



Bürk Schäfer

## Einleitung

Die Konzentrationsbestimmung medizinisch relevanter Biomoleküle oder der spezifische Nachweis pathogener Keime bzw. deren Bestandteile ist eine wichtige Aufgabe in der medizinischen Diagnostik. Dabei gewinnen markierungsfrei arbeitende Analysemethoden zunehmend an Bedeutung. Eine der vielversprechendsten Methoden ist dabei die Nutzung der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz /1/. Unser Ziel ist die Entwicklung eines einfach zu handhabenden Messsystems zur schnellen und parallelen Bestimmung einer größeren Anzahl verschiedener Parameter in Blut oder Körperflüssigkeiten von Patienten. Die Sensorelemente sind dabei als kostengünstige Einwegartikel ausgelegt. Mit der vorgestellten Lösung ist bei Einsatz geeigneter Fänger-moleküle ebenso eine einfache und sichere Analyse von Proben in der Umweltanalytik oder die gezielte Suche nach Verunreinigungen in der Lebensmittelanalytik möglich.

## Messmethode

Der Nachweis bzw. die Bestimmung der Konzentration der zu analysierenden Biomoleküle mit Hilfe des Prinzips der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (surface plasmon resonance, SPR)

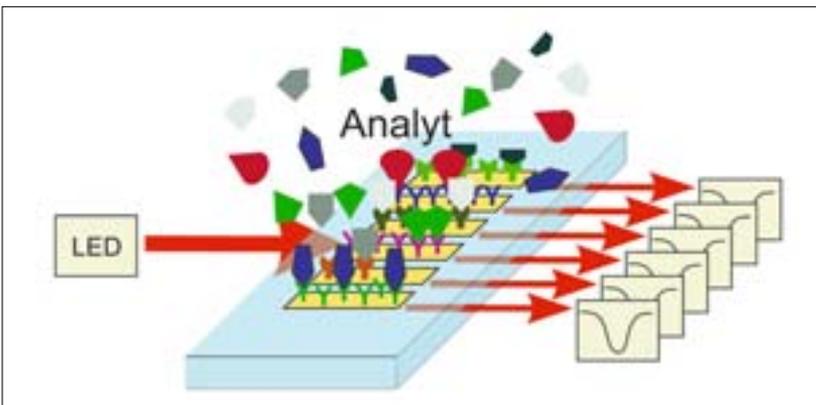
ermöglicht einen hochsensitiven Nachweis ohne den Einsatz zusätzlicher Markierungen, wie z. B. mittels Fluoreszenzmoleküle (Abb. 1). Die Sensorelemente bestehen aus einem optisch transparenten Träger, für den sich aus Gründen der Kosteneffizienz Polymermaterialien wie z. B. PMMA oder TOPAS anbieten. Abb. 2 zeigt ein heißgeprägtes Element, für größere Stückzahlen erfolgt die Herstellung mit Spritzguss.

Sowohl für eine justage-unkritische optische Kopplung mit dem Auswertesystem als auch für eine Vereinfachung des gesamten optischen Aufbaus sind strahlformende optische Elemente in den Träger geprägt /2/. Diese bewirken die Fokussierung kollimiert eingestrahlten Lichts auf die Oberseite des Sensorelements, auf das eine ca. 50 nm dicke Goldschicht aufgebracht ist. Der Messstrahl, der einen Winkelbereich oberhalb der Totalreflexion ausleuchtet, regt damit SPR in der Goldschicht an. Das reflektierte Licht verlässt wiederum kollimiert das Sensorelement und wird mit einer Kamera aufgenommen. Die so detektierte SPR-Kurve zeigt die direkte Abhängigkeit zwischen dem Winkel des Resonanzminimums und der Massenbelegung einer nur wenige 100 nm dicken Oberflächenschicht auf der Goldfläche.

Befinden sich auf der Goldschicht spezifische Rezeptormoleküle, wie z. B. Antikörper, so binden diese nach Zugabe des Analyten ihren entsprechenden Liganden, z. B. das Antigen. Die Anzahl der besetzten Rezeptoren ist dabei abhängig von der Konzentration des Liganden. Der durch diese Bindungsreaktion hervorgerufene Massenzuwachs auf der Goldoberfläche führt zu der Verschiebung des Resonanzminimums und wird als Messsignal detektiert und ausgewertet. Aus ihm ergibt sich die Konzentration der Ligandenmoleküle im Analyten.

Abb. 1: Allgemeines Funktionsprinzip des Sensorelementes mit einer Anordnung paralleler Messflächen.

Fig. 1: Functional principle of the sensor element with an arrangement of parallel measuring spots.



# Miniaturized labelfree detection system

Bürk Schäfer, Norbert Danz, Michaela Harz

## Introduction

Determining the concentration of medically relevant biomolecules and the specific detection of pathogenic germs or their parts is a major task in medical diagnostics. For this purpose the use of marker-free detection methods is becoming more and more important. One of the most ambitious among various methods is surface plasmon resonance [1]. Our goal is the development of an analysis system which is simple to handle and optimized for a fast and parallel determination of a significant number of different parameters for blood or body fluids of patients. The sensor elements are designed as cost-efficient disposables. In the same way the system presented allows for a simple and precise analysis of samples for environmental monitoring or the specific detection of contamination in food supervision if suitable capture molecules are applied.

## Measuring method

The measuring principle of surface plasmon resonance (SPR) allows for high-sensitivity detection or determination of the concentration of biomolecules without the additional use of marker substances such as fluorescence molecules (fig. 1). The sensor elements are made of an optically transparent substrate for which cost-efficient polymer materials such as PMMA or TOPAS are well suited. Fig. 2 shows a sensor element made by hot embossing. If higher quantities are required injection molding should be used.

Beam shaping optical structures, enabling an uncritical optical coupling between the sensor element and the measuring unit as well as simplifying the entire optical set-up, are integrated into the polymer substrate [2].

These structures cause a collimated incoming light beam to be focused on the top of the sensor element, which is coated with a gold layer of around 50 nm thickness. This measuring beam illuminates an angular range above the angle of total internal reflection and excites SPR in the gold layer. The reflected light is re-collimated by the beam shaping structure and subsequently detected by a camera. The SPR angular reflectivity is shown in this image whereby the angle of minimum reflectivity depends on the mass density within a layer of a few 100 nm thickness near the gold surface.

If specific receptor molecules, e. g. antibodies, are immobilized on the gold surface, they will capture its corresponding ligands, e. g. the antigens, after addition of an analyte. The number of occupied receptor molecules depends on the ligand concentration in the analyte. The increase in mass on the gold surface, caused by this coupling reaction results in an angular shift of the resonance minimum. This signal is detected and analyzed.



Norbert Danz



Michaela Harz



Abb. 2: Sensorelement geprägt in Polymer und mit Goldmessflächen strukturiert.

Fig. 2: Sensor element hot embossed onto polymer and patterned with gold spots.

### Aufbau und Datenauswertung

Die Sensorelemente in der Größe eines Objektträgers besitzen eine lineare Anordnung von bis zu 50 Messflächen. Neben einer für Referenz und Kontrollzwecke benötigten Anzahl an Flächen stehen ca. 40 Messflächen, die mit unterschiedlichen Rezeptormolekülen belegt sein können, für die Analyse verschiedener Biomoleküle im Analyten zur Verfügung. Die Referenzmessflächen dienen dabei z. B. einer Temperaturkompensation und damit als Ersatz für eine ansonsten notwendige Temperaturstabilisierung des Sensorelementes.

Weiterhin erfolgt nach einer Aufnahme des Messsignals in TM-Polarisationsrichtung eine Aufnahme des analogen Bildes in TE-Polarisationsrichtung. Dieses enthält keine SPR-Information und ermöglicht damit die Normierung des Messsignals, womit sich eine deutliche Fehlerreduzierung und Erhöhung der Messgenauigkeit ergibt.

Die Erfassung der Messdaten erfolgt automatisiert durch die Steuer- und Auswertesoftware und wird über eine graphische Benutzeroberfläche dargestellt (Abb. 3). Nach dem Start der Datenaufnahme erfolgt die Normierung des Messsignals und daran anschließend die Berechnung der winkelabhängigen Intensitätsprofile für jede Messfläche. Eine Regression dieser Profile mit dem elektrodynamischen Modell des Schichtsystems liefert die Werte für den effektiven Brechungsindex und damit die Massenbelegung der aktiven Rezeptorschicht auf jeder Goldfläche. Daraus kann auf die Konzentration der entsprechenden Ligandenmoleküle im Analyten geschlossen werden. Erfolgt zusätzlich die zeitlich aufgelöste Beobachtung der Bindung, ergeben sich Aussagen über die Reaktionskinetik und damit

die Bindungskonstanten der Reaktionspartner /3/. Eine entsprechende Bindungsreaktion von Immunglobulin G an auf der Sensorfläche immobilisiertem Protein A zeigt Abb. 4. Die Messung erfolgte an einem Sensorelement mit externer Strahlformung.

### Schlussfolgerungen und Ausblick

Das vorgestellte System erlaubt eine einfache und kostengünstige Analyse einer größeren Anzahl verschiedener Biomoleküle, die durch die auf dem Sensorelement immobilisierten Fänger-moleküle bestimmt sind. In einer weiteren Entwicklung des Systems ist die Integration von Lab-on-a-Chip-Strukturen in das Sensorelement geplant /2/. Diese würden z. B. eine Filterung größerer Partikel, gefolgt von einer biochemischen Modifikation des Analyten vor Beginn der Messung und direkt auf dem Sensorelement erlauben. Eine Anzahl von notwendigen Schritten zur Probenvorbereitung wäre damit in den Messablauf integriert und würde eine sichere und schnelle Messung ermöglichen.

#### Literatur:

- /1/ Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G.: „Surface plasmon Resonance sensors: review“, *Sensors and Actuators B54* (1999) 3–15.
- /2/ Danz, N.; Schäfer, B.; Harz, M.; Büttner, A.; Schreiber, P.: „Anordnung und Verfahren zur optischen Detektion von in Proben enthaltenen chemischen, biochemischen Molekülen und/oder Partikeln“, Deutsche Patentanmeldung 103 24 973.7.
- /3/ Green, R. J.; Frazier, R. A.; Shakesheff, K. M., Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.: „Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials“, *Biomaterials* 21 (2000) 1823–1835.

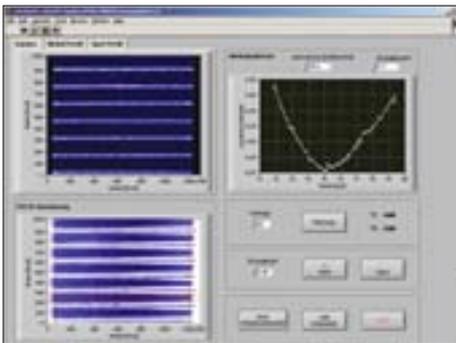


Abb. 3:  
Graphische Benutzeroberfläche zur Steuerung des Messablaufs sowie zur Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.

Fig. 3:  
Graphical user interface for system control, data analysis and display of the results.

## Set up and data analysis

The sensor elements, which have the size of a microscope slide, are coated with a linear arrangement of up to 50 measurement spots. Around 40 of the spots are used for the analysis of different biomolecules in the analyte whereby each spot could be coated with different receptor molecules. The remaining spots are reserved for reference and control measurements. They are used for e. g. temperature control thereby circumventing a hardware temperature stabilization of the sensor element, which would otherwise be necessary.

Furthermore, one image with TM-polarized illumination followed by one image with TE-polarized illumination is taken for each measurement. The TE-image contains no SPR information and is therefore used to normalize the TM-image. This results in a defect reduction and an increase in measurement precision.

The measurement cycle is automated and displayed via the graphical user interface of the control and analysis software (fig. 3). After starting the data acquisition the system normalizes the detected SPR signal followed by a calculation of the angle-dependent intensity profiles for each measuring spot. A regression of this profiles with the electro-dynamical model of the system gives the effective refraction index values of the cladding and hence the mass density of the active receptor layer on the gold surface. The concentration of the corresponding ligand molecules in the analyte is calculated from these values. Furthermore, a time-resolved observation of binding kinetics is available thereby providing information about the coupling constants of the reaction partners /3/.

The binding reaction between immunoglobulin G and immobilized protein A is shown in fig. 4. The measurements were taken with a sensor element with external beam shaping.

## Conclusion and outlook

The system presented allows for a simple and cost effective analysis of a significant number of different biomolecules by immobilizing different specific capture molecules on each measurement spot. Furthermore, the integration of lab-on-a-chip structures into the sensor element is intended in future system development /2/. This would enable e. g. an on-chip filtration or a biochemical modification of the analyte prior to measurement. The integration of required steps for sample preparation into the measurement system leads to an increased sample throughput and measurement stability.

### References:

- /1/ Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G.: „Surface plasmon Resonance sensors: review“, *Sensors and Actuators B54* (1999) 3–15.
- /2/ Danz, N.; Schäfer, B.; Harz, M.; Büttner, A.; Schreiber, P.: „Anordnung und Verfahren zur optischen Detektion von in Proben enthaltenen chemischen, biochemischen Molekülen und/oder Partikeln“, *Deutsche Patentanmeldung* 103 24 973.7.
- /3/ Green, R. J.; Frazier, R. A.; Shakesheff, K. M.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.: „Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials“, *Biomaterials* 21 (2000) 1823–1835.

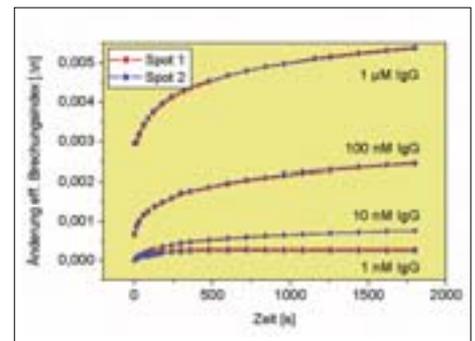


Abb. 4: Reaktionskinetik von humanem Immunglobulin G an immobilisiertem Protein A als Beispiel für eine biochemische Anwendung.

Fig. 4: Binding kinetics of human immunoglobulin G to immobilized protein A as an example of a biochemical application.