

DISS. ETH Nr. 11124

**OPTISCHE VERFAHREN BASIEREND AUF FLUORESZENZ
UND OBERFLÄCHENPLASMON-RESONANZ ZUM NACHWEIS
VON BIO-ANALYTEN**

ABHANDLUNG
Zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Francis Walter Müller

Dipl. Phys. ETH

geboren am 7. Dezember 1944
von Steinmaur ZH

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. W. Lukosz, Referent
Prof. Dr. U. P. Wild, Korreferent

1995

KURZFASSUNG

Untersucht werden optische Detektionsmethoden zu Diagnostikverfahren von biologischen Molekülen. Als biologisches Material dienen Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Proteine wie Antikörper. Nach Erläuterung der Grundbegriffe DNA-Hybridisierung und DNA-Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR), wird der Stand der Technik der Assay-Detektion dargelegt. Um sich von den üblichen Nachteilen der radioaktiv oder enzymatisch markierten Assays zu befreien, werden Fluoreszenz und Oberflächenplasmon-Resonanz Techniken angewendet.

Komplexe des Rutheniums enthüllen sich als praktisch ideale Fluoreszenzmarker. Insbesondere $\text{Ru}^{2+}(\text{Bathophenanthrolin})_3$ -Komplexe, kurz $\text{Ru}^{2+}(\text{batho})_3$, mit einer Fluoreszenz-Abklingzeit von 4,5 μs , erlauben zeitaufgelöste Messungen und dadurch eine Diskriminierung zwischen Signal- und Hintergrund-Fluoreszenz. Dies führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit. Die Detektionsgrenze liegt bei $1 \cdot 10^{-14}$ M.

Der Ru-Komplex wird als Energie-Akzeptor in einem Förster Energie-Übertragungssystem eingesetzt, um eine homogene, empfindliche und spezifische Detektion der DNA-Hybridisierung zu realisieren. Dabei wird das 5'-Ende einer Oligonucleotid Sonde mit $\text{Ru}^{2+}(\text{batho})_3$ markiert. Der Energie-Donor, das 6,7-Dimethyl-Lumazin, lässt sich leicht an verschiedenen Stellen des gleichen oder eines komplementären Strangs einbauen. Die Energie-Übertragung wird intramolekular — innerhalb eines Einzelstrangs — und intermolekular — im Falle der Hybridisierungsdetektion — nachgewiesen. Trotz guter Spektraleigenschaften der beiden Fluorophore bleibt die Energie-Übertragung schwach, ca. 13%, wenn sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe befinden. Durch spezifische Hybridisierung resultiert die Energie-Übertragung von 4 eingebauten Lumazinen zum Ru-Komplex in einer Verdoppelung der Signal-Fluoreszenz.

Mit dem Austausch eines Bathophenanthrolin-Liganden durch Dipyridophenazin wird die Lumineszenz des Ru-Komplexes in Abwesenheit von DNA vollständig gelöscht. Der Komplex fluoresziert hingegen in Anwesenheit von doppelsträngiger DNA. Ob dieser molekulare Lichtschalter durch die Interkalation des Dipyridophenazin-Liganden in die DNA auch als neue Methode für eine homogene DNA-Hybridisierung fungieren kann, wurde geprüft. Es hat sich herausgestellt, dass der Komplex schon in Anwesenheit von einzelsträngiger DNA eine erhebliche Lumineszenz zeigt, die zu einer nicht mehr diskriminierbaren Hintergrund-Fluoreszenz führt. Dieser Lichtschalter ist für eine Hybridisierungsdetektion ungeeignet, weil er zugleich mangelnde Sensitivität aufweist. Die Detektionsgrenze liegt bei 10^{-9} - 10^{-10} M.

Mit der 10^9 -fachen spezifischen Amplifikation einer DNA-Sequenz durch die PCR ist eine extrem hohe Detektionsempfindlichkeit allerdings kein absolut zwingender Parameter, sondern die Durchführbarkeit des Assays. In diesem

Zusammenhang bietet die Technik der Oberflächenplasmon-Resonanz eine Möglichkeit durch eine spezifische Detektion der amplifizierten DNA ohne Markierung.

Zur Detektion der DNA-Hybridisierung werden adäquate DNA-Sonden — verdünnt mit Molekülen, die unspezifische Adsorption verhindern sollen — auf einer Goldoberfläche einer Glasplatte immobilisiert. Diese Immobilisierung wird mit der Langmuir-Blodgett Technik realisiert, wobei die DNA-Sonden mit Thioalkan-Ketten zu modifizieren sind. Hybridisierungsversuche mit komplementärem und nicht-komplementärem Strang zeigen eine Detektionsempfindlichkeit von 15 pg/mm^2 für ein 16-Oligomer. Unspezifische hybridisierte DNA wird mit einer Puffer-Spülung bei Temperaturen leicht unter der Schmelztemperatur völlig gewaschen.

Ein speziell dafür entwickelter und hergestellter Film-Temperatursensor aus Pt, welcher die Temperatur in der $40 \text{ }\mu\text{m}$ -Küvette selber misst, ermöglicht eine Thermostatisierung der Küvette und die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Oberflächenplasmon-Resonanz. Diese wird hauptsächlich durch die Brechzahländerung des Deckmediums mit der Temperatur verursacht. Für Wasser resultiert daraus eine Verschiebung zu kleineren Resonanzwinkeln von $0,015^\circ$ pro $^\circ\text{C}$ im Temperaturbereich von $20\text{-}40^\circ\text{C}$. Die Küvetten-Thermostatisierung gestattet zugleich die Temperaturprofile zu fahren, die für PCR erforderlich sind.

Basierend auf der Lösung der Fresnel-Gleichungen offenbaren theoretische Modellberechnungen einerseits gute Übereinstimmung mit den gemessenen Resonanz-Winkeln bei der Hybridisierung und andererseits, dass die Empfindlichkeit für eine Detektion während der PCR durch einen einfachen Temperatursprung ausreicht. Je nach Anzahl Startkopien ab Zyklus 9 oder 30, ohne Markierung, Hinzufügen von Reagenzien, mechanische Manipulation oder Waschschrift. Bei einer Auflösung des Resonanz-Winkels von $0,002^\circ$ beträgt die theoretische Detektionsempfindlichkeit $7,5 \text{ pg/mm}^2$.

ABSTRACT

The use of optical detection methods for the diagnosis and analysis of biological molecules has been investigated. The methods were tested using deoxyribonucleic acid (DNA) and proteins, such as antibody molecules. The basic concepts, DNA-hybridisation and DNA-amplification through polymerase chain reaction (PCR), are presented and state-of-the art assay detection is reviewed. In this work fluorescence and surface plasmon resonance are used in order to circumvent the drawbacks of the commonly used radioactive and enzymatic assays.

Complexes of ruthenium practically reveal fluorescence markers of choice. Particularly, $\text{Ru}^{2+}(\text{bathophenanthroline})_3$ complexes, shortly $\text{Ru}^{2+}(\text{batho})_3$, allow time-resolved measurements because of their fluorescence lifetime of 4.5 μs . This makes it feasible to discriminate signal-fluorescence against background leading to higher sensitivity with a detection limit in the range of $1 \cdot 10^{-14}$ M.

In order to obtain an homogeneous, sensitive and specific detection of DNA hybridisation, the Ru-complex is used as an energy acceptor in a Förster energy transfer system. To this purpose, the 5'-terminal of an oligonucleotide probe is labelled with $\text{Ru}^{2+}(\text{batho})_3$. The energy donor is 6,7-dimethyl-lumazine that can be easily built in at various locations in the same or in a complementary strand. Although weak, intra and intermolecular energy transfer can be demonstrated. It amounts 13% when donor and acceptor are in nearest vicinity, despite suitable spectroscopic properties of both fluorophores. Specific hybridisation gives rise to a doubling of the signal-fluorescence through energy transfer from 4 built-in lumazines to the Ru-complex.

With the substitution of dipyrrophenazine for one bathophenanthroline ligand the Ru-complex luminescence appears to be totally quenched by water. It does however fluoresce in the presence of double-stranded DNA. The application of this molecular light switch in an homogeneous DNA-probe assay through intercalation of the dipyrrophenazine ligand into DNA has been investigated. It was found that the complex already shows emission in the presence of single-stranded DNA. This high induced background and a weak sensitivity do not make the complex suitable for hybridisation detection. The detection limit is about 10^{-9} to 10^{-10} M.

With the high rate of specific DNA amplification by PCR, an extremely high sensitivity is no longer an essential parameter, in contrast the feasibility of the assays is imperative. In this respect the technique of surface plasmon resonance can be used as specific detection at the surface without labelling. For hybridisation detection adequate DNA-probes, diluted with molecules that prevent non-specific adsorption, are immobilised onto a thin-film of gold deposited on a microscope glass slide. The immobilisation is performed with the Langmuir-Blodgett technique where the DNA-probes are made amphiphilic

by modifying them with thioalcanes-chains. Hybridisation experiments with complementary and non-complementary strands show a detection sensitivity of 15 pg/mm^2 for a 16-oligomer. Non-specific hybridisation is totally washed down by flushing the cuvette with buffer at a temperature slightly lower than the melting temperature.

A specially developed and produced Pt-film temperature-sensor, which measures the temperature in the $40 \text{ }\mu\text{m}$ cuvette itself, allows the thermostatization of the cuvette and the investigation of the temperature-dependence of the surface plasmon resonance. This dependence is mainly due to the change of the refractive index of the cover medium with the temperature. For water, the shift of the resonance angle toward smaller angles is found to be $0,015^\circ$ per $^\circ\text{C}$ in the temperature range of 20 to 40°C . Further, the cuvette thermostatization allows runs of temperature-profiles as used in PCR such that the apparatus can be served as a thermocycler with integrated detection.

Based on the solution of the Fresnel equations, model computations reveal not only good agreement with the measured resonance angles but also the potential detection during PCR. Through a jump to lower temperatures, in order to let the amplicons hybridise to the immobilised probes, it is possible to monitor PCR on-line. From cycle 9 or cycle 30, according to the number of start copies, without any labelling, addition of reagents, mechanical manipulations or washing steps. The theoretical detection sensitivity is 7.5 pg/mm^2 for a resolution of the resonance angle of 0.002° .