

Doctoral Thesis ETH No. 18'276

Enzymatic Amplification Schemes towards Electronic Biosensing

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by
Dorothea Niederberger
Dipl. Werkstoff-Ing. ETH
born on February 23, 1981
citizen of Schaffhausen SH, Hallau SH and Dallenwil NW

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Janos Vörös, examiner
Dr. Erik Reimhult, co-examiner
Dr. Thomas Hirt, co-examiner

23. March 2009

Abstract

Biosensors provide a powerful tool to detect the concentrations of various analytes. Since 1962, when the first glucose test for diabetes patients was introduced, numerous other attempts have been designed. A wide variety of (future) applications are constantly being developed, whereas one main focus of today's research is on the increasing number of people suffering from cancer. Currently, when the disease is diagnosed, it is seldom in an early stage. Therefore, it is essential to provide possibilities for early diagnoses that are cheap and fast. Ideally, such biosensors are built in a way that can easily be multiplied because nowadays more and more cancer (and other) antigens are being identified. The task is now to construct sensors which enable highly sensitive detection of such antigen molecules at very low concentrations.

Most approaches are based on fluorescent or enzymatic detection of the target molecules. Fluorescence is widely spread in high-throughput screening applications, but also enzymes are often used (e.g. in ELISA). Enzymatic detection, however, is dominating the point-of-care and home diagnostics market. The enzymatic sensors can be classified into two categories. Either they perform a reaction causing a colour change, or they generate products that can be detected with electrochemical techniques. In order to be detectable, the antigens need to be connected to enzymes. The most common techniques are sandwich based assays, where the antigen is captured by a surface immobilized antibody and detected by an enzyme labelled, secondary antibody. The sensitivity of such assays is based on the amplification by the enzyme, because that way many enzymatic reaction cycles can be coupled to a single recognition event. However, sometimes even this amplification is not enough and further improvement is necessary, e.g. by linking more than one enzyme to a single recognition event.

This thesis deals with such novel concepts that should allow for bridging the gap between the mM detection limit of existing hand-held enzymatic biosensors and the required pM sensitivity for a future cancer marker sensor.

As an introduction to the field, the most common electrochemical detection techniques are listed along with other emerging electronic sensors, such as nanowires. Although the long-term goal of this work is to achieve a hand-held electronic sensing device, during the development it is often necessary to obtain additional information about the system. Therefore, complementary biosensor techniques that can be combined with electrochemical detection are also described and the most common biosensing surface architectures are introduced.

The first biosensor type presented in this thesis is based on a sandwich assay with vesicles for signal amplification. Vesicles, coupled to secondary antibodies, significantly increased the QCM-D signal because of their large mass and accordingly high viscoelasticity. With this quite simple setup, sensitivities in the critical concentration range of the cancer marker prostate specific antigen (PSA) could be achieved.

In order to benefit from the signal enhancement principle from the QCM-D sensor, enzymes have been implemented into our system to allow for electrochemical detection. These requirements have been achieved by covering the vesicle surfaces with enzymes, meaning every detected antigen finally induced a signal corresponding to thousands of enzymes. With this electrochemically detectable signal enhancement method even lower detection limits than with the vesicle amplified QCM-D biosensor could be achieved. Thus, this system has the potential to be used in biosensors detecting cancer antigens with even much lower abundance than PSA.

For potential applications the stability, the compatibility with biological samples and the shelf-life of the sensor are essential parameters. In order to improve these aspects, the fragile lipidic vesicles were exchanged with more robust polymeric vesicles or solid particles. Besides from their improved shelf-life through better chemical stability and resistance, the polymeric vesicles offer the possibility of incorporating enzymes, accessible through membrane pores.

Another sensor type, situated at the interface between electroactive polymers and polyelectrolyte multilayers (PEMs), has been developed within the frame of this thesis in addition. PEM films containing ferrocyanide ions, were found to show a swelling/deswelling behaviour upon application and removal of a low electric potential.

The deformation occurs instantly and is completely reversible. This setup also allowed for incorporation of the enzyme glucose oxidase into the film or on top of the latter. Like this, the swelling/deswelling effect could be combined with electrochemical detection and activation of enzymes.

Overall, in this thesis a biosensor platform for highly sensitive enzymatic detection of antigens from serum or glucose in sophisticated environments has been developed.

Zusammenfassung

Biosensoren sind ein aussagekräftiges Instrument, um Konzentrationen verschiedener Analyten zu messen. Seit 1962 der erste Glukosetest für Diabetiker eingeführt wurde, sind viele weitere Versuche unternommen worden. Eine breite Palette von Anwendungen wird laufend entwickelt. Ein Hauptfokus der aktuellen Forschung liegt dabei auf der steigenden Anzahl von Menschen, die an Krebs leiden. Da die Krankheit heutzutage nur selten in einem frühen Stadium erkannt wird, ist es wichtig, schnelle und kostengünstige Methoden für frühe Diagnosen zu entwickeln. Idealerweise sind solche Sensoren so gebaut, dass sie einfach multipliziert werden können; insbesondere, weil immer mehr Krebs- (und andere) Antigene identifiziert werden. Die Aufgabe ist nun, Sensoren zu entwickeln, die es ermöglichen, Antigene in sehr tiefen Konzentrationen mit hoher Sensitivität zu detektieren.

Die meisten Ansätze basieren auf fluoreszenter oder enzymatischer Detektion der Zielmoleküle. Fluoreszenz wird häufig in Anwendungen mit hohem Durchsatz eingesetzt, aber auch Enzyme sind weit verbreitet (z.B. in ELISA). Bei tragbaren Biosensoren, oder solchen die zu Hause verwendet werden, dominieren jedoch die enzymbasierten Systeme. Dabei gibt es zwei Arten von enzymatischen Sensoren; die einen induzieren eine Farbänderung, während die anderen eine chemische Reaktion auslösen, deren Produkte anschliessend elektrochemisch detektiert werden. Um Antigene zu detektieren, müssen sie an Enzyme gebunden werden. In den meisten Fällen werden auf der Sandwichtechnik basierende Assays verwendet. Dabei wird das Antigen von einem auf die Oberfläche adsorbierten Antikörper gebunden und von einem zweiten Antikörper, welcher an ein Enzym gebunden ist, detektiert. Die Sensitivität eines solchen Sensors basiert auf der Vervielfachung des Signals, da ein einzelnes Enzym mehrere Reaktionszyklen durchläuft. In manchen Fällen reicht diese Signalverstärkung jedoch nicht aus, und es müssen weite-

re Massnahmen getroffen werden, z.B. indem man mehrere Enzyme an einen einzelnen Antikörper bindet.

Heutige tragbare Geräte mit integrierten enzymatischen Biosensoren operieren im mM-Detektionsbereich. In dieser Dissertation wurden neue Konzepte entwickelt, um in den pM Sensitivitätsbereich zukünftiger Sensoren für Krebsmarker zu gelangen.

Als Einleitung ins Gebiet werden die gebräuchlichsten Detektionsverfahren vorgestellt, sowie neuere elektronische Sensoren wie z.B. Nanodrähte besprochen. Obwohl das langfristige Ziel dieser Arbeit ein tragbares, elektronisches Gerät ist, ist es während der Entwicklungsphase oft notwendig, zusätzliche Informationen über das System zu erhalten. Daher werden auch alternative Biosensortechniken beschrieben, welche mit elektrochemischer Detektion kombiniert werden können. Ausserdem werden die gebräuchlichsten Architekturen von Biosensor Oberflächen vorgestellt.

Die erste Art von Biosensoren, welche in dieser Dissertation vorgestellt wird, basiert auf einem Sandwichassay mit Vesikeln zur Signalverstärkung. Lipide Vesikel, die an die sekundären Antikörper gebunden sind, erhöhen durch ihre grosse Masse und die entsprechend hohe Viskoelastizität das Signal der Quartzkristall Mikrowaage (QCM-D) erheblich. Gleichzeitig wird beim QCM-D auch die Dissipation gemessen, welche durch die Vesikel ebenfalls signifikant erhöht wird. Mit diesem einfachen Versuchsaufbau konnten Sensitivitäten erreicht werden, die ausreichen, um den Krebsmarker PSA (Prostata-spezifisches Antigen) zu messen.

Um die elektrochemische Detektion zu ermöglichen, wurde das Prinzip der Signalverstärkung vom QCM-D Sensor weiter entwickelt, indem das System mit Enzymen erweitert wurde. Diese Auflagen wurden durch Funktionalisierung der Vesikeloberflächen erfüllt. Dabei induzierte jedes detektierte Antigen ein Signal, welches Tausenden von Enzymen entspricht. Mit diesem elektrochemisch detektierbaren Signal wurden sogar noch höhere Sensitivitäten erreicht als mit den Vesikeln im QCM-D. Daher hat die elektrochemische Methode das Potential, in einem Biosensor zur Detektion von Krebsmarkern eingesetzt zu werden, welche in deutlich tieferen Konzentrationen als PSA vorkommen.

Für potenzielle Anwendungen sind Kompatibilität mit anderen biologischen Proben, Stabilität, sowie die Haltbarkeit des Sensors wichtige Parameter. Um den Sensor diesbezüglich zu verbessern, wurden die fragilen lipiden Vesikel durch robustere, polymerische Vesikel oder Mikropartikel ersetzt. Neben ihrer besseren Haltbarkeit durch verbesserte chemische Stabilität ermöglichen es polymerische Vesikel auch, Enzyme in ihrem Innern einzuschliessen. Diese sind dann via Membranporen zugänglich.

Eine neue Art von Sensoren, an der Schnittstelle von elektroaktiven Polymeren und polyelektrolytischen, mehrschichtigen Filmen, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ebenfalls entwickelt. Wenn diese Filme aus einer bestimmten Kombination von Polymeren aufgebaut wurden und Ferrocyanid enthielten, zeigten sie eine Änderung der Dicke, wenn ein kleines elektrisches Potential angelegt und wieder entfernt wurde. Die Änderung der Dicke erfolgte augenblicklich und war vollständig reversibel. Im Weiteren war es auch möglich, Enzyme in diese Filme einzubauen oder sie auf deren Oberfläche zu adsorbieren. Auf diese Weise wurde der Effekt der Änderung der Dicke mit der elektrochemischen Detektion und Aktivierung von Enzymen kombiniert.

In der vorliegenden Dissertation wurde eine Biosensor-Plattform für hochsensitive enzymatische Detektion von Antigenen in Serum oder Glukose in anspruchsvollen Umgebungen entwickelt.