

Detektion von Pflanzenviruspartikeln mittels eines feldeffektbasierten kapazitiven Biosensors

Melanie Welden^{1,2}, Farnoosh Vahidpour¹, Tim Wendlandt³, Arshak Poghossian⁴, Michael Keusgen², Christina Wege³ und Michael J. Schöning^{1,5}

¹Institut für Nano- und Biotechnologien (INB), FH Aachen, Jülich, Deutschland

²Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps Universität Marburg, Marburg, Deutschland

³Institut für Biomaterialien und Biomolekulare Systeme, Universität Stuttgart, Stuttgart, Deutschland

⁴MicroNanoBio, Düsseldorf, Deutschland

⁵Institut für Biologische Informationsprozesse (IBI-3), Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Deutschland
Kontakt: m.welden@fh-aachen.de

Einleitung

Pflanzenviren tragen wesentlich zu Ernteverlusten bei, wodurch hohe wirtschaftliche Kosten verursacht werden [1, 2]. Das wohl bekannteste Pflanzenvirus stellt das Tabakmosaikvirus (TMV) dar, welches das erste entdeckte Virus der Geschichte und heute eines der am besten erforschten Viren ist. TMV sind weit verbreitet und infizieren z.B. Tabak, Tomate, Paprika und andere Mitglieder der Familie *Solanaceae*, sowie Pflanzen in etwa 30 weiteren Familien. Für Säugetiere sind TMV hingegen nicht pathogen [3, 4]. Der durch TMV verursachte weltweite Schaden beläuft sich auf bis zu 100 Millionen USD pro Jahr [5, 6]. TMV hemmen das Wachstum der infizierten Pflanzen und verursachen typische, mosaikartige Muster auf den Blättern. TMV-Partikel haben eine nanoröhrenartige Struktur mit einer Länge von 300 nm, einem Außendurchmesser von 18 nm und einem inneren Kanal mit 4 nm Durchmesser. Jedes TMV-Nanoröhrchen besteht aus einer Einzelstrang-RNA, die zwischen 2130 schraubenförmig angeordneten, identischen Hüllprotein-Untereinheiten eingebettet ist. TMV können sich über die Atmosphäre verbreiten und mechanisch von Pflanze zu Pflanze übertragen werden [7].

Um Kontrollstrategien zu entwickeln, ist eine zuverlässige und frühzeitige Erkennung von Pflanzenviruskrankheiten vor Ort nötig. Um dies zu realisieren, sind tragbare Biosensoren von großem Interesse [8,9].

In dieser Studie wurde ein feldeffektbasierter SiO₂-Gate-Elektrolyt-Isolator-Halbleiter-Sensor für den markierungsfreien elektrostatischen Nachweis von TMV-Partikeln als Modell-Pflanzenpathogen eingesetzt (siehe Abb. 1) [10]. Die kapazitiven Feldeffekt-Sensoren wurden hinsichtlich ihrer TMV-Empfindlichkeit mit Hilfe von „Konstant-Kapazitäts“ (ConCap)-Messungen elektrochemisch und mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) physikalisch charakterisiert. Mit dem entwickelten Sensor konnten biotinylierte TMV-Partikel aus einer Suspension mit einer TMV-Konzentration von nur 0,001 mg/mL nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine klare Korrelation zwischen dem aufgenommenen Sensor-

signal und der TMV-Dichte auf der SiO₂-Transduceroberfläche, die anhand von REM-Aufnahmen ermittelt wurde.

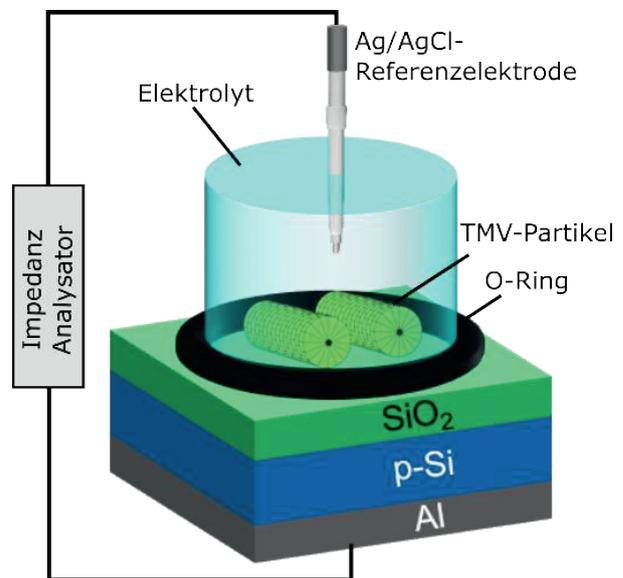


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines TMV-modifizierten Feldeffektsensors mit SiO₂ als Gate-Isolator.

Methoden und Materialien

Herstellung der EIS-Sensorchips

Zur Herstellung der Al/p-Si/SiO₂-Schichtstrukturen, wurde ein p-dotierter Silizium (p-Si) Wafer (~385 µm Dicke, 1-5 Ωcm) für 30 Minuten bei 1000 °C in O₂-Atmosphäre thermisch oxidiert, wodurch eine 30 nm dicke SiO₂-Gate-Isolatorschicht erzielt wurde. Eine während des Oxidationsprozesses unerwünscht gebildete SiO₂-Schicht auf der Rückseite des p-Si wurde durch Ätzen mit Flusssäure entfernt. Anschließend wurden auf der Rückseite des Wafers 300 nm Aluminium abgeschieden, um einen elektrischen Kontakt zum p-Si herzustellen. In einem letzten Schritt wurde der produzierte Wafer für 10 Minuten in N₂-Atmosphäre bei 400 °C getempert. Um einzelne Sensorchips zu erhalten, wurde der Wafer in 10 ×

10 mm² vereinzelt. Vor dem Gebrauch wurden die Sensorchips in einem Ultraschallbad für je 5 Minuten mit Aceton, Isopropanol, Ethanol und deionisiertem Wasser gereinigt.

Vorbereitung der TMV-Lösungen

Als Modell-Pflanzenviruspartikel wurde eine genetisch veränderte TMV-Variante mit einem exponierten Cysteinrest auf jedem Hüllprotein verwendet [10, 11]. Diese TMV-Variante wurde bereits in früheren Arbeiten zur dichten Immobilisierung von Enzymen auf Biosensoren eingesetzt [12, 13]. Dafür wurden bifunktionelle Maleimid-Polyethylenglykol-Biotin-Linker (EZ-Link Maleimid-PEG₁₁-Biotin (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)) kovalent an die Thiolgruppen der Cysteinreste gebunden. Diese funktionalisierten TMV-Partikel wurden in der vorliegenden Arbeit als Modell-Viruspartikel eingesetzt. Die TMV-Stammlösung (5 mg/mL in 10 mM Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (NKP, 10 mM NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 10 mM K₂HPO₄ (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 7) wurde bei 4 °C gelagert. Für die TMV-Beladungsexperimente wurden unterschiedlich konzentrierte TMV-Lösungen durch Verdünnen der TMV-Stammlösung mit 0,1 M NKP-Puffer (pH 7,0) hergestellt.

Elektrochemische Charakterisierung der EIS-Biosensoren mittels Feldeffektmessungen

EIS-Sensoren sind sensitiv gegenüber Potenzialänderungen an der Grenzfläche Gate-Isolator/Elektrolyt. Im Falle eines p-Typ-Halbleiters, wie er in der vorliegenden Studie verwendet wurde, reduziert die Adsorption von negativ geladenen Teilchen, wie es TMV-Partikel sind, die Breite der Raumladungszone im Halbleiter, wodurch die Gesamtkapazität der Sensorstruktur erhöht wird. Bei der Charakterisierung der EIS-Sensoren mittels „Kapazitäts-Spannungs“ (C-V)-Messungen führt dies zu einer Verschiebung der Messkurve hin zu positiveren (bzw. weniger negativen) Spannungswerten, was insbesondere im Verarmungsbereich der C-V-Kurve erkennbar ist. Im ConCap-Messmodus, der in dieser Arbeit zur elektrochemischen Charakterisierung angewendet wurde, wird die Kapazität im Verarmungsbereich der C-V-Kurve bei ~60% der maximalen Kapazität konstant eingeregelt. Dies geschieht durch das Anlegen einer vorzeicheninvertierten Spannung an der Referenzelektrode, wodurch Potentialänderungen an der Gate-Oberfläche kompensiert werden, die durch die Adsorption der TMV-Partikel entstehen. Auf diese Weise wird das Messsignal des Biosensors dynamisch über die Zeit aufgenommen.

Für den Nachweis von TMV-Partikeln mit den SiO₂-

EIS-Sensoren wurden die EIS-Sensorchips in eine selbstgebaute Messkammer montiert und mit einem O-Ring abgedichtet, wie in Abb. 1 dargestellt. Dabei waren 0,5 cm² der SiO₂-Isolatoroberfläche während der elektrochemischen Messungen in Kontakt mit der Elektrolytlösung und für die TMV-Adsorption zugänglich. Die Referenzelektrode (Ag/AgCl, Metrohm, Filderstadt, Deutschland) wurde in die Messlösung getaucht und mit einem Impedanzanalysator (Zahner Zennium, Zahner Elektrik, Kronach, Deutschland) kontaktiert. Der Al-Rückseitenkontakt wurde ebenfalls über eine Kabelverbindung mit dem Impedanzanalysator elektrisch verbunden und somit der Stromkreis geschlossen. Die ConCap-Messungen wurden in 0,33 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7) vor und nach Beladung der Sensoroberfläche mit verschiedenen TMV-Konzentrationen durchgeführt. Für die TMV-Beladung wurden die Sensorchips mit 50 µL der entsprechenden TMV-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Sensoren dreimal mit 0,33 mM PBS-Puffer gespült, um nicht adsorbierte TMV-Partikel zu entfernen.

Physikalische Charakterisierung der TMV-beladenen SiO₂-Oberfläche mittels REM

Zur morphologischen Charakterisierung der TMV-beladenen SiO₂-Oberfläche wurden REM-Bilder von sechs repräsentativen Bereichen der Chipoberfläche mit einem JEOL JSM-7800F Schottky Feldemissionsmikroskop (JEOL GmbH, Freising, Deutschland) aufgenommen. Vor der Aufnahme wurde eine ca. 5 nm dicke Pt/Pd-Schicht auf die Chip-Oberfläche gesputtert. Die Dichte der adsorbierten TMV-Partikel auf der Sensoroberfläche wurde aus den REM-Bildern mit Hilfe der Bildanalysesoftware ImageJ Fiji (Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) ermittelt. Für die Berechnung der TMV-Dichte wurde ein TMV-Partikel als ein 300 nm langes Nanoröhrchen definiert. Da TMV-Partikel jedoch auch als lange End-to-End-aggregierte Strukturen oder als kleinere Partikelfraktionen mit Längen im Bereich von 50-200 nm auftreten können, wurde die Anzahl der unterschiedlich großen Partikel mit entsprechenden Faktoren multipliziert.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung der TMV-Empfindlichkeit der SiO₂-EIS-Biosensoren wurden ConCap-Messungen in 0,33 mM PBS-Puffer (pH 7) vor und nach der TMV-Beladung der Sensoroberfläche aus unterschiedlich konzentrierten TMV-Lösungen zwischen 0,001 mg/mL und 0,2 mg/mL durchgeführt. Für jede TMV-Konzentration wurden drei EIS-Biosensoren

charakterisiert. In Abb. 2 sind zwei exemplarische ConCap-Kurven zu sehen, die vor (blanker Sensor) und nach Beladung mit verschiedenen TMV-Konzentrationen (0,001 mg/mL und 0,1 mg/mL) aufgenommen wurden. Das ConCap-Signal des mit negativ geladenen TMV-Partikeln modifizierten EIS-Sensors ist erwartungsgemäß in Richtung weniger negativer Gate-Spannungen verschoben.

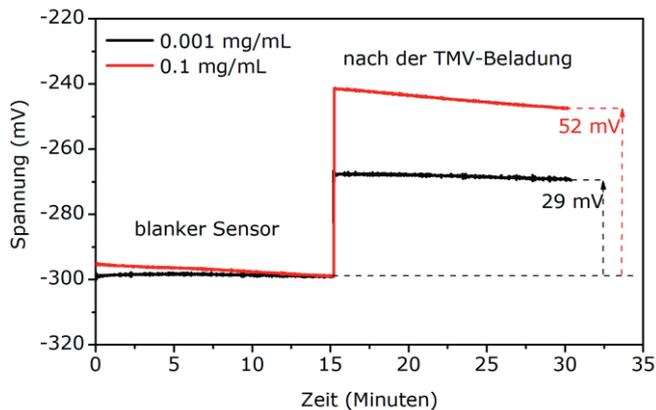


Abb. 2: Exemplarische ConCap-Kurven, aufgenommen in 0,33 mM PBS-Puffer (pH 7,0) vor (blanker Sensor) und nach Beladung der SiO₂-Sensoroberfläche mit TMV-Partikeln aus TMV-Lösungen mit einer Konzentration von 0,001 mg/mL (schwarze Kurve) und 0,1 mg/mL (rote Kurve). Die Kurven wurden auf die Messwerte mit 0,001 mg/mL TMV normiert.

Um herauszufinden, ob die Signaländerungen während der ConCap-Messungen mit der Anzahl der an der Sensoroberfläche gebundenen TMV-Partikel korrelieren, wurde die Morphologie der Sensoroberflächen nach den elektrochemischen Messungen mittels REM analysiert. In Abb. 3 sind exemplarische Abbildungen der beiden Sensoren gezeigt, mit denen die Messkurven in Abb. 2 aufgenommen wurden. Es ist klar erkennbar, dass bei einer TMV-Konzentration von 0,1 mg/mL (Bild unten) die Anzahl der gebundenen TMV-Partikel höher ist, als bei einer Konzentration von 0,001 mg/mL (Bild oben).

In Tab. 1 sind die bei unterschiedlichen TMV-Konzentrationen erzielten mittleren Signaländerungen und die dazugehörigen TMV-Dichten aufgeführt. Es ist erkennbar, dass mit steigenden TMV-Konzentrationen zwischen 0,001 mg/mL und 0,2 mg/mL eine Steigerung des Sensorsignals von $(26 \pm 2,9)$ mV auf $(58,7 \pm 16,1)$ mV einhergeht. Ebenso korrelieren die ermittelten TMV-Dichten mit $(0,014 \pm 0,0092) \times 10^9$ TMV/cm² bei 0,001 mg/mL und $(4,2 \pm 2,4) \times 10^9$ TMV/cm² bei 0,2 mg/mL mit den jeweiligen Sensorsignalen.

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren das hohe Potenzial der EIS-Biosensoren für die markierungsfreie Detektion von TMV-Partikeln als Modellpflanzenvirus. Das Detektionsprinzip könnte in zu-

künftigen Untersuchungen auf weitere Pflanzenviren ausgeweitet werden.

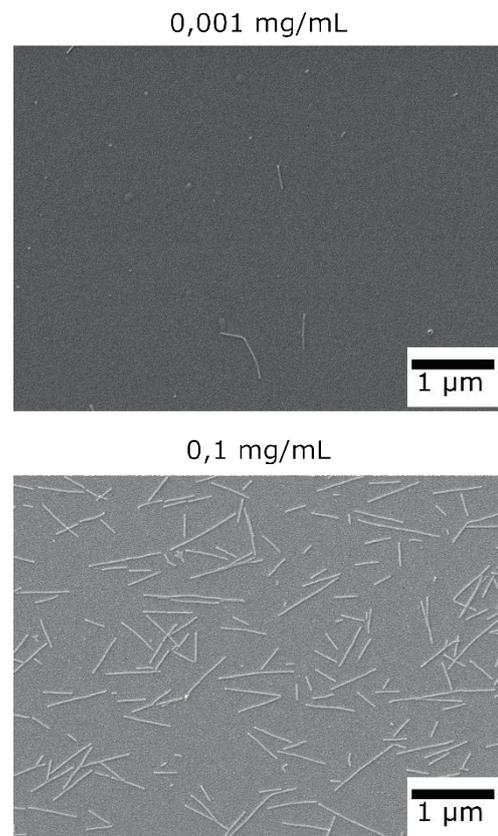


Abb. 3: Exemplarische REM-Aufnahmen der SiO₂-Oberfläche aufgenommen nach der Beladung mit TMV-Partikeln aus TMV-Lösungen mit einer Konzentration von 0,001 mg/mL (oben) und 0,1 mg/mL (unten).

Tab. 1: Mittlere Signaländerungen (n = 3) der SiO₂-EIS-Sensoren nach Beladung mit TMV-Partikeln aus unterschiedlich konzentrierten TMV-Lösungen.

TMV-Konzentration (mg/mL)	Mittlere Signaländerung (mV)	Mittlere TMV-Dichte (10 ⁹ TMV/cm ²)
0,001	26,0 ± 2,9	0,014 ± 0,0092
0,005	34,0 ± 2,2	0,036 ± 0,0054
0,02	37,3 ± 2,1	0,26 ± 0,097
0,1	52,0 ± 1,6	1,0 ± 0,7
0,2	58,7 ± 16,1	4,2 ± 2,4

Literatur

- [1] OERKE, E.-C.: Crop losses to pests. In: *J Agric Sci.* 144 (2006), Nr. 1, S. 31–43
- [2] ISLAM, W.; QASIM, M.; ALI, N.; TAYYAB, M.; CHEN, S.; WANG L.: Management of *tobacco mosaic virus* through natural metabolites. In: *Rec. Nat. Prod.* 12 (2018), Nr. 5, S. 403–415

- [3] PENG, J.; SONG, K.; ZHU, H.; KONG, W.; LIU, F., SHEN, T.; YONG, H.: Fast detection of *tobacco mosaic virus* infected tobacco using laser-induced breakdown spectroscopy. In: *Sci. Rep.* 7 (2017), Nr. 1, S. 44551.
- [4] CALO, A.; EIBEN, S.; OKUDA, M.; BITTNER, A. M.: Nanoscale device architectures derived from biological assemblies: The case of *tobacco mosaic virus* and (apo) ferritin. In: *Jpn. J. Appl. Phys.* 55 (2016), Nr. 3S2, S. 03DA01
- [5] FU, Y.; LIU, D.; ZENG, H.; REN, X.; SONG, B.; HU, D.; Gan, X.: New chalcone derivatives: synthesis, antiviral activity and mechanism of action. In: *RSC Adv.* 10 (2020), Nr. 41, S. 24483–24490.
- [6] CHEN, Y.-H.; GUO, D.-S.; LU, M.-H.; YUE, J.-Y.; LI, Y.; SHANG, C.-M.; AN, D.-R.; ZHAO, M.-M.: Inhibitory effect of osthole from *cnidium monnieri* on *tobacco mosaic virus* (TMV) infection in *Nicotiana glutnosa*. In: *Molecules.* 25 (2020), Nr. 1, S. 65
- [7] FAN, X. Z.; POMERANTSEVA, E.; GNERLICH, M.; BROWN, A.; GERASOPOULOS, K.; MCCARTHY, M.; CULVER, J.; GHODSSI, R.: *Tobacco mosaic virus*: A biological building block for micro/nano/bio systems. In: *Vac. Sci. Technol. A* 31 (2013), Nr. 5, S. 050815
- [8] POGHOSSIAN, A.; JABLONSKI, M.; MOLINNUS, D.; WEGE, C.; SCHÖNING, M. J.: Field-effect sensors for virus detection: From Ebola to SARS-CoV-2 and plant viral enhancers. In: *Front. Plant Sci.* 11 (2020), S. 598103
- [9] ZANG, F.; GERASOPOULOS, K.; BROWN, A. D.; CULVER, J. N.; GHODSSI, R.: Capillary microfluidics-assembled virus-like particle bionanoreceptor interfaces for label-free biosensing. In: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017), Nr. 10, S. 8471–8479
- [10] JABLONSKI, M.; POGHOSSIAN, A.; KEUSGEN, M.; WEGE, C.; SCHÖNING, M. J.: Detection of plant virus particles with a capacitive field-effect sensor. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021), Nr. 22, S. 5669–5678
- [11] GEIGER, F.C.; EBER, F. J.; EIBEN, S.; MUELLER, A.; JESKE, H.; SPATZ, J. P.; WEGE, C.: TMV nanorods with programmed longitudinal domains of differently addressable coat proteins. In: *Nanoscale* 5 (2013), Nr. 9, S. 3808–3816
- [12] JABLONSKI, M.; POGHOSSIAN, A.; SEVERINS, R.; KEUSGEN, M.; WEGE, C.; SCHÖNING, M. J.: Capacitive field-effect biosensor studying adsorption of *tobacco mosaic virus* particles. In: *Micromachines* 12 (2021), Nr. 1, S. 57
- [13] POGHOSSIAN, A.; JABLONSKI, M.; KOCH, C.; BRONDER, T. S.; ROLKA, D.; WEGE, C.; SCHÖNING, M. J.: Field-effect biosensor using virus particles as scaffolds for enzyme immobilization. In: *Biosens. Bioelectron.* 110 (2018), S. 168–174

Danksagung

Teile dieser Arbeit wurden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) - (446507449).

Die Autoren danken Rebecca Hummel, David Rolka und Heiko Iken für technische Unterstützung.