

# PARALLELE SPR ALS NACHWEIS- TECHNOLOGIE FÜR DIE BIOSENSORIK

## PARALLEL SPR-BASED BIOSENSOR TECHNOLOGY

Die Beobachtung molekularer Bindungsereignisse an Oberflächen gewinnt in der biochemischen Diagnostik zum Nachweis verschiedener Erreger oder Antikörper zunehmende Bedeutung. Anwendungen reichen von der Umwelt- und Lebensmittelanalytik, über die Veterinär- bis hin zur Humanmedizin. Unter den verschiedenen Verfahren hat sich hierbei die optische Methode der Oberflächenplasmonenresonanz (»surface plasmon resonance« – SPR) als empfindliches, markierungsfreies Messverfahren etabliert. Neben der Nutzung als analytisches Forschungsinstrument steht die Suche nach preiswerten Nachweisplattformen im Vordergrund /1/, wobei die gleichzeitige Beobachtung möglichst vieler Messflächen angestrebt wird.

Hier wurde der Ansatz der monochromatischen, winkel aufgelösten SPR-Messung verfolgt /2/ und als Analysesystem realisiert (Abb. 1). Das Licht einer LED wird als Linie auf die Oberfläche eines Polymerchips (Abb. 2) abgebildet. Mittels einer lateralen Abbildung der Goldoberfläche können eindimensionale Arrays aus mehreren, in einer Reihe angeordneten Messflächen analysiert werden. Dabei wird für jede Position des beleuchteten Streifens das Winkelspektrum der Reflexion in den entsprechenden Spalten des CCD-Detektors

The analysis of molecular binding events at interfaces gains increasing importance in detecting the presence of pathogens or antibodies in biochemical diagnostics. Potential applications range from environmental and food control to veterinary and human diagnostics. Among the wealth of possible approaches, the optical method of surface plasmon resonance (SPR) has been established as a sensitive, label-free tool in biochemical sensing. Besides being used as an analytical research instrument, its extension towards inexpensive platform technologies is currently desired /1/, keeping in mind the necessity of analyzing a large number of measuring spots at the same time.

Here, the approach of the monochromatic, angular resolved SPR measurement has been applied /2/ and set up as an analytical device (Fig. 1). The light of an LED is imaged as a "light stripe" onto the surface of a polymer chip (Fig. 2). The analysis of a one-dimensional array, i.e. the measurement of spots arranged within a single row, becomes possible by means of laterally resolved imaging of the gold surface. Therefore, the angular spectrum of reflected light at every position in the illuminated stripe is separately measured along the columns of the CCD camera. Thus, a characteristic

1 Gerät zur parallelen SPR Messung auf polymeren Chips.

2 SPR Chip mit integrierten mikrooptischen Elementen.

1 Device for parallel SPR analysis on polymer chips.

2 SPR chip with integrated micro optical elements.

gemessen. Dies liefert ein charakteristisches Minimum, dessen Verschiebung ausgewertet wird. Als Substrate der Messung dienen spritzgegossene Chips aus Topas® (KDS Radeberg), in die bereits optische Funktionen zur Kopplung zwischen Gerät und Chip integriert sind, um immersionsfreies Arbeiten zu ermöglichen.

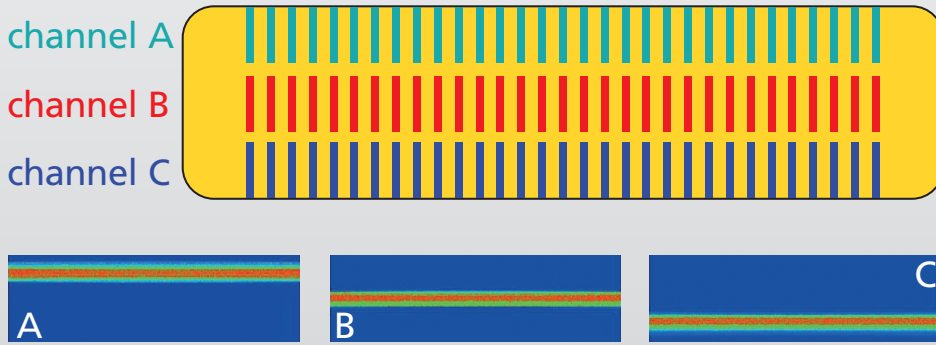
Erste Applikationen, wie die Detektion von Antikörpern gegen den Zytomegalie-Virus im Spenderserum oder der Nachweis unterschiedlicher DNA- oder RNA-Sequenzen, wurden erfolgreich demonstriert /3/. Die Anzahl der Messflächen ist dabei durch die Spaltenanzahl des verwendeten CCD-Detektors und die optische Auflösung des lateral abbildenden Systems beschränkt. Die Erweiterung des SPR-Ansatzes auf zwei-dimensionale Arrays von Messflächen bedingt normalerweise den Verzicht auf winkelaufgelöste Messungen. Hier wurde ein alternativer Ansatz gewählt, um eine größere Anzahl von Messflächen detektieren zu können. Eine segmentierte Lichtquelle beleuchtet drei nebeneinander liegende Streifen und erlaubt damit die Beobachtung von drei separaten eindimensionalen Spotarrays (Abb. 3). Die Messungen der drei Arrays erfolgen nun sequentiell, wobei trotzdem zeitaufgelöste Analysen mit einer Auflösung unter einer Sekunde erreicht werden. Abhängig von der angestrebten Applikation können unterschiedliche mikrofluidische Systeme für die Probenzufuhr mit dieser Nachweisplattform kombiniert werden.

Aktuell wird das SPR System zur schnellen Detektion genetischer Variationen qualifiziert /4,5/. Dabei sind die Produkte einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Biotype) durch 25 Basen lange, einsträngige DNA (»Tag«) markiert. Die komplementäre, einsträngige DNA-Sequenz (»Anti-Tag«) wird auf der Goldoberfläche des Chips mit einem Spotter (GeSiM mbH) strukturiert immobilisiert. Abbildung 4 zeigt die orts aufgelöste Veränderung des SPR-Signals nach der Bindung von PCR-Produkten an alle Messflächen und demonstriert

minimum of reflectivity is obtained and its shift is analyzed. As a result of integrating optical functionality into the injection molded Topas® chips (KDS Radeberg) no kind of immersion is needed for optical coupling between the chip and the device.

Example applications have been shown previously, e.g. the detection of antibodies against the cytomegaly virus in donor blood serum or the recognition of different DNA or RNA sequences /3/. Unfortunately, the number of measurement spots is limited by the number of columns of the CCD detector as well as the lateral resolution of the optical imaging system. Extending the SPR principle towards two-dimensional arrays usually requires dropping all angular resolution and related analysis. Here, another approach has been put forth in order to increase the number of spots to be analyzed. A segmented light source illuminates three neighboring stripes, corresponding to the analysis of three separate one-dimensional arrays of spots (Fig. 3). The analysis of these arrays is performed sequentially, still reaching a temporal resolution of analysis below one second. Different micro fluidic systems for sample delivery can be combined with this device depending on the desired application.

The system is currently established for the fast detection of genetic variations by SPR /4,5/. For this purpose, the products of a multiplexed polymerase chain reaction (PCR, Biotype) are tagged with specific 25 bases long, single-stranded DNA ("tag"). The complementary, single-stranded DNA sequence ("anti-tag") is immobilized as a spot pattern on the gold surface by means of spotting (GeSiM mbH). The spatially resolved SPR signal shift due to DNA binding onto 60 spots, except onto nine reference spots, is given in Fig. 4. It demonstrates the analysis of 60 measuring spots within a single channel of the system. The specificity of this detection is also given in Fig. 5. The signal values shown represent the averaged signals of nine experiments that have been performed on a single



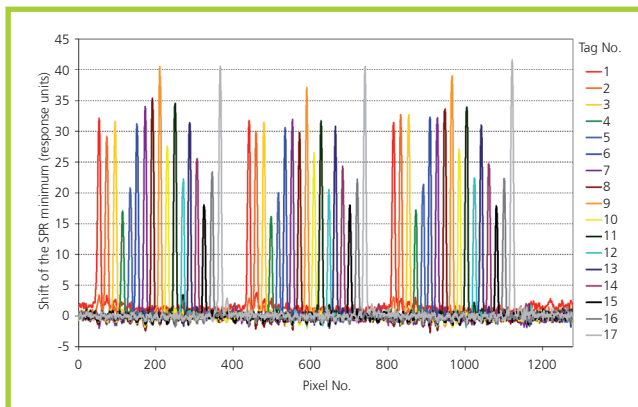
3

die Beobachtung von 60 Messflächen in einem der drei Messkanäle. Die Spezifität des Nachweises kann auch Abb. 5 entnommen werden. Die dargestellten Signale sind die Mittelwerte von neun Experimenten auf einem einzelnen Chip, da in jedem der drei Messkanäle alle Messflächen dreifach präpariert wurden /4/. Damit konnte die parallele Detektion von 180 Messflächen auf einem SPR-Polymerchip demonstriert werden.

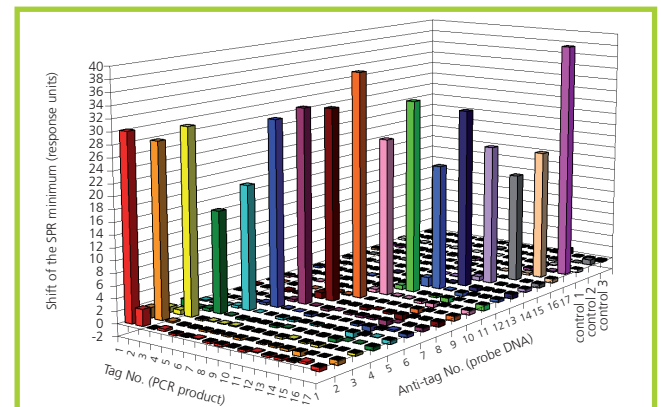
chip by preparing all spots threefold in each of the three channels /4/. Therefore, the parallel SPR analysis of 180 spots on a polymer chip could be demonstrated.

Besonderer Dank gilt dem BMBF und allen Partnern im BMBF-Projekt »SPR-Biochips« (FKZ 03WKBH2), insbesondere KDS Radeberg und Biotype AG Dresden.

We acknowledge the BMBF and the fruitful cooperation with all partners in the BMBF funded project "SPR-Biochips" (FKZ 03WKBH2), especially KDS Radeberg and Biotype AG Dresden.



**4** Hybridisierungssignale von einsträngiger DNA an 60 Spots (3 Blöcke mit je 17 komplementären und drei nicht komplementären Anti-Tags als Kontrolle), wobei an den 9 Kontrollspots keine Bindung beobachtet wird. / Hybridization signals of single-stranded DNA onto 60 spots (3 blocks with 17 complementary and three non-complementary anti-tags as references) without binding at the reference spots.



**5** Dreidimensionale Darstellung der Signale verschiedener PCR Produkte mit 25 Basen langen, einsträngigen PCR Tags auf den entsprechenden Anti-Tag-Spots /4/. / Three-dimensional diagram of signals due to the interaction of different PCR products with 25 bases long, single-stranded DNA tags on the corresponding anti-tag spots /4/.

## Literatur/References

/1/ Hoa, X.D.; Kirk, A.G.; Tabrizian, M.: Towards integrated and sensitive surface plasmon biosensors: a review of recent progress, *Biosens. & Bioelectron.* 23 (2007) 151-160.

/2/ Danz, N.; Hofmann, A.: Plasmonenresonanzsensor, DE102006041338.

/3/ Sonntag, F.; Schmieder, S.; Danz, N.; Mertig, M.; Schilling, N.; Klotzbach, U.; Beyer, E.: Novel lab-on-a-chip system for label-free detection of DNA hybridization and protein-protein interaction by surface plasmon resonance (SPR), *Proc. SPIE* 7365 (2009) 73650Q.

/4/ Mertig, M.; Kick, A.; Bönsch, M.; Katzschner, B.; Voigt, J.; Sonntag, F.; Schilling, N.; Klotzbach, U.; Danz, N.; Begemann, S.; Herr, A.; Jung, M.: A Novel Platform Technology for the Detection of Genetic Variations by Surface Plasmon Resonance, *IEEE SENSORS* (2009) 392 – 395.

/5/ Kick, A.; Bönsch, M.; Begemann, S.; Sonntag, F.; Schilling, N.; Voigt, J.; Katzschner, B.; Herr, A.; Danz, N.; Howitz, S.; Klotzbach, U.; Jung, M.; Brabetz, W.; Mertig, M.: SPR-basierte DNA-Mikroarrays, *Proc. 9. Dresdner Sensor-Symposium* (2009).

3 *Anordnung der drei Spotarrays (oben) und simulierte Beleuchtungsintensitäten (unten). / Arrangement of the three spot arrays (top) and simulated illumination intensity distributions (bottom).*

## AUTHORS

*Norbert Danz*

*Bernd Höfer*

*Frank Sonntag<sup>1</sup>*

*Alfred Kick<sup>2</sup>*

*Udo Klotzbach<sup>1</sup>*

*Michael Mertig<sup>2</sup>*

*Ralf Rosenberger*

*Harald Kießling*

*Wolfgang Buss*

<sup>1</sup>*Fraunhofer IWS Dresden*

<sup>2</sup>*Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien und Institut für Werkstoffwissenschaft, Technische Universität Dresden*

## CONTACT

*Dr. Norbert Danz*

*Phone +49 3641 807-750*

*norbert.danz@iof.fraunhofer.de*

*Dr. Andreas Bräuer*

*Phone +49 3641 807-404*

*andreas.braeuer@iof.fraunhofer.de*