

DISS. ETH NO. 22598

**Plasmonic nanoparticles with tailored attainability
for direct oligonucleotide sensing
-Optimization & Application-**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Prayanka Rajendran

M. Sc. École Normale Supérieure de Cachan, France

Born on April 1, 1986

Citizen of India

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Janos Vörös, examiner

Prof. Dr. Marcy Zenobi-Wong, co-examiner

Prof. Dr. Takumi Sannomiya, co-examiner

2015

ABSTRACT

Single-cell oligonucleotide quantification holds great promise to understand diversity among a homogeneous cell population, but the methodology to perform such assays in these samples in a reproducible, quantitative and parallel fashion remains a challenge. Amongst the various oligonucleotides (RNA/DNA) being studied, micro-RNA (miRNA) detection is of great significance. The miRNAs are short RNA sequences, ~18-24 nucleotides long, which are important in regulating the expression of other genes involved in physiological and disease processes. Due to the short length of miRNA, it is challenging to detect them by conventional RNA detection methods, as most existing methods require longer receptor sequences for efficient capturing.

Traditional oligonucleotide quantification techniques such as microarrays, Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and Northern blotting require purified RNA extracts from complex biological fluids such as cell lysate to overcome non-specific binding of proteins and other cell debris. The cell debris interferes with the receptor molecules on the sensor surface, making it unavailable for miRNA target to bind. Although RT-qPCR remains the gold standard due to its high specificity and sensitivity for miRNA quantification, it still involves the reverse transcription of miRNA to complementary DNA (cDNA), which leads to several false copies. An ideal miRNA quantification assay must address several key factors. First, these assays should enable the direct measurement of miRNAs without reverse

transcription to cDNAs. Second, the assay should be highly specific in order to discriminate a single nucleotide polymorphism (SNP) in short miRNAs and avoid false positives. Finally, they should be able to detect miRNA targets in complex biological liquids such as in cell lysate without additional sample processing, as processing normally leads to decreased target concentration due to dilution with other buffers. By addressing the above needs, the biosensor developed in this thesis forms a foundation for an oligonucleotide quantification assay of short sequences (~24 nucleotides).

In this thesis, I report a scattering-based detection assay that I have developed to quantify the oligonucleotides of interest using DNA functionalized gold nanoparticles (DNA-AuNPs) as the biosensor. The assay results in AuNPs forming particle pairs via side-by-side hybridization between the capture DNA on the AuNP and the complementary DNA target. The entire assay is performed in PDMS wells with microliter volumes containing DNA-AuNPs, DNA targets (analyte) and other accessory components for DNA hybridization (buffer). The assay takes place all in one pot without any rinsing steps.

The AuNPs used in this assay have a high local concentration of receptors (in this case DNAs) on the sensor surface, leading to an increase in the sensitivity of the sensor. Every binding event between a receptor and a target has certain on/off rate; however, when there is a high local concentration of the receptor the chance for a re-binding event is much higher due to the proximity of the receptor. This high local concentration increases the retention of the target in the proximity of the AuNP and facilitates a faster rebinding. This observed phenomenon is called *attinebility* (from Latin origin *attinere* meaning retain), coined here at the Laboratory of Biosensors and Bioelectronics.

I also demonstrate the phenomenon of attineability experimentally with 50 nm AuNPs, which are functionalized with thousands of capture DNA molecules making it possible to behave as an artificial receptor scaffold resulting in unusually high binding efficiency. In the assay, half of the nanoparticles are functionalized with capture DNAs complementary to half of a DNA target molecule, while the remaining particles are functionalized with capture DNAs complementary to the other half of the target. The binding of the target (half-complementary to each capture DNA sequence) brings the nanoparticles in close vicinity to each other (< 5 nm). The plasmonic properties of AuNPs enable the straightforward assessment of the number of such aggregates as optically coupled particles have a red-shift in their scattering spectra. Sub-picomolar detection sensitivity is achieved and the sensitivity range for the target detection is tuned by adjusting the number of capture probes per particle.

I have also shown the performance of the developed DNA quantification assay with cell lysate in a single pot, demonstrating that the assay can also be applied to quantify oligonucleotides in the presence of complex biological samples.

The DNA detection assay developed during my thesis is based on the scattering property of AuNPs, which I normally measured using a darkfield microscope. To relieve the reliance on darkfield microscopy and to parallelize the read-out, I have designed a novel microwell array with in-built darkfield condensor. These microwells have reflective sidewalls, tilted at an angle of 45° and a beam blocker on top to function as darkfield condensor. The base of the microwell is designed to be optically transparent. In the absence of scatter objects in the microwell, the incoming light rays are reflected back following a predictable path. On the other hand, in the presence of scattering objects (e.g. AuNPs), the light rays are

scattered in all directions. Some of the scattered light reaches the bottom of the microwell and is collected by the detector. I also show the compatibility of the microwell array with my DNA assay using a simple optical microscope.

In conclusion, I believe that the AuNP based DNA sensing in combination with the microwell array design will find future applications in miRNA detection in single cells and in other complex biological samples (serum, plasma etc.) where ultra-low sensitivity and high specificity are required.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Einzel-Zell Oligonukleotid Quantifizierung birgt großes Potential die Vielfalt zwischen menschlichen Zellpopulationen zu verstehen. Allerdings ist die Methodik diese Analyseverfahren auf reproduzierbare, quantitative und parallele Weise durchzuführen weiterhin eine große Herausforderung. Unter den verschiedenen untersuchten Oligonukleotiden (RNA/DNA), ist die Mikro-RNA (MiRNA) Detektion von besonderer Bedeutung. MiRNAs sind kurze RNA Sequenzen, ~18-24 Nukleotide lang, welche eine wichtige Rolle in der Regulierung der Herstellung anderer Gene, welche in physiologische und Krankheitsprozesse involviert sind, spielen. Aufgrund der kurzen Länge der MiRNA, ist die Detektierung mit herkömmlichen RNA Detektierungsmethoden schwierig, da die meisten existierenden Methoden längere Rezeptorsequenzen für effektives Erfassen benötigen. Traditionelle Oligonukleotid Quantifizierungstechniken wie Mikroarrays, RT-qPCR und Northern Blotting benötigen purifizierte RNA Extrakte aus komplexen biologischen Flüssigkeiten wie Zelllysate, um unspezifisches Binden von Proteinen oder anderen Zellfragmenten zu verhindern. Diese Zellfragmente interferieren erheblich mit den Rezeptormolekülen auf der Sensoroberfläche und machen sie somit unverfügbar für die Ziel-miRNA.

Auch wenn RT-qPCR, wegen der hohen Spezifität und Sensitivität für miRNA Quantifizierung, der Goldstandard ist, führt die Reverse Transkription von miRNA zu komplementär cDNA (cDNA) zu mehreren Falschkopien. Ein ideale miRNA Quantifizierungsverfahren

muss mehrere entscheidende Eigenschaften haben. Erstens, diese Analyseverfahren sollten die direkte Messung von MiRNA ohne Reverse Transkription zu cDNA ermöglichen. Zweitens, das Analyseverfahren sollte sehr spezifisch sein um einzelne Nukleotidpolymorphen (SNP) in kurzen MiRNAs zu unterdrücken und um falsche Positive zu vermeiden. Zu guter Letzt, es sollte dazu fähig sein miRNA aus komplexen biologischen Flüssigkeiten wie Zelllysate, zu detektieren ohne zusätzliche Probenbehandlung, was normalerweise zu einer verminderten Konzentration des zu detektierenden Stoffes führt, bedingt durch die Verdünnung mit Pufferlösungen. Durch Angehen dieser Anforderungen, formt der Biosensor, der in dieser Dissertation entwickelt wurde, die Grundlage für eine Oligonukleotid Quantifizierungsverfahren für kurze Sequenzen (~24 Nukleotide).

In dieser Dissertation zeige ich ein auf Streuspektren basierendes Detektionsverfahren zur Quantifizierung von Oligonukleotiden, welches DNA funktionalisierte Goldnanopartikel (DNA-Au NPs) als Biosensor verwendet. Das Verfahren resultiert in Goldnanopartikeln die Partikelpaare durch Seit-zu-Seit Hybridisierungen der DNA auf dem Goldnanopartikel und der Komplementär DNA-Zielsequenzen. Das gesamte Verfahren findet in PDMS Vertiefungen mit Mikrolitervolumen statt, welche DNA-AuNPs, DNA-Zielsequenzen (Analyt) und andere Komponenten der DNA Hybridisierung (Puffer) enthalten. Alles findet in einem einzigen Behälter statt ohne Spülschritte. Die in diesem Verfahren verwendeten Goldnanopartikel haben lokal eine hohe Konzentration von Rezeptoren (in unserem Fall DNA) auf der Sensoroberfläche, was zu einer mehrfachen Verstärkung der Sensitivität führt. Jede Bindung zwischen einem Rezeptor und der Zielsequenz hat eine bestimmte „on/off“ Rate; allerdings wenn eine hohe lokale Rezeptorkonzentration vorherrscht, ist die Wahrscheinlichkeit auf

eine neue Bindung erhöht auf Grund der unmittelbaren Nähe des Rezeptors. Diese hohe lokale Konzentration verstärkt die Erhaltung/Retention der Zielsequenz in der unmittelbaren Nähe des Gold Nanopartikels und erleichtert somit eine schnellere Wieder-Bindung. Dieses beobachtete Phänomen heisst Attinebilität (aus dem Lateinischen, *attinere*: festhalten, es wurde zuerst geprägt am LBB).

Ich zeige weiterhin das Phänomen von Attinebilität experimentell mit 50 nm Gold Nanopartikeln, welche mit Tausenden von DNA Molekülen funktionalisiert sind, was es ermöglicht es als künstliches Rezeptorgerüst zu gebrauchen was in einer ungewöhnlich hohen Bindungseffizienz resultiert. Bei dem Verfahren sind die Hälfte der Nanopartikel mit der Ziel-DNA Sequenz funktionalisiert, während die andere Hälfte mit der dazu komplementären DNA funktionalisiert ist. Die Bindung zwischen diesen komplementären DNA Sequenzen bringt die Nanopartikel in nächster Nähe zu einander (< 5 nm). Die plasmonischen Eigenschaften der Goldnanopartikel ermöglicht eine direkte Analyse der Anzahl der Aggregate, da optisch gekoppelte Partikel eine Rotverschiebung im Streuspektrum aufweisen. Die Sensitivität der Detektion liegt im Subpikomolarbereich und der Sensitivitätsbereich der Zieldetektion kann durch die Anzahl der Einfangmoleküle (DNA Sequenzen) pro Partikel eingestellt werden.

Ausserdem zeige ich die Leistung des entwickelten DNA Quantifizierungsverfahren mit Zellysat in einem einzelnen Behälter, was zeigt dass dieses Verfahren auch angewendet werden kann um Oligonukleotiden aus komplexen biologischen Proben zu detektieren.

Das in meiner Doktorarbeit entwickelte DNA Quantifikationsverfahren basiert auf dem Streuverhalten von

Goldnanopartikeln, welche ich normalerweise mit Dunkelfeldmikroskopie messe. Um unabhängig vom Dunkelfeldmikroskop zu messen und um die Datenauslese zu parallelisieren, habe ich ein neuartiges Verfahren mit Microwells und eingebauten Dunkelfeldkondensator. Diese Microwells haben reflektierende Seitenwände mit einer Neigung von 45° und auf ihnen befindet sich ein Strahlblocker der als Dunkelfeldkondensator fungiert. Die Unterseite der Microwells ist optisch transparent. Wenn im Microwell keine Streupartikel vorhanden sind, werden die einfallenden Lichtstrahlen wieder zurückreflektiert. Andererseits, wenn Streuobjekte (z.B. Goldnanopartikel) vorhanden sind, wird der Lichtstrahl in alle Richtungen gestreut. Ein Teil dieses Streulichts erreicht die Unterseite des Behälters und wird vom Detektor eingefangen. Auch zeige ich mit dem Gebrauch eines einfachen Lichtmikroskops die Kompatibilität des Microwell Arrays mit meinem DNA Quantifikationsverfahren.

Zusammenfassend glaube ich, dass das Goldnanopartikel basierende Detektieren in Kombination mit dem Microwell-Design in Zukunft weitere Anwendungen in der miRNA Detektion in Einzelzellanalyse und in anderen komplexen biologischen Proben (wie Blutserum oder -plasma), wo eine extrem niedrige Sensitivität und hohe Spezifität nötig sind, finden wird.