

# Advanced sensing and quantification strategies using DNA and living cell based materials

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Mora, Carlos A.

**Publication date:**

2016

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010670028>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH No. 23426

**Advanced sensing and quantification strategies  
using DNA and living cell based materials**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

CARLOS ANDREA MORA

MSc ETH Biology

born on 27.07.1987

citizen of Zurich (ZH) and Capriasca (TI),  
Switzerland

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Wendelin J. Stark, examiner*

*Prof. Dr. Andrew J. deMello, co-examiner*

2016

---

## Zusammenfassung

Die hier vorliegende Doktorarbeit beschreibt die Entwicklung, Untersuchung und Anwendung von neuen Quantifizierungs- und Sensorwerkzeugen basierend auf biologisch inspirierten Materialien. Das Ziel dieser Arbeit ist es zu zeigen, dass diese Werkzeuge effiziente Quantifizierungsstrategien in wissenschaftlichen Disziplinen wie Ökologie, Umwelt- und Gesundheitswissenschaften darstellen und das Potential haben, existierende Techniken zu ersetzen, welche teurer, arbeits- und zeitaufwändiger sind und/oder grosses technisches Knowhow und Laborinfrastruktur voraussetzen.

**Kapitel 1** führt in das Thema der Quantitativen Analyse ein und gibt einen kurzen Überblick über quantitative analytische Prozesse, Methoden und Strategien, gefolgt von einer Beschreibung, wie bestimmte Erkenntnisse der biologischen Wissenschaftsdisziplinen die Quantitative Analyse in verschiedenen Bereichen revolutioniert hat. Zum Beispiel hat die Anwendung von Biomolekülen wie Enzymen, Immunglobulinen, Nukleinsäuren sowie lebendigen Zellen zur Entwicklung von besseren analytischen Werkzeugen geführt, besonders im Hinblick auf die Messung von bioaktiven Substanzen. Zwei unterschiedliche Anwendungen und ihre zugrundeliegenden Konzepte werden im Detail erläutert: (1) Die Einkapselung von Nukleinsäuren in amorphem Siliziumdioxid (Silica), was zu vielseitig verwendbaren Markierungsmaterialien, den sogenannten ‘silica particles with encapsulated DNA’, abgekürzt SPED, geführt hat. (2) Das Einbetten von lebendigen Zellen in flache Polymerfolien, wodurch lebendige Hybrid-Materialien geschaffen werden, welche unter anderem zur Quantifizierung von chemischen Analyten verwendet werden können.

In **Kapitel 2** wird gezeigt, wie man SPED als quantitatives Werkzeug für die Untersuchung und Beobachtung ökologischer Netzwerke wie z.B. Nahrungsketten verwenden kann. Ökologische Netzwerke sind extrem komplex, können jedoch wichtige Information über die Belastbarkeit und momentanen Zustand eines Ökosystems liefern. In vielen Fällen ist es nicht möglich trophische Interaktionen, das heisst Interaktionen zwischen Räuber und Beute, direkt zu beobachten und es ist mit den heute verfügbaren Methoden schwierig, diese Interaktionen zu quantifizieren. Die Studie ergab, dass man mit SPED Nahrungsquellen sowie Lebewesen spezifisch markieren kann und dass es möglich ist, den Mengentransfer zwischen Nahrungsquelle und Tier und/oder zwischen Tieren (Beute und Räuber) über mehr als eine trophische Stufe zu quantifizieren. SPED waren vom Anfang bis zum Ende einer zweistufigen Arthropoden-Nahrungskette transferier- und quantifizierbar, wurden in das Verdauungssystem der untersuchten Tiere aufgenommen und konnten in den markierten Tieren über mehrere Tage

nachgewiesen werden. Wenn unterschiedlich markierte SPED in vordefinierten Mengenverhältnissen verwendet wurden, konnte festgestellt werden, dass diese Information über trophische Stufen und über die Zeit in den Tieren erhalten blieb. SPED wurden auch für die Untersuchung der Blütenpräferenz von Fliegen verwendet und erwiesen sich als schnelle und genaue Analysemethode für diese Art von Untersuchungen.

Neben Tierinteraktionen können SPED auch verwendet werden, um chemische Substanzen wie z.B. Pestizide oder andere anthropogene Substanzen in der Umwelt zu verfolgen, um deren Ursprung zu finden oder deren exakte Konzentration zu ermitteln. Das Aufkommen von landwirtschaftlichen Technologien mit geringerer Pestizidanwendung, wie z.B. der biologische Landbau, machen es notwendig, dass quantitative Werkzeuge entwickelt werden, welche die Pestizidabdrift bei tiefen Konzentrationen messen können und kosteneffektive Multiplex-Experimente erlauben. In **Kapitel 3** wird gezeigt, dass SPED stabil in organische und anorganische Pestizide eingebracht und wieder zurückgewonnen werden können. In Feldexperimenten konnten sehr tiefe Pestizidkonzentrationen bis zu 1 Nanoliter pro Quadratzentimeter quantifiziert werden, nachdem ein hindernisfreies Feld sowie eine Apfelbaumplantage mit einer mit 5.8 Milligramm pro Liter SPED-markierten Testflüssigkeit besprüht worden war. Windmuster und die Beschaffenheit des untersuchten Feldes bzw. Plantage waren durch die Analyse der SPED-Verteilung klar nachvollziehbar.

In **Kapitel 4** wird ein neuartiges Sensormaterial präsentiert, welches bioaktive Moleküle von flüssigen Proben quantifizieren kann. Das Ziel war es ein günstiges und einfach zu bedienendes Werkzeug zu schaffen, welches krankheitsrelevante Moleküle messen kann. Der sogenannte 'living material-based analytical sensor', abgekürzt LiMBAS, beinhaltet lebende, genetisch-modifizierte Bakterien der Spezies *Escherichia coli* zwischen einer nanoporösen Deckmembran und einer nicht-porösen Bodenmembran. Er kann die krankheitsrelevanten Oligosaccharide Laktose (Milchzucker) und Galaktose quantifizieren. Nachdem man einen Tropfen mit einem Volumen von 1 - 10 Mikroliter einer zu untersuchenden Probe auf die poröse Sensoroberfläche platziert hat, reagieren die im Sensor eingeschlossenen Mikroorganismen mit der Expression von fluoreszierenden Proteinen. Dadurch visualisieren sie das Diffusionsverhalten des zu messenden Moleküls, wovon dessen Konzentration abgeleitet werden kann. Nach Inkubation bei Raumtemperatur wird das flache, halb-transparente Sensormaterial über eine blaue Lichtquelle gehalten und damit die fluoreszierenden Flächen sichtbar gemacht. LiMBAS konnte die Konzentrationen von Laktose oder Galaktose in unverdünnten Nahrungsmittelproben genau bestimmen und war fähig die Konzentration dieser Moleküle in

einem Bereich zwischen 1 – 1000 Millimol pro Liter zu messen, was dem relevanten Konzentrationsbereich z.B. bei krankheitsbedingten Nahrungsmittelintoleranz entspricht. Das Sensormaterial konnte bei Kühlschranktemperaturen über mindestens sieben Tage gebrauchsbereit gelagert werden ohne an Funktionalität einzubüßen.

In **Kapitel 5** wird die Bedeutung der Ergebnisse der vorherigen Kapitel nochmals kurz rekapituliert und ein Ausblick auf Verbesserungsmöglichkeiten und denkbare Anwendungen von SPED und LiMBAS gegeben.

## Summary

The present thesis describes the development, investigation and application of novel analytical quantification and sensing tools based on bioinspired materials. The overall goal of this dissertation is to demonstrate that these tools represent efficient quantification strategies in fields such as ecology, environmental and health sciences, and have the potential to substitute existing techniques that are costlier, more laborious, and more time-intensive, and/or require a high level of technical skills and laboratory infrastructure.

**Chapter 1** introduces the topic of quantitative analysis by providing a brief overview of quantitative analytical processes, methods and strategies followed by a description of how certain findings from biological disciplines revolutionized quantitative analysis in many aspects. The application of biomolecules such as enzymes, immunoglobulins or nucleic acids, as well as living cells in quantitative analysis have led to the development of better analytical tools, especially for the measurement of bioactive substances. Two different applications and their underlying concepts are elucidated in detail: (1) The encapsulation of nucleic acids in amorphous silicon dioxide (silica) resulting in versatile quantitative tracers, the so called ‘silica particles with encapsulated DNA’ (SPED). (2) The embedding of living cells in flat polymer sheets creating living hybrid-materials able to quantify chemical analytes.

In **Chapter 2**, the concept of using SPED as quantitative tool for investigating and monitoring ecological networks such as food webs is demonstrated. Ecological networks are extremely complex and can provide important information about the robustness and present condition of an ecosystem. In most cases it is not feasible to directly observe trophic interactions, i.e., interactions between predators and prey, and with the currently available methods it is difficult to quantify the connections between them. With SPED, specific food source as well as organism labeling and quantification of food-to-animal and animal-to-animal transfer over more than one trophic level are possible. SPED were readily transferable and quantifiable from the bottom to the top of a two-level food chain of arthropods, were taken up in the gut system of the investigated animals, and remained persistent in the labeled animals over several days. When differently labeled SPED were applied at predefined mass ratios it was found that information about their relative abundance was reliably conserved after trophic level transfer and over time. SPED were also applied to investigate the flower preference of fly pollinators and proved to be a fast and accurate analysis method.

Besides animal interactions, SPED could be also used to trace chemical substances in the environment such as pesticides or other anthropogenic substances in order to find their original

source or to evaluate their exact concentrations. The rise of agricultural techniques with reduced pesticide usage, such as organic farming, makes it necessary to develop tools that efficiently assess pesticide drift at low concentrations and allow cost-effective multiplexing experiments. **Chapter 3** shows that SPED can be stably incorporated and recovered from inorganic and organic pesticides. In field experiments, very low pesticide deposits down to 1 nanoliter per square centimeter could be quantified after spraying a SPED-labeled test liquid containing 5.8 milligrams per liter SPED on an obstacle-free field and an apple orchard. Based on the analysis of the SPED distribution, wind and field-related patterns were clearly traceable.

**Chapter 4** presents a novel sensor material to quantify bioactive molecules from liquid samples with the aim to provide an easy-to-handle and inexpensive quantitative tool to detect disease-relevant molecules. The so-called living material-based analytical sensor (LiMBAS) contains living genetically-modified *Escherichia coli* bacteria between a nanoporous and a support polymer foil for a facile quantification of disease-relevant oligosaccharides lactose and galactose. After putting a droplet with a volume of 1 – 10 microliters of a sample onto the porous sensor surface, the enclosed microorganisms react by expressing fluorescent proteins thereby visualizing the diffusion behavior of the molecule of interest. From that, the original concentration of the analyte can be deduced. After incubation at ambient environmental conditions, the fluorescent diffusion zones were made visible by holding the half-transparent material over a blue-light source. LiMBAS could accurately quantify concentrations of lactose or galactose in undiluted food samples and was able to measure food intolerance relevant concentrations from 1 - 1000 millimol per liter. At fridge temperatures, the ready-to-use sensing material was storable for at least seven days without losing functionality.

**Chapter 5** concludes the preceding chapters and gives an outlook on the further improvements and applications of SPED as well as LiMBAS.