

# Aufbau und Biofunktionalisierung einer LSPR-Molekülsensorikeinheit

Nadja Steinke<sup>1</sup>, Roland Wuchrer<sup>1</sup> und Thomas Härtling<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme IKTS, Dresden, Deutschland

Kontakt: nadja.steinke@ikts.fraunhofer.de

## Zusammenfassung:

Der Gebrauch klassischer Oberflächenplasmonenresonanz-Sensoren ist derzeit aufgrund ihrer massiven und justageaufwendigen Bauweise auf den Laborbetrieb beschränkt. Am Fraunhofer IKTS wird gegenwärtig ein miniaturisiertes Sensorsystem entwickelt, dessen Messeffekt auf lokalisierter Oberflächenplasmonenresonanz basiert. Als zentrales Element steht dabei eine mit Fängermolekülen funktionalisierte nanostrukturierte Goldoberfläche in direktem Kontakt mit einem Photodiodenpaar. Bei einer Wechselwirkung des Analyten mit der biologischen Erkennungsstruktur und gleichzeitiger transmittiver Beleuchtung können die Signaländerungen anhand eines einfachen Photostromvergleiches ausgewertet werden – ganz ohne die Verwendung eines aufwendigen Spektrometers. Die vereinfachte und kompakte Bauweise dieses Sensorsystems soll in Zukunft eine Integration in Anlagen zur Online-Prozessüberwachung und Echtzeitdetektion von Biomolekülen erlauben. In diesem Beitrag wird der aktuelle Arbeitsstand des Sensoraufbaus sowie der Biofunktionalisierung dargestellt.

**Key words:** Optischer Biosensor, lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR), miniaturisierter Biosensor, Nanoimprint Lithographie, Biotin-Streptavidin

## Einleitung

Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR)-Sensoren haben sich als Analyseverfahren zur Beobachtung und Quantifizierung molekularer Bindungsvorgänge in der Laborumgebung etabliert [1,2]. Sie ermöglichen einen markierungsfreien und empfindlichen Echtzeitnachweis verschiedener Analyten, bei gleichzeitig geringem Probenvolumen, und finden daher immer häufiger Anwendung im Bereich der Umwelt- und Lebenswissenschaften [1,3].

In kommerziellen SPR-Sensoren erfolgt die Anregung der Plasmonenschwingungen klassischerweise Prismen gekoppelt in der Kretschmann-Raether-Konfiguration [4,5]. Grundlage dieser Anordnung ist ein hochbrechendes Prisma, welches mit einem dünnen Metallfilm beschichtet ist. Wird Licht auf den Metallfilm fokussiert, ist es möglich, die einfallenden Photonen an die darin anregbaren longitudinalen Plasmonenschwingungen zu koppeln. Der Übergang der Photonen-Energie an die Plasmonen (Resonanzfall) zeigt sich bei einem definierten Einstrahlwinkel in einem scharfen Minimum bei der Detektion des reflektierten Lichts [6,7]. Änderungen der oberflächennahen Brechzahl können somit durch die winkelabhängige

Intensitätsverschiebung des reflektierten Lichts detektiert werden.

Obwohl die Kretschmann-Raether-Anordnung etabliert ist und als hochsensitiv gilt, ist der Betrieb klassischer SPR-Sensoren aufgrund ihrer massiven und justageaufwendigen Optiken auf den Laborbetrieb beschränkt [8-12].

Aus diesem Grund wird am Fraunhofer IKTS ein miniaturisiertes SPR-Sensorsystem aufgebaut, bei dem auf die Verwendung eines Spektrometers verzichtet und ein Photodiodenpaar als zentrale Auswerteeinheit verwendet wird. Der robuste und kompakte Aufbau soll Feldeinsätze abseits kontrollierbarer Laborumgebungen erlauben. Für das Messprinzip wird die plasmonische Eigenschaft nanostrukturierter Metalloberflächen genutzt. Die lokalisierten Oberflächenplasmonen können darin beispielsweise mit einfacher transmittiver Beleuchtung - ohne die Verwendung zusätzlicher Optiken - angeregt werden [13]. Die spektrale Lage der kollektiven Elektronenschwingungen ist abhängig von der Brechzahl des unmittelbar umgebenden Mediums. Auf diese Weise können auch spezifische biomolekulare Interaktionen nachgewiesen werden.

Im aktuellen Entwicklungsstand können mit dem lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz (*localized surface plasmon resonance*, LSPR)-Sensor Protein-Ligand-Interaktionen anhand der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung spezifisch detektiert werden.

## Material und Methoden

### Herstellung der Sensorsubstrate

Die 24 x 24 cm großen nanostrukturierten Goldoberflächen wurden nach dem Protokoll von Yang et al. [14] mittels thermischer Nanoimprint Lithographie (NIL) gefertigt und im Anschluss mit 2 nm Chrom und 25 nm Gold thermisch bedampft.

### Aufbau und Funktionsweise des LSPR-Sensors

Der Aufbau des LSPR-Sensors ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Basis des Sensors bildet eine NIL-Struktur, die in direktem Kontakt mit einem Photodiodenarray (S4111-16Q, Hamamatsu) steht. Oberhalb der Struktur befinden sich mikrofluidische Kanäle, die aus einer biokompatiblen Folie (3M) gefertigt und mit einem Deckglas (24 x 12 cm) abgedeckt wurden (Abbildung 2). Beleuchtet werden die Kanäle mittels einer LED mit einer Zentralwellenlänge von 875 nm (FWHM = 80 nm).

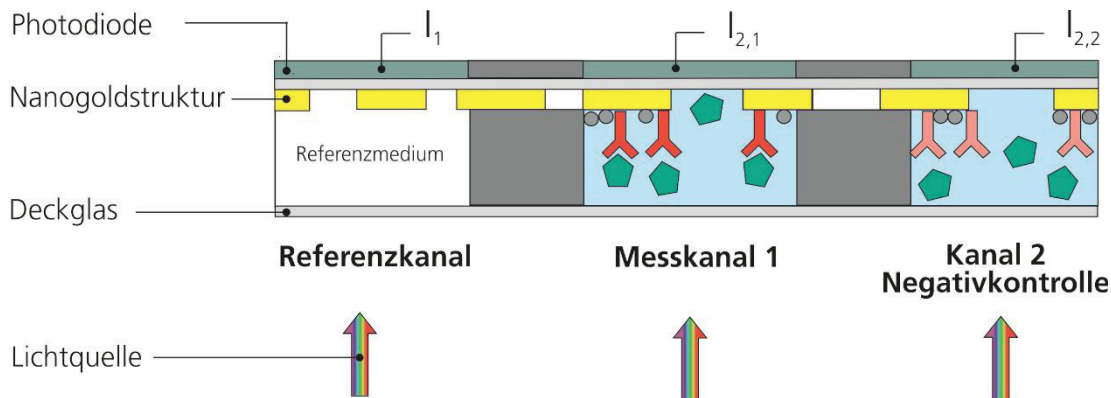


Abb. 1. Prinzipieller Aufbau des LSPR-Sensors

Der erste Kanal ist mit einem Referenzmedium befüllt, daher bleibt der Photostrom  $I_1$  über die Dauer eines Experiments konstant. Die Messkanäle 1 und 2 werden mit einer biologischen Erkennungsstruktur funktionalisiert. Messkanal 1 dient dabei als Negativkontrolle zum Anzeigen unspezifischer Bindungen. Wird der Analyt hinzugegeben und bindet an die Erkennungsstruktur, ändert sich die oberflächennahe Brechzahl. Hierdurch ändern sich die spektralen Transmissionseigenschaften der NIL-Struktur und damit auch der erzeugte Photostrom  $I_2$ . Bei

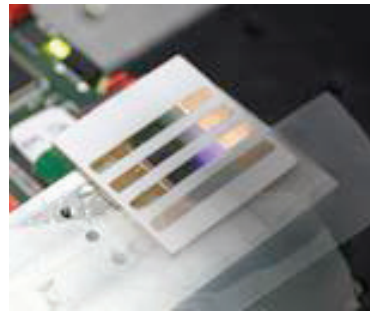


Abb. 2: NIL-Struktur mit mikrofluidischen Kanälen

Zur Auswertung des transmittierten Lichtes werden die erzeugten Photoströme  $I_1$  und  $I_2$  mit einer Verstärkerelektronik nach Formel (1) differentiell miteinander verglichen:

$$I = \frac{I_2 - I_1}{I_1 + I_2} \quad (1)$$

Die Division durch den Gesamtphotostrom erlaubt dabei die Messung unabhängig von Intensitätsschwankungen der LED durchzuführen.

gleichzeitig konstantem Photostrom  $I_1$  kann eine Änderung des Signals über die Differenz der Photoströme (Formel (1)) detektiert werden.

## Ergebnisse und Diskussion

Zur Beschreibung der Funktionsweise des Sensors erfolgte der erste Machbarkeitsnachweis mit Medien unterschiedlicher Brechzahl (Lösungen mit unterschiedlichen Anteilen an Wasser und Ethylenglykol). Die Brechzahlen der Lösungen wurden mittels eines Refraktometers bestimmt

und lagen zwischen 1,332 (reines Wasser) und 1,431 (reines Ethylenglykol). Der Referenzkanal wurde mit Luft (Brechzahl  $n = 1,0$ ) befüllt. Die Lösungen wurden nacheinander in Messkanal 1 pipettiert und die jeweils resultierenden Signaländerungen detektiert (bei konstantem Photostrom  $I_1$ ). Abbildung 3 zeigt die Signaländerungen nach Zugabe der Medien mit unterschiedlicher Brechzahl.

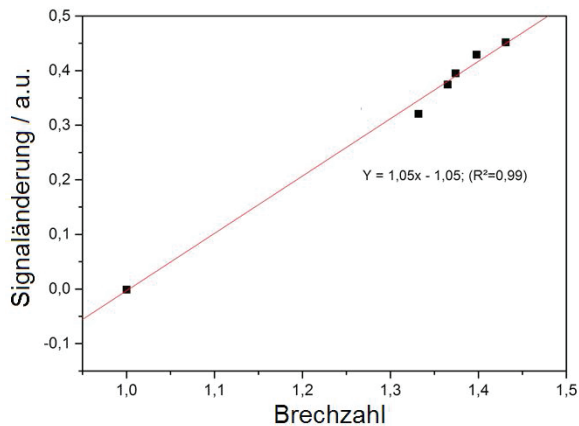


Abb. 3. Signaländerungen nach dem Vermessen von Medien mit unterschiedlicher Brechzahl

Zwischen der Photostromdifferenz (Angabe als Signaländerung) und der Brechzahl ist ein linearer Zusammenhang erkennbar. Dabei zeigte sich eine größere Signaländerung mit zunehmender Brechzahl. Das kann mit einer Verschiebung der spektralen Lage der plasmonischen Resonanz und damit Änderung der Transmissionseigenschaften der NIL-Struktur begründet werden. Die plasmonische Resonanz verschiebt sich in Richtung des roten Wellenlängenbereichs linear (Ergebnisse nicht gezeigt) bei Erhöhung der Brechzahl im untersuchten Brechzahlbereich.

Für das Detektionsprinzip des Sensorsystems gilt daher folgendes Schema: Befindet sich im Messkanal 1, oberhalb der zweiten Photodiode, ein Medium, dessen Brechzahl sich von der Referenzdiode (Photodiode 1) unterscheidet, kann eine Signaländerung durch die spektrale Verschiebung der plasmonischen Resonanz und damit Änderung der Transmissionseigenschaften der NIL-Struktur, detektiert werden. Dabei spiegelt der Photostrom sowohl die Menge des transmittierten Lichts, als auch die Sensitivität der Photodiode über einen bestimmten Wellenlängenbereich (Kennlinie der Photodiode), wider.

Eine Änderung der oberflächennahen Brechzahl findet beispielsweise auch bei der Interaktion eines Moleküls mit einer biologischen Erkennungsstruktur statt.

Nachdem im ersten Machbarkeitsnachweis gezeigt werden konnte, dass oberflächennahe Brechzahländerungen mit dem neuen LSPR-Sensoraufbau detektiert werden können, soll anhand eines Modellsystems auf der Basis der Biotin-Streptavidin-Interaktion überprüft werden, ob die Sensitivität auch ausreichend für die Detektion biomolekularer Wechselwirkungen ist.

Dazu wurde der Messkanal 1 mit 500  $\mu\text{g/mL}$  Biotin-BSA und Messkanal 2 mit 500  $\mu\text{g/mL}$  BSA als Negativkontrolle, zum Anzeigen unspezifischer Bindungen, befüllt. Anschließend wurden beide Kanäle nach einem Spülschritt für 30 Minuten mit 100  $\mu\text{g/mL}$  Streptavidin inkubiert und abschließend ein weiteres Mal mit Puffer gespült. Die gemessenen Signaländerungen nach Zugabe des Streptavidins sind in Abbildung 4 gegenübergestellt. Der Referenzkanal wurde mit Luft befüllt.

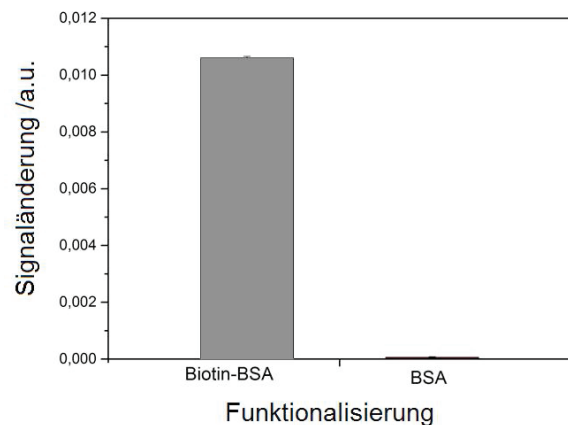


Abb. 4. Signaländerungen nach Zugabe von Streptavidin auf zuvor mit Biotin-BSA bzw. BSA funktionalisierten Flächen. Die Standardabweichung wurde aus 20 Datenpunkten bestimmt.

Wie zu erwarten, kann ein höheres Bindungssignal auf der zuvor mit Biotin-BSA funktionalisierten Fläche im Vergleich zur mit BSA funktionalisierten Fläche detektiert werden. Die Signaländerung resultiert aus der spezifischen Bindung von Streptavidin an die biotinylierte Oberfläche. Bei erfolgreicher Bindung von Streptavidin an Biotin ändert sich die oberflächennahe Brechzahl und die spektrale Lage der plasmonischen Resonanz verschiebt sich in Richtung des roten Wellenlängenbereichs. Auf diese Weise ändern sich wie zuvor beschrieben die spektralen Transmissionseigenschaften des Sensorsubstrates (NIL-Struktur) und eine Signaländerung kann detektiert werden.

Die als Negativkontrolle mit BSA funktionalisierte Fläche zeigt hingegen kaum eine Signaländerung und bestätigt, dass

Streptavidin spezifisch an Biotin - nicht aber an BSA - gebunden hat.

Anhand der Interaktion von Biotin-Streptavidin konnte gezeigt werden, dass biomolekulare Wechselwirkungen mit dem neu entwickelten LSPR-Sensorsystem spezifisch detektiert werden können.

### Ausblick

In weiteren Studien sollen mithilfe des LSPR-Sensors niedermolekulare Substanzen, beispielsweise Antibiotikarückstände im Abwasser detektiert werden. Dazu werden derzeit experimentelle Versuche an einem Verdrängungsassay durchgeführt, bei dem die NIL-Struktur mit Aptameren zum Nachweis verschiedener Antibiotika funktionalisiert wird. Eine komplementäre Oligonukleotidsequenz wird bei diesem Assayaufbau als Signalverstärker eingesetzt, indem sie mit dem nachzuweisenden Antibiotikum um die Bindungsstelle des Aptamers konkurriert.

### Danksagung

Die Autoren danken Sheng-Chieh Yang (TU Dresden) für die Zusammenarbeit bei der Herstellung der Goldnanostrukturen. Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs „Nano- und Biotechniken für das Packaging elektronischer Systeme“ (DFG 1401 / 2) gefördert.

### Literatur

- [1] HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G.: Surface plasmon resonance sensors: review. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 54 (1999), Nr. 1, S. 3-15
- [2] SHANKARAN, D. R.; GOBI, K. V.; MIURA, N.: Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 121 (2007), Nr. 1, S.158-177
- [3] HOMOLA, J. (Hrsg.): *Surface plasmon resonance based sensors*. Springer Science & Business Media, 2006, S.155-229
- [4] KRETSCHMANN, E.; RAETHER, H.: Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. In: *Zeitschrift für Naturforschung A* 23 (1968), Nr. 12, S. 2135-2136
- [5] KRETSCHMANN, E.: Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. In: *Zeitschrift für Physik* 241 (1971), Nr. 4, S. 313-324
- [6] RUBAHN, H.-G.; BALZER, F.: *Laseranwendungen: an harten und weichen Oberflächen*. Springer-Verlag, 2005, S.172

[7] ZAYATS, A. V.; SMOLYANINOV, I. I.: Near-field photonics: surface plasmon polaritons and localized surface plasmons. In: *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* 5 (2003), Nr. 4, S. S16

[8] WILLETS, K. A.; VAN DUYNNE, R. P.: Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. In: *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58 (2007), S. 267-297

[9] HOMOLA, J.: Present and future of surface plasmon resonance biosensors. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 377 (2003), Nr. 3, S. 528-539

[10] DERENKO, S.; HÄRTLING, T.; UNGLAUBE, G.; ENG, L. M.; OPITZ, J.: A compact differential refractive index sensor based on localized surface plasmons. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 214 (2014), S. 252-258

[11] KEUSGEN, M.: SPR-Biosensoren-Anwendungsmöglichkeiten erweitert. In: *Labor Praxis* 32 (2008), Nr. 5, S. 24

[12] SHEEHAN, A. D.; QUINN, J.; DALY, S.; DILLON, P.; O'KENNEDY, R.: The development of novel miniaturized immuno-sensing devices: a review of a small technology with a large future. In: *Analytical letters* 36 (2003), Nr. 3, S. 511-537

[13] EBBESEN, T. W.; LEZEC, H. J.; GHAEMI, H. F.; THIO, T.; WOLFF, P. A.: Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays. In: *Nature* 391 (1998), Nr. 6668, S. 667-669

[14] YANG, S. C.; HOU, J. L.; FINN, A.; KUMAR, A.; GE, Y.; FISCHER, W. J.: Synthesis of multifunctional plasmonic nanopillar array using soft thermal nanoimprint lithography for highly sensitive refractive index sensing. In: *Nanoscale* 7 (2015), Nr.13, S. 5760-5766