

Freibewegliche Mikropartikel als Online-Biosensoren

Dr. Michael Himmelhaus, Dr. Lorena Tuchscher De Hauschopp, Dr. Tobias Schröter

FluIDect GmbH, Jena/Deutschland
Kontakt: info@fluidect.com

Einleitung

Biosensoren ermöglichen spezifische, schnelle und sensitive Messungen biologischer oder chemischer Substanzen in Bereichen wie Medizin, Umweltüberwachung und Lebensmittelindustrie (1-5). Klassische Biosensoren verfügen über biofunktionalisierte Oberflächen an einer den Analyten führenden Kanalwandung, durch die Bindungsereignisse in elektronisch verarbeitbare Signale umgewandelt werden können (Abb. 1 links). Dieses Konzept führt jedoch aufgrund der in mikrofluidischen Kanälen herrschenden laminaren Strömung zu Problemen mit unspezifischer Wechselwirkung und reduzierter Sensitivität.

Hier wird ein neuartiger Biosensor auf Basis von frei beweglichen, spezifisch funktionalisierten Mikropartikeln (μ Beads) vorgestellt, die ihre Ziele auf ihrer Oberfläche binden, während sie sich frei in der zu analysierenden Probe bewegen. Durch diese freie Bewegung sowie die schiere Zahl der eingesetzten μ Beads (typisch: einige Tausend) erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, die spezifischen Ziele zu treffen, während unspezifische Anbindung deutlich reduziert wird (Abb 1 rechts). Somit kann der Zustand des Analyten hinsichtlich der gesuchten Ziele auf einfache und schnelle Weise repräsentativ erfasst werden.

Methoden und Materialien

μ Beads

Bei den μ Beads handelt es sich um sphärische, fluoreszenzmarkierte Polymerpartikel mit Durchmessern zwischen etwa 6 und 12 μ m. Der eingebrachte Farbstoff wird dazu benutzt, im Innern der Partikel zirkulierende optische Resonanzen anzuregen, die sog.

„Whispering Gallery Modes“ (Abb. 2 links) (6-8). Diese erzeugen ein evaneszentes Feld in unmittelbarer Umgebung der Partikeloberfläche, so dass Bindungsereignisse, wie beispielsweise die Adsorption eines Proteins, über die dadurch erwirkte Änderung des Resonanzprofils des Partikels berührungslos optisch ausgelesen werden können (Abb. 2 Mitte/rechts). Ein auf der Mie-Theorie basierender numerischer Algorithmus wird auf die resultierenden Fluoreszenzspektren angewendet, um mögliche Bindungsereignisse an der Sensoroberfläche unabhängig von der μ Bead-Größe zu bewerten (Fluorescent Resonator Signature, FRS).

Um die gewünschte Spezifität in das Verfahren einzubringen, wird, wie bei anderen gängigen Biosensoren, beispielsweise der Oberflächenplasmonenresonanz oder der Quarz-Mikrowaage, die Oberfläche der μ Beads mit spezifischen Fängermolekülen funktionalisiert (Abb.3). In reichen Analyten, die eine Vielzahl von Proteinen enthalten, können zusätzliche Maßnahmen zur Unterdrückung unspezifischer Adsorption getroffen werden.

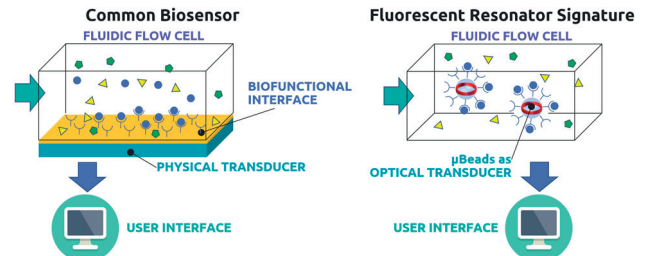


Abb. 1: Schematische Darstellung eines klassischen Biosensors (links) und frei beweglicher Mikropartikel (μ Beads) als Biosensoren (rechts).

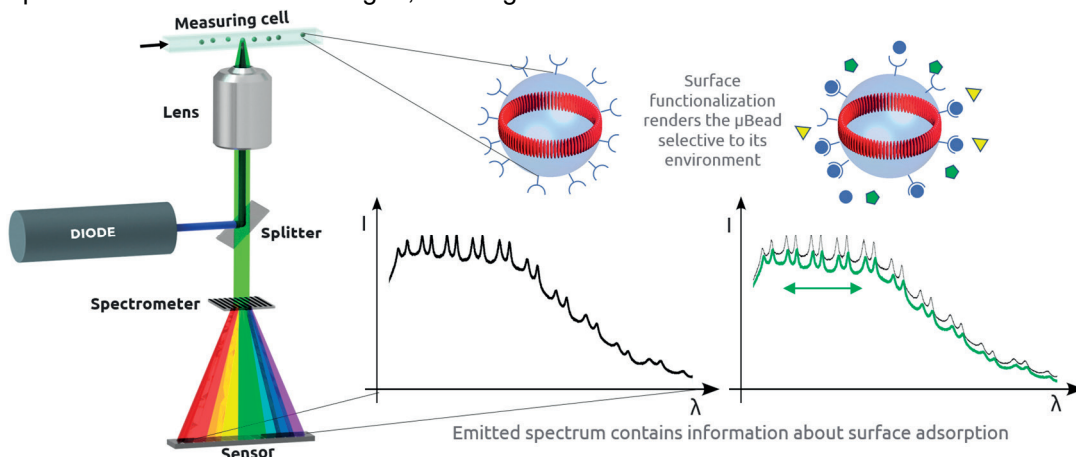


Abb. 2: Schematische Darstellung der Fluoreszenzresonatorsignatur (FRS)-Sensorik: (links) optischer Aufbau zur Anregung und Auslesung der FRS der frei schwebenden μ Beads; (rechts) Darstellung der Änderung der FRS durch spezifische Bindung von Zielmolekülen an die Oberfläche der μ Beads

Verfahren

Abb. 2 links illustriert das Detektionsschema. Die μ Beads strömen zusammen mit dem Analyten durch eine Messzelle, ähnlich wie in der Durchflusszytometrie, und werden an einer Stelle von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Das von ihnen emittierte Fluoreszenzlicht wird über das auch zur Anregung benutzte Objektiv gesammelt und über einen dielektrischen Filter auf ein hochauflösendes Spektrometer gegeben (ca. 50 pm optische Auflösung). Eine hohe spektrale Auflösung ist zur genauen Bestimmung der Resonanzpositionen unerlässlich.

Da die μ Beads in Sekundenbruchteilen ausgelesen werden können, kann ihre Anzahl ausreichend hoch gewählt werden, um statistisch repräsentative Aussagen über die Konzentration der Zielmoleküle im überwachten System zu erhalten. Dieser Ansatz kann auch leicht auf die Detektion von mehr als einer Art von Zielen erweitert werden, indem die spezifische Biofunktionalisierung der verwendeten μ Beads variiert wird. Durch die frequenzbasierte optische Auslesung und die freie Bewegung der Mikropartikel im Analyten kann auch in komplexen Medien, wie beispielsweise Milch oder Melasse, gemessen werden, wodurch der Aufwand für die Probenvorbereitung entfällt und die Zeit bis zum Erhalt der Ergebnisse minimiert wird.

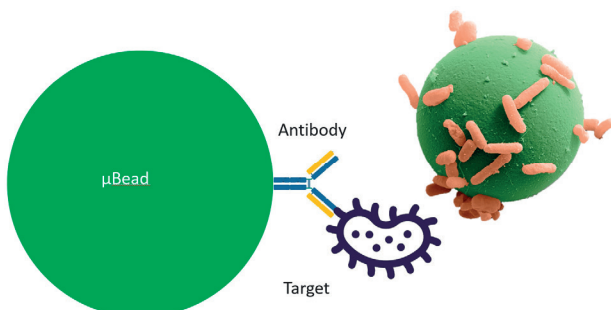


Abb. 3: links: Illustration der μ Bead-Funktionalisierung und der Zielbindung; rechts: REM- Aufnahme eines 10 μ m großen μ Beads, das zuvor in Lösung spezifisch Legionellen gebunden hat.

Vergleich mit dem SdT

Herkömmliche Biosensoren (Abb. 1) leiten den zu untersuchenden Analyten in der Regel durch einen Mikrokanal, dessen eine Wand mit spezifischen Fängermolekülen funktionalisiert ist, so dass nur die gewünschten Zielmoleküle selektiv binden können. Die Bindungsreaktionen werden dann über einen physikalischen Transduktions-Mechanismus in elektrische Signale umgewandelt. Bei diesem Ansatz müssen die Zielmoleküle zur Sensoroberfläche kommen. Da in mikrofluidischen Kanälen in der Regel laminare Strömungsbedingungen herrschen, erfolgt dieser Transport im Wesentlichen über Diffusion, was,

insbesondere bei geringer Konzentration, recht lange dauern kann. Außerdem diffundieren auch andere Komponenten des Analyten auf ähnlichen Zeitskalen zur Sensoroberfläche und können dort für Probleme mit unspezifischer Wechselwirkung sorgen.

Biosensoren, die auf der Fluoreszenz-Resonator-Signatur-Technologie (FRS) basieren, verwenden dagegen frei bewegliche Sensorpartikel. Auch hier besteht die biospezifische Schnittstelle aus spezifischen Fängermolekülen, die jedoch auf die Oberfläche der mikroskopisch kleinen Sensorpartikel aufgepfropft werden. Da die Partikel frei beweglich sind, kann das gesamte Analytvolumen innerhalb kurzer Zeit nach Zielmolekülen abgesucht werden, was die Zuverlässigkeit der Messung erheblich verbessert. Mittels unseres proprietären Ansatzes werden die Bindungsereignisse optisch und damit berührungslos ausgelesen und anschließend in elektrische Signale umgewandelt.

Nachteile gängiger Biosensoren:

1. Die laminare Strömung behindert die Bewegung der Zielobjekte in Richtung des Sensorbereichs
2. Unspezifische Bindung an den Sensorbereich wird nicht wirksam weggespült
3. Die Kosten für diese Sensoren sind hoch, und sie sind schwer zu regenerieren oder zu ersetzen.

Störende Merkmale der Fluoreszenz-Resonator-Signatur (FRS):

1. Eine große Anzahl von frei schwebenden μ Beads scannt das gesamte Analytvolumen und ermöglicht so Aussagen hoher statistische Güte.
2. Die kugelförmige Sensoroberfläche vermeidet sowohl unspezifische Bindungen als auch spezifische Rückbindungen
3. Optische Technologie ermöglicht das kontaktlose Auslesen jedes einzelnen μ Bead-Sensors



Abb. 4: SpheroScan® Explorer in Laborumgebung

Abhängig von der jeweiligen Anwendung werden Größe und optische Eigenschaften der μ Beads so gewählt, dass sie auch in komplexen Medien beste Leistungen erbringen, während ihre Oberfläche mit verschiedenen Fängermolekülen, wie Peptiden, Aptameren oder Antikörpern, funktionalisiert wird. Die Qualitätskontrolle nach jedem Präparationsschritt gewährleistet eine reproduzierbare und zuverlässige Leistung des Gesamtsystems.

SpheroScan® Explorer

Eine erste Umsetzung der FRS-Technologie in ein robustes und industrietaugliches Mess-System erfolgt derzeit bei der Fa. Fluidect in Form der SpheroScan®-Modellserie. Abb. 4 zeigt das Modell SpheroScan® Explorer, welches für den Laborbetrieb ausgelegt ist, mit Hilfe eines gerade in der Entwicklung befindlichen Auto-Samplers aber auch bereits at-line betrieben werden kann. Das System wird über eine integrierte Mess- und Analyse-Software gesteuert, die über einen Touchscreen in der Frontplatte bedient werden kann. Die zu analysierende Probe wird zunächst in eine Multiwell-Plate pipettiert, das Einlegen der Plate erfolgt dann von oben nach Anheben der Probenklappe. Die Messungen werden halbautomatisch nach individuellen Benutzereingaben, wie z.B. Art der Probe und Anzahl der zu messenden Wells, durchgeführt.

Ergebnisse

Während das System noch misst, werden die ersten Daten bereits von einem proprietären Algorithmus analysiert, der grundlegende Parameter, wie die jeweilige μ Bead-Größe und Oberflächenbeladung, liefert (siehe Abb. 5). Aus diesen Basisdaten werden benutzerrelevante Informationen, wie z.B. Koloniebildende Einheiten pro Milliliter (KBE/mL), berechnet,

angezeigt und optional ausgedruckt. Aufgrund des hohen Durchsatzes des Systems und der großen Anzahl von Messungen pro Test werden schließlich statistische Informationen über die Verteilung der gesuchten Zielmoleküle im Analyten geliefert.

Diskussion

Der hier vorgestellte Ansatz zur Biosensorik mit Hilfe spezifisch funktionalisierter, fluoreszenter μ Beads besitzt in mehrerer Hinsicht gegenüber dem SdT disruptiven Charakter. Dadurch, dass die μ Beads dem Analyten zugegeben werden und sich dabei frei bewegen können, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, die gesuchten Zielmoleküle zu binden. In strömenden Analyten bewegen sich die μ Beads in Regionen mit maximaler Strömungsgeschwindigkeit, wodurch die Zielmoleküle aktiv zu den μ Beads transportiert werden. Durch die gleichzeitig entstehende Reibung zwischen Partikeloberfläche und Analyt werden schwach und unspezifisch gebundene Moleküle weggespült und so das Risiko unspezifischer Adsorption minimiert.

Mit der Modell-Serie SpheroScan® verfolgt die Fluidect GmbH das Ziel, die FRS-Technologie als Plattform für den unterschiedlichen Kundenbedarf einzuführen. Das bereits kommerziell erhältliche System SpheroScan®-Explorer zielt dabei auf die Labornutzung, wie sie beispielsweise auch für die Einrichtung neuer Zielmoleküle in at-line-Systemen immer wichtiger bleibt. Gerade in der Entwicklung befindliche Systeme, wie der SpheroScan®-Guard, ist für die Echtzeit-Analytik direkt in Produktionsanlagen der Wasseraufbereitung, Lebensmittelproduktion, Fermentation, uvm., hin ausgelegt. Insgesamt ist mit dieser Diversität in der Modellpalette eine hohe Marktpenetration zu erwarten.

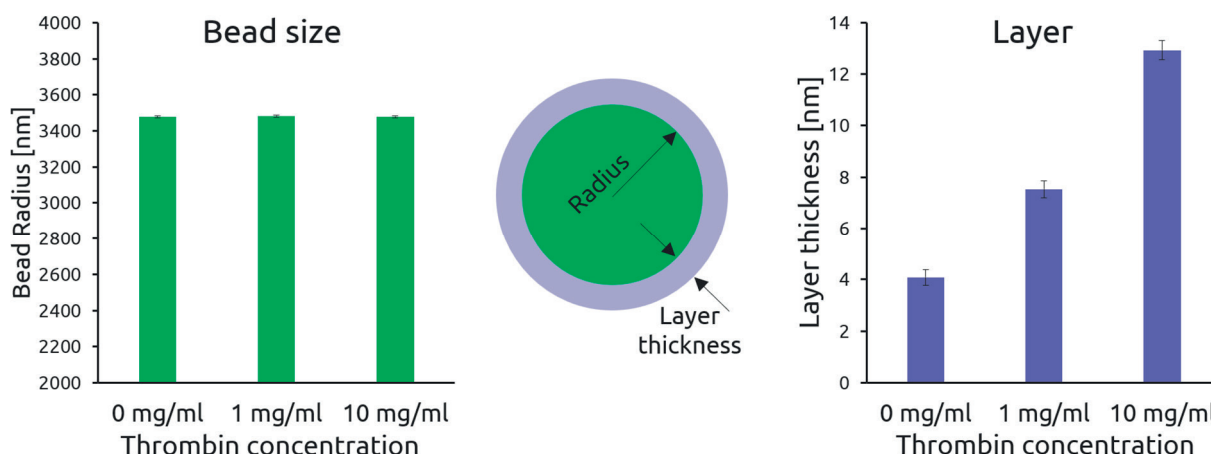


Abb. 5: Ergebnisse des proprietären Algorithmus bei Adsorption von Thrombin auf den μ Beads, gemessen mit Hilfe des SpheroScan® Explorer: Radius der Mikropartikel (links) sowie Oberflächenbeladung mit Thrombin (rechts)

Literatur

- [1] S Sinha, LS Bachan Upadhyay: Biosensing technology for detection and assessment of pathogenic microorganisms.. *Future Microbiol.* 2024 Oct 29:1-16. doi: 10.1080/17460913.2024.2417621.
- [2] AS Kharkova, LS Kuznetsova, KD Ivanova, MM Gertsen, VA Arlyapov: Recent Advances in Amperometric Biosensors for Medical Applications: A Mini-Review. *Curr Top Med Chem.* 2024 Oct 28. doi: 10.2174/0115680266323004241015122441.
- [3] C Li, Z Zhu, J Yao, Z Chen Z, Y Huang: Perspectives in Aptasensor-Based Portable Detection for Biotoxins. *Molecules.* 2024 Oct 15;29(20):4891. doi: 10.3390/molecules29204891.
- [4] B Brunetti: Electrochemical Sensors and Biosensors for the Determination of Food Nutritional and Bioactive Compounds: Recent Advances.. *Sensors (Basel).* 2024 Oct 12;24(20):6588. doi: 10.3390/s24206588.
- [5] B Katey, I Voiculescu, A Nikolova Penkova. Untaroiu.: A Review of Biosensors and Their Applications. *ASME Open J. Engineering.* Jan 2023, 2: 020201. doi.org/10.1115/1.4063500
- [6] A Francois, S Krishnamoorthy, M Himmelhaus: Novel detection scheme for optical biosensing using Whispering Gallery Modes in clusters of dielectric particles. Conference Paper in Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering · March 2008. DOI: 10.1117/12.762664.
- [7] M Himmelhaus: Microsensors on the Fly. *Optik & Photonik*, 11: 43-47 (2016). doi.org/10.1002/opph.201600006.
- [8] N. Toropov, G. Cabello, MP. Serrano, RR Gutha, M. Rafti, F. Vollmer: Review of biosensing with whispering-gallery mode lasers. *Light Sci Appl.* 2021 Feb 26;10(1):42. doi: 10.1038/s41377-021-00471-3.

Danksagung

Wir danken den Mitarbeitern des Leibniz-Instituts für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut (FLI), des Instituts für Infektiologie, des Instituts für Infektionsmedizin und Infektionskontrolle, des Leibniz-Instituts für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Hans-Knöll-Institut, des Thüringischen Instituts für Textil- und Kunststoff-Forschung e.V. (TITK), dem Universitätsklinikum Jena, der Vrije Universiteit Brussel (VUB) für ihre oft spontane und konstruktive Unterstützung sowie allen unseren Förderern und Investoren, insbesondere der Bundesagentur für Sprunginnovationen SPRIN-D, Leipzig, der b.value AG, Dortmund, der bm-t beteiligungsmanagement thüringen gmbh sowie der Sparkasse Jena.