramezani, K. Abnous, S. M. Taghdisi, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 235–246.
- [3] a) P. Baldi, N. La Porta, *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 570862; b) A. Cassidy, E. Mullins, R. O’Kennedy, *Biotechnol. Adv.* **2020**, *39*, 107358.
- [4] a) C. Pöhlmann, T. Elßner, *Toxins* **2020**, *12*, 727; b) M. Philp, S. L. Fu, *Drug Test. Anal.* **2018**, *10*, 95–108.
- [5] a) P. Namour, M. Lepot, N. Jaffrezic-Renault, *Sensors* **2010**, *10*, 7947–7978; b) G. Alberti, C. Zanoni, L. R. Magnaghi, R. Biesuz, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 8331.
- [6] a) L. M. Hillscher, V. J. Liebich, O. Avrutina, M. Biesalski, H. Kolmar, *ChemTexts* **2021**, *7*, 14; b) A. T. Singh, D. Lantigua, A.

- Meka, S. Taing, M. Pandher, G. Camci-Unal, *Sensors* **2018**, *18*, 2838; c) A. Merkoçi, in *Comprehensive Anal. Chem.*, Bd. 89, 1. Aufl., (Hrsg.: A. Merkoçi), Elsevier, Amsterdam, Oxford, Cambridge, MA, **2020**, S. 478.
- [7] a) S. Smith, J. G. Korvink, D. Mager, K. Land, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 34012–34034; b) N. Jiang, N. D. Tansukawat, L. Gonzalez-Macia, H. C. Ates, C. Dincer, F. Güder, S. Tasoglu, A. K. Yetisen, *ACS Sens.* **2021**, *6*, 2108–2124.
- [8] S. Nishat, A. T. Jafry, A. W. Martinez, F. R. Awan, *Sens. Actuators B* **2021**, *336*, 129681.
- [9] A. García, M. M. Erenas, E. D. Marinetto, C. A. Abad, I. de Orbe-Paya, A. J. Palma, L. F. Capitan-Vallvey, *Sens. Actuators B* **2011**, *156*, 350–359.
- [10] A. Roda, E. Michelini, L. Cevenini, D. Calabria, M. M. Calabretta, P. Simoni, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7299–7304.
- [11] a) X. Ruan, Y. Wang, N. Cheng, X. Niu, Y.-C. Chang, L. Li, D. Du, Y. Lin, *Adv. Mater. Technol.* **2020**, *5*, 2000171; b) R. Marcinkowska, J. Namiesnik, M. Tobiszewski, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.* **2019**, *19*, 19–23.
- [12] I. in't Veen, A. Y. Majid, P. Pawelczak, in *2017 IEEE International Symposium on Dynamic Spectrum Access Networks (DySPAN)*, Baltimore, MD, **2017**, S. 1–2.
- [13] D. Quesada-González, A. Merkoçi, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 4697–4709.
- [14] E. Aydindogan, E. Guler Celik, S. Timur, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 12325–12333.
- [15] B. R. Sun, A. G. Zhou, X. Li, H.-Z. Yu, *ACS Sens.* **2021**, *6*, 1731–1744.
- [16] G. G. Morbioli, T. Mazzu-Nascimento, A. M. Stockton, E. Carriho, *Anal. Chim. Acta* **2017**, *970*, 1–22.
- [17] a) N. A. Taranova, A. N. Berlina, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 255–261; b) D. Wang, S. He, X. Wang, Y. Yan, J. Liu, S. Wu, S. Liu, Y. Lei, M. Chen, L. Li, J. Zhang, L. Zhang, X. Hu, X. Zheng, J. Bai, Y. Zhang, Y. Zhang, M. Song, Y. Tang, *Nat. Biomed. Eng.* **2020**, *4*, 1150–1158.
- [18] a) E. Solhi, M. Hasanzadeh, P. Babaie, *Anal. Methods* **2020**, *12*, 1398–1414; b) A. Yakoh, U. Pimpitak, S. Rengpipat, N. Hiran-karn, O. Chailapakul, S. Chaiyo, *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *176*, 112912.
- [19] a) C. Carrell, A. Kava, M. Nguyen, R. Menger, Z. Munshi, Z. Call, M. Nussbaum, C. Henry, *Microelectron. Eng.* **2019**, *206*, 45–54; b) A. E. Urusov, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, *Biosensors* **2019**, *9*, 89; c) W. Y. Lim, B. T. Goh, S. M. Khor, *J. Chromatogr. B* **2017**, *1060*, 424–442.
- [20] E. B. Bahadir, M. K. Sezginurk, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *82*, 286–306.
- [21] a) H. Qi, C. Zhang, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 524–534; b) M. Chen, Z. Ning, K. Chen, Y. Zhang, Y. Shen, *J. Anal. Test.* **2020**, *4*, 57–75.
- [22] J. L. Delaney, C. F. Hogan, J. Tian, W. Shen, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1300–1306.
- [23] a) S. R. Chinnadayaala, J. Park, H. T. N. Le, M. Santhosh, A. N. Kadam, S. Cho, *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 68–81; b) S. E. K. Kirschbaum, A. J. Baeumner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 3911–3926.
- [24] H. Wei, E. Wang, *Luminescence* **2011**, *26*, 77–85.
- [25] a) S. Han, W. Niu, H. Li, L. Hu, Y. Yuan, G. Xu, *Talanta* **2010**, *81*, 44–47; b) S. Kirschbaum-Harriman, A. Duerkop, A. J. Baeumner, *Analyst* **2017**, *142*, 2648–2653.
- [26] H. J. Kwon, E. C. Rivera, M. R. C. Neto, D. Marsh, J. J. Swerdlow, R. L. Summerscales, P. P. Tadi Uppala, *Results Chem.* **2020**, *2*, 100029.
- [27] a) E. Climent, R. Gotor, C. Tobias, J. Bell, P. M. Martin-Sanchez, K. Rurack, *ACS Sens.* **2021**, *6*, 27–34; b) E. Costa, E. Climent, S. Ast, M. G. Weller, J. Canning, K. Rurack, *Analyst* **2020**, *145*, 3490–3494; c) E. Climent, M. Hecht, H. Witthuhn, K. Gawlitza, K. Rurack, *ChemistryOpen* **2018**, *7*, 709–720; d) E. Climent, M. Biyikal, K. Gawlitza, T. Dropa, M. Urban, A. M. Costero, R. Martínez-Máñez, K. Rurack, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 11138–11142.
- [28] S. Sachi, J. Ferdous, M. H. Sikder, S. Hussani, *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **2019**, *6*, 315–332.
- [29] E. Climent, M. Biyikal, D. Gröninger, M. G. Weller, R. Martínez-Máñez, K. Rurack, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 23862–23869; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 24071–24078.
- [30] A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 537–550.
- [31] A. Ruscito, M. C. DeRosa, *Front. Chem.* **2016**, *4*, 14.
- [32] a) L. Farzin, M. Shamsipur, S. Sheibani, *Talanta* **2017**, *174*, 619–627; b) W. H. Zhou, R. Saran, J. W. Liu, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8272–8325.
- [33] Y. Zhang, B. S. Lai, M. Juhas, *Molecules* **2019**, *24*, 941.
- [34] F. Sancenón, L. Pascual, M. Oroval, E. Aznar, R. Martínez-Manez, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 418–437.
- [35] J. Lei, H. Ju, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2122–2134.
- [36] a) M. Oroval, E. Climent, C. Coll, R. Eritja, A. Avino, M. D. Marcos, F. Sancenón, R. Martínez-Manez, P. Amorós, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5480–5482; b) H. X. Tan, L. Ma, T. Guo, H. Y. Zhou, L. Chen, Y. H. Zhang, H. J. Dai, Y. Yu, *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1068*, 87–95; c) M. Oroval, C. Coll, A. Bernardos, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, D. G. Shchukin, F. Sancenón, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 11332–11336; d) À. Ribes, E. Xifré-Pérez, E. Aznar, F. Sancenón, T. Pardo, L. F. Marsal, R. Martínez-Máñez, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38649; e) C.-L. Zhu, C.-H. Lu, X.-Y. Song, H.-H. Yang, X.-R. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1278–1281.
- [37] E. Climent, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. Soto, A. Maquieira, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7281–7283; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7439–7441.
- [38] a) H. He, S.-Q. Wang, Z.-Y. Han, X.-H. Tian, W.-W. Zhang, C.-P. Li, M. Du, *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *531*, 147342; b) J. Zhao, W. J. Guo, M. S. Pei, F. Ding, *Anal. Methods* **2016**, *8*, 4391–4397; c) A. Mehlhorn, P. Rahimi, Y. Joseph, *Biosensors* **2018**, *8*, 54.
- [39] a) Y. Hu, A. Ceconello, A. Idili, F. Ricci, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15210–15233; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 15410–15434; b) A. Porchetta, A. Idili, A. Vallée-Bélisle, F. Ricci, *Nano Lett.* **2015**, *15*, 4467–4471.
- [40] T. Hianik, V. Ostatná, M. Sonlajtnerova, I. Grman, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 127–133.
- [41] M. Valtiner, X. Banquy, K. Kristiansen, G. W. Greene, J. N. Israelachvili, *Langmuir* **2012**, *28*, 13080–13093.
- [42] Y. Xiang, J. Donley, E. Seletskaja, S. Shingare, J. Kamerud, B. Gorovits, *AAPS J.* **2018**, *20*, 45.
- [43] R. Gotor, J. Bell, K. Rurack, *J. Mater. Chem. C* **2019**, *7*, 2250–2256.
- [44] J. Liu, D. He, Q. Liu, X. He, K. Wang, X. Yang, J. Shangguan, J. Tang, Y. Mao, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11707–11713.
- [45] X. Yang, A. Wang, J. Liu, *Talanta* **2013**, *114*, 5–10.
- [46] a) J. L. Delaney, E. H. Doeven, A. J. Harsant, C. F. Hogan, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *790*, 56–60; b) L. Chen, C. Zhang, D. Xing, *Sens. Actuators B* **2016**, *237*, 308–317; c) E. M. Gross, H. E. Durant, K. N. Hipp, R. Y. Lai, *ChemElectroChem* **2017**, *4*, 1594–1603.
- [47] a) AuroFlow™ BTS Combo Strip Test, <https://www.perkinelmer.com/de/product/auroflow-bts-combo-strip-test-96-strips-food-1116-01>, (accessed 30.06.2021); b) BetaStar Advanced for Beta-Lactams, <https://www.neogen.com/de/categories/dairy-residues/betastar-advanced-beta-lactams/>, (accessed 30.06.2021).

Manuskript erhalten: 10. August 2021

Veränderte Fassung erhalten: 2. September 2021

Akzeptierte Fassung online: 1. Oktober 2021

Endgültige Fassung online: 9. November 2021