

Diss. ETH No. 13873

Surface Modification for Optical Biosensor Applications

for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

presented by

ROLF HOFER

Dipl. chem., University of Fribourg, Switzerland

born February 3, 1961

citizen of Langnau i.E., Bern

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. N.D. Spencer, examiner

Dr. M. Textor, co-examiner

Dr. M. Ehrat, co-examiner

Zürich, 2000

Abstract

Abstract

The thesis covers the development of two novel surface modification systems based on monomolecular assembly of functionalized molecules on oxide surfaces and their successful application for optical bioaffinity sensor chips. One or both of the two techniques developed will be used in the near future to fabricate optical waveguide chips on a commercial scale by the industrial project partner, thanks to the combination of technical performance, ease of application and cost-effectiveness of the developed technology.

Bioaffinity sensors typically use the concept of specific, biological interactions between immobilized recognition elements (antibodies, enzymes, nucleic acids, ...) and their corresponding target molecules (antigen, substrate, complementary nucleic acids, ...) in an analyte solution for application in medical diagnostics, drug development and high throughput screening. The analytical requirements, in particular the sensitivity and selectivity of an particular affinity assay, depend on both the type of detection technique and the architecture of the transducer/analyte interface. The latter is particular critical to the sensor performance and reliable, cost-effective surface functionalization techniques are urgently needed to satisfy the needs of a rapidly growing market.

The thesis focusses on detailed studies of spontaneously formed, organized monolayers of long-chain alkanephosphates and of poly(ethylene oxide) grafted poly-lysine copolymers on optically transparent, high-refractive-index thin films such as tantalum, niobium and titanium oxides, the study of their interfacial chemistry and physico-chemical behavior, and their quantitative performance in model bioaffinity sensor assays. The requirements and objectives for the biosensor surfaces were: high optical transparency, high sensitivity, high specificity and general applicability for the reproducible immobilization of recognition elements and detection of the corresponding target molecules.

Abstract

- a) The high optical transparency was a fundamental condition, since the biosensor surfaces are to be part of an *evanescent field waveguide optical sensor system*. The apparatus used for testing the performance of the adlayers consists of a planar waveguide. The optical signal for the analyte detection is measured through the sensor surface and its support. As waveguiding layers, highly transparent, high refractive index (tantalum pentoxide) coated glass chips were used.
- b) The *high sensitivity* is obtained by selective excitation of fluorescent chromophores of tracer molecules immobilized at the sensor/analyte interface and excited by the evanescent field of the planar waveguide. This allows the detection of surface species with almost no contribution from the bulk solution.
- c) The *high specificity* is reached by minimization of non-specific binding of the target molecules and tracers at the sensor surface and optimization of specific binding by the optimized immobilization of recognition molecules (e.g. antibodies). As a model bioaffinity assay system, an antigen/antibody reaction based on immunoglobulin (rabbit-IgG/anti-rabbit-IgG) was selected.
- d) Two general sensor *interface platforms* were developed and tested according to c): The first consists of the formation of *self-assembled monolayers (SAMs)* of *alkyl phosphates and phosphonates* at the metal oxide surfaces. Such SAMs form two-dimensionally ordered, highly hydrophobic surfaces that strongly adsorb albumin, thus reducing non-specific adsorption to very low values. The binding of biotin-conjugated bovine serum albumin (BSA-biotin) proved to be a viable technique to produce biotin-activated surfaces that can be further functionalized using streptavidin. The second development covers the modification of the oxide surface with poly(ethylene glycol)-grafted copolymers. *Poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine (PLL-g-PEG)*, charged positively at physiological pH, adsorbs to negatively charged oxide surfaces by electrostatic interactions. The polymer architecture was optimized in terms of the molecular weights of the PLL and PEG constituents and of the grafting ratio PEG/PLL. Extremely low values of non-specific adsorption in full serum (generally less than $3 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$)

Abstract

corresponding to typically less than 0.1% of a typical protein monolayer) could be realized. Again, functionalization via biotin conjugation (terminal PEG-chain functionalization) was used to perform biotin/streptavidin-based bioaffinity model assays and to determine the comparative sensing performance of the two surface modification techniques developed.

It was demonstrated that both surface modification routes provide excellent general platforms on which streptavidin-conjugated recognition molecules can be successfully immobilized. In addition it is also possible to form a streptavidin adlayer on these platforms followed by immobilization of biotin-conjugated recognition molecules. Within the framework of the thesis it has been shown that effective target molecule concentrations in the femtomolar region could be easily detected, even in total serum samples and without any sample pretreatment such as extraction or purification.

The combination of optimized interfacial chemistry, the optical transducer, and the assay architecture resulted in a optimum performance system that has a high potential for immunoassay applications in the future.

Zusammenfassung

Die Doktorarbeit beschreibt die Entwicklung zweier neuartiger Oberflächenmodifikations-Systemen, welche auf der Bildung von selbstorganisierten, monomolekularen Adsorptionsschichten an Metalloxidoberflächen und deren erfolgreichen Anwendung auf dem Gebiete der optischen Biosensorik basieren. Eine (oder evtl. beide) der entwickelten Techniken wird in nächster Zukunft Anwendungen zur Herstellung optischer Wellenleiter finden, welche in kommerziellem Massstab hergestellt werden sollen. Diese, durch den industriellen Projektpartner angestrebte Anwendung wird durch die optimale Kombination technischer Leistungsfähigkeit, einfacher Anwendbarkeit und Kostengünstigkeit der entwickelten Technologie ermöglicht.

Bioaffinitäts-Sensoren basieren typischerweise auf dem Prinzip der spezifischen, biochemischen Wechselwirkung zwischen immobilisierten Erkennungselementen (Antikörper, Enzyme, Nucleinsäuren, ...) und deren entsprechenden Bindungspartnern (Antigen, Substrat, komplementäre Nucleinsäuren, ...). Solche Sensoren finden unter anderem Anwendung in der medizinischen Diagnostik, der Pharmaforschung sowie zur Bewältigung von grossem Probendurchsatz in der Analytik. Das Erreichen der analytischen Anforderungen, insbesondere die hohe Empfindlichkeit und Selektivität, an die einzelnen Affinitätsassays, hängt von der Detektionstechnik sowie von der Architektur der Transducer/Analyt-Grenzfläche ab. Letzteres ist insbesondere massgebend für die Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit der Sensoren. Kostengünstige Oberflächenfunktionalisierungs-Techniken sind dringend gefragt, um der rasch steigenden Nachfrage und dem wachsenden Markt zu genügen.

Das Hauptgewicht der Doktorarbeit liegt in den detaillierten Untersuchungen spontan gebildeter Monoschichten von langkettigen Alkylphosphaten und -phosphonaten sowie Polyethylenglycol-Polylysin – Copolymeren an optisch transparenten Metalloxidoberflächen. Die Oberflächenchemie sowie die physikalisch-chemischen Eigenschaften solcher Adsorbatschichten wurden insbesondere an hochbrechenden

Abstract

Metalloxiden wie Tantal-, Niob- und Titanoxid untersucht und deren Leistungsfähigkeit als Bioaffinitäts-Sensorplattform anhand eines Modellassays geprüft. Die Anforderung an solche Biosensoroberflächen waren: hohe optische Transparenz, hohe Empfindlichkeit, hohe Spezifität und generelle Anwendbarkeit zur reproduzierbaren Immobilisierung verschiedener Erkennungseinheiten und Detektion der entsprechenden Zielmoleküle.

- a) Die hohe optische Transparenz war eine Grundbedingung, da die Biosensoroberflächen auf ein optisches Analysensystem anwendbar sein sollen, welches auf dem Prinzip der *optischen Evaneszentfeld-Wellenleiter* basiert. Das Gerät mit dem die Leistungsfähigkeit bezüglich Bioassay untersucht wurden, verwendet planare Wellenleiter-Technik, wobei die Detektion des Analyten durch die Sensoroberfläche und den Träger hindurch erfolgt. Die hohe Transparenz wurde durch Verwendung definierter Tantalpentoxid-Beschichtungen von Glaträgern erreicht.
- b) Die *hohe Empfindlichkeit* wird durch optische Anregung fluoreszierender Chromophore der sogenannten Tracer erzielt, was eine sehr starke Reduktion von nichtspezifischem Grundsignal zur Folge hat. Die Anregung durch das evaneszente Feld der planaren Wellenleiter, erlaubt Untersuchungen von Oberflächenphänomenen mit weitgehender Vermeidung von Bulksignal.
- c) Die *hohe Spezifität* wird durch Minimierung der unspezifischen Bindung der Zielmoleküle und Tracer an die Sensoroberfläche bei gleichzeitiger Erhöhung der spezifischen Bindung durch optimierte Immobilisierung von Erkennungsmolekülen (Antikörper) erzielt. In dieser Arbeit wurde ein Antigen/Antikörper-Modellsystem (Rabbit-IgG/anti-Rabbit-IgG) verwendet.
- d) Zwei verschiedene *Sensoroberflächen-Plattformen* wurden entwickelt und nach den Gesichtspunkten die unter Punkt c) besprochen wurden untersucht: Einerseits die Erzeugung selbstorganisierter, monomolekularer Adsorptionsschichten (= *Self-Assembled Monolayers, SAMs*) von *Alkylphosphaten und -Phosphonaten* auf Metalloxidoberflächen. Solche SAMs bilden zweidimensional geordnete, stark hydrophobe Oberflächen, welche sich sehr gut eignen, Albumin stabil zu binden

Abstract

(bewirkt starke Reduktion von unspezifischer Proteinbindung). Durch Verwendung von biotinyliertem Rinderserum-Albumin (= BSA-biotin), können auf diese Weise Biotin-aktivierte Sensoroberflächen hergestellt werden, welche ihrerseits zur Oberflächenfunktionalisierung mittels Streptavidin genutzt werden können. Eine zweite Oberflächenbeschichtungs-Variante besteht aus Adsorbatschichten von *Polylysin – Polyethylenglycol-Copolymeren (PLL-g-PEG)*. Diese Polymere sind im neutralen pH-Bereich positiv geladen und zeigen starke Adsorption an negativ geladene Oxidschichten durch elektrostatische Wechselwirkungen. Die Polymerzusammensetzung wurde durch Anpassung der Edukt-Molekulargewichte (Polylysin (PLL) bzw. Polyethylenglycol (PEG)) sowie der Bindungsverhältnisse (PEG/PLL) optimiert. Dadurch konnten extrem tiefe Werte bezüglich nichtspezifischer Proteinadsorption aus Vollserum (generell weniger als 3 ng/cm^2 , was weniger als 0.1 % einer Proteinmonolage entspricht), erreicht werden. Biotin-Funktionalisierung mittels polymergebundener, endständig biotinylierter PEG-Ketten wurde verwendet um Biotin/Streptavidin-basierende Bioaffinitätsassays herzustellen und die Sensorik-Performance der beiden Systeme zu vergleichen.

Es wurde gezeigt, dass beide Varianten ausgezeichnete Eigenschaften in der Anwendung als generell verwendbare Oberflächen aufweisen, an welche Streptavidin-konjugierte Erkennungsmoleküle immobilisiert oder, über eine Streptavidin-Zwischenschicht, Biotin-konjugierte Rezeptoren gebunden werden können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels dieser definierten Oberflächen effektive Analyt-Konzentrationen im femtomolaren Bereich nachgewiesen werden können. Auch in Vollserum werden solche Nachweisgrenzen erreicht, ohne dass zusätzliche Probenvorbereitungen wie Extraktion oder Fällungsreaktionen notwendig sind.

Die Kombination von optimierter Zwischenphasenchemie, optischem Transducer und der verwendeten Assay-Architektur ergeben ein hochleistungsfähiges System, das ein hohes Potential für die zukünftige Anwendung auf dem Gebiet der Immunoassay-Sensorik hat.