

Reaktionsgefäße als neue Plattform für Sensoren mit nanophotonischen Silizium-Ringresonatoren

Cristina Lerma Arce, Steven Van Put, Arne Goes, Elewout Hallynck, Peter Dubruel, Katarzyna Komorowska, Peter Bienstman, Universität Gent, Belgien

Marker-freie Biosensorik mit nanophotonischen Silizium-Ringresonator-Sensoren bietet höhere Durchsätze und Empfindlichkeiten als andere Verfahren mit oder ohne Marker. Allerdings erfordern Biosensoren eine kontinuierliche Probenzufuhr durch Mikrofluidik-Systeme. In der Praxis ist dies problematisch z.B. für Krankenhaus-Labore, die primär mit Mikrotiterplatten und Reaktionsgefäßen arbeiten. Diesem Nachteil begegnen wir mit einer anwenderfreundlichen Lösung für eine Labor-kompatible Plattform auf Basis von Reaktionsgefäßen mit integrierten Marker-freien nanophotonischen Biosensoren und einem speziellen Mikrofluidiksystem auf dem gleichen Chip. Dabei strömt die Flüssigkeit durch statt über den Chip, womit eine hohe Messleistung erreicht wird.

1 Einleitung

Jeden Tag verwenden Kliniken und Labors Millionen von Reaktionsgefäßen und Mikrotiterplatten, typisch mit 96 Nöpfchen, für biologische Untersuchungen (engl. bioassays). Sie dienen als diagnostisches Werkzeug in der Medizin und Pflanzenpathologie sowie für Qualitätskontrollen in verschiedenen Branchen. Auf diesen handlichen Einweg-Plattformen für kleine Flüssigkeitsmengen setzen erhebliche Investitionen auf, um die Leistungsfähigkeit von Bioassays durch effiziente automatische Handhabung zu optimieren.

Allerdings erlauben sie nur Marker-gebundene Nachweisverfahren, die arbeitsintensiv und teuer sind, zudem verändern sie potentiell die Struktur und Funktion des Assays. Auch ist die Quantifizierung schwierig, da die „fair“ gemessenen Intensitäts-Schwellwerte der Marker¹ von allen Versuchsbedingungen abhängig sind. Darüber hinaus kann eine Marker-gebundene Untersuchung nur „Endpunkt-bezogen“ durchgeführt werden², wodurch jegliche Information über die biomolekulare Wechselwirkungskinetik kaschiert wird. In der Praxis muss mit hohem Entwicklungsaufwand sichergestellt werden, dass der Marker keine wichtige aktive Stelle auf dem markierten

Molekül blockiert oder die molekulare Konformation modifiziert.

Aufgrund dieser Überlegungen besteht die Motivation, Kosten und Komplexität von Assays zu reduzieren und bei hohem Durchsatz mehr quantitative Informationen zu erhalten. Die Marker-freie Detektion löst dies mit einem Signalgeber, der bestimmte physikalische Eigenschaften der biologischen Verbindung direkt misst.

Optische Marker-freie Biosensoren haben in den letzten Jahren starke Beachtung erfahren. Der Schlüssel zur Fähigkeit optischer Biosensoren, biologische Analyte zu erkennen, liegt darin, dass sie Änderungen der Lichtausbreitungsgeschwindigkeit in quantifizierbare Signale umwandeln, proportional zu der Menge biologischen Materials auf der Sensoroberfläche.

2 Integration von Chip, Mikrofluidik und Reaktionsgefäß

Zur Vorstellung unseres nanophotonischen Ringresonator-Sensors diskutieren

wir im Folgenden einen Biosensor vom Affinitäts-Typ, an dessen Oberfläche ein Rezeptor oder Ligand gebunden ist, so dass er auf die Nahbereichs-Wechselwirkung mit einem Analyten reagiert. Das Rezeptormolekül kann ein Antikörper, ein Protein oder DNA sein. Die Bildung von Komplexen kann somit kontinuierlich beobachtet werden, und gleichzeitig lassen sich viele Wechselwirkungen verfolgen. Eine derartige Echtzeit-Datenerfassung verfolgt neben der Reaktionskinetik z.B. auch Konzentrationsänderungen von Antikörpern in der Probe.

2.1 Chip-Layout und Versuchsaufbau

Die Herstellung des photonischen Chip erfolgte in Silizium-auf-Isolator-Technik (SOI) mit 2 µm tief vergrabener Oxid- und 220 nm Silizium-Deckschicht, mittels CMOS-kompatibler optischer Lithographie bei 193 nm sowie Trockenätzen [1]. Die Resonatoren bestehen aus 450 nm breiten, nahezu kreisförmigen Einmoden-Wellenleitern mit 5 µm Krümmungsradi-

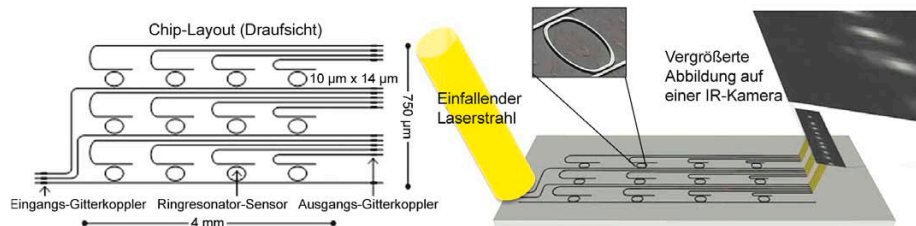


Bild 1: Chip-Layout und Aufbau: Die Eingangsgitterkoppler werden von einem kollimierten durchstimmbaren Laserstrahl beleuchtet. Die Ausgangssignale werden nahezu senkrecht freistrahlend ausgekoppelt und mit einer IR-Kamera abgebildet [2]

¹ Es ist sehr schwierig, die Menge und „Qualität“ der Marker zu quantifizieren, die an einen Antikörper binden.

² Bis das Assay vollständig abgeschlossen ist, liegen keine Informationen vor. Erst nach dem letzten Schritt des Assay liefert die Marker-Quantifizierung verwertbare Resultate.

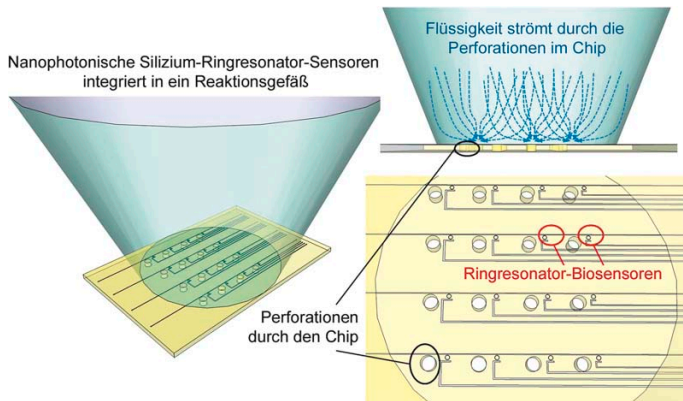


Bild 2: Schematische Ansichten der Baugruppe. Der SOI-Chip ersetzt den Original-Boden des Reaktionsgefäßes. Eine Flüssigkeit im Gefäß strömt durch Perforationen, was den Detektionsprozess der Ringresonator-Sensoren beschleunigt

us und 2 µm langen Richtkopplern, bei 180 nm Abstand zwischen den Wellenleitern. Die Ringe unterstützen Moden bei einer Resonanz-Wellenlänge

$$\lambda_{resonance} = L \cdot n_{eff} / m \quad (Gl.1)$$

wobei L der Umfang, n_{eff} der effektive Brechungsindex des resonanten Mode und m die Ordnung ist (= 1,2 ...). Die Resonanz führt zu einem scharfen Transmissions-Einbruch. Wenn in der Nähe des Rings eine molekulare Wechselwirkung stattfindet, ändert sich der lokale Brechungsindex, was zu einer Änderung von n_{eff} und somit zu einer Resonanzwellenlängen-Verschiebung führt, die sich durch scannendes Abtasten der Wellenlänge erfassen lässt.

Das Chip-Layout ist in **Bild 1** dargestellt [2]. Ein gemeinsamer Eingangs-Wellenleiter ist mit vier Ringen verbunden, die jeweils einem Signal-Ausgang zugeordnet sind. Drei solche Vier-Ring-Gruppen sind unabhängig nebeneinander platziert. Die drei Eingangs-Wellenleiter werden über einen vertikalen Gitterkoppler [3] mit einem 2 mm breiten kollimierten Strahl beleuchtet, der von einer abstimmbaren Laserquelle

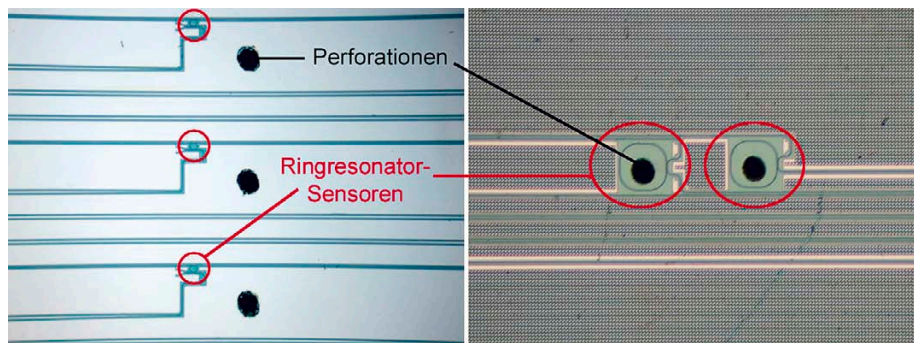


Bild 3: Mikroskopische Aufnahmen zweier Sensor-Konfigurationen mit Perforationen entweder in der Nähe oder innerhalb der Ringresonatoren



Bild 4: Am Boden gekapptes Reaktionsgefäß mit aufgeklebtem photonischem Chip

stammt, in unserem Fall ein TSL-510 von der Santec Corpora-

tion. Die Ausgangssignale der Ringresonatoren werden ebenfalls durch integrierte Gitterkoppler fast vertikal als Freiraumstrahlen ausgekoppelt und mit einer Infrarot-Kamera aufgenommen.

Die flach geätzten Gitter sind Teil des Chip-Layout und erreichen eine Kopplungseffizienz von 31% bei einer Wellenlänge von 1,55 µm (40 nm Bandbreite, 1 dB) und einen Kopplungswinkel von 10° zur Vertikalen. Da die Bandbreite der Gitterkoppler größer als der freie Spektralbereich der Resonatoren ist, begrenzen die Gitterkoppler nicht die Anzahl der in Serie angeordneten Resonatoren.

2.2 Integriertes Mikrofluidik-System

Der photonische Chip ist für die Integration am unteren Ende eines Reaktionsgefäßes vorgesehen. Um den Nachweisprozess zu beschleunigen, erzeugt ein Mikrofluidik-System eine Strömung über die Sensoren auf der Chip-Oberfläche, so dass die nachzuweisenden Analyten schneller in die Nähe der Ringresonatoren gelangen. Die Strömung im Gefäß wird durch spezielle Öffnungen geführt, die den Chip perforieren, so dass die Lösung weiter

über diese Austrittskanäle. **Bild 2** zeigt den Aufbau schematisch mit eingebettetem Mikrofluidik-System.

Die Perforation durch den SOI-Chip erfolgte durch Laserablation mit dem Puls laser Duetto von Time-Bandwidth Products bei 355 nm mit 1000 ps Pulsdauer und einer Wiederholrate von 50 kHz. Größe und Position der Öffnungen können leicht über die Laser-Parameter angepasst werden.

Vorab wurden einige Simulationen in COMSOL durchgeführt, um die Existenz einer Strömung über der Sensoroberflächen zu verifizieren. Daraus konnte geschlossen werden, dass sich die Öffnungen für eine ausreichende Strömung in unmittelbarer Nähe der Sensoren befinden müssen.

Bild 3 zeigt zwei Konfigurationen mit Perforationen entweder neben (links) oder sogar in den Ringresonatoren (rechts). Für unsere Experimente wurde bisher nur die erste Konfiguration umgesetzt, aber wir gehen davon aus, dass sich die Ergebnisse mittels der zweiten Konfiguration noch optimieren ließen.

2.3 Integration

Der photonische Chip wird an unteren Ende des Reaktionsgefäßes integriert, nachdem dessen ursprünglicher Boden mechanisch entfernt wurde (**Bild 4**). Die permanente Befestigung des Chip erfolgt mit einem UV-härtbaren Klebstoff, der eine präzise Zentrierung der Sensoranordnung zum Reaktionsgefäß ermöglicht. Wenn die zu analysierende Flüssigkeit in das Gefäß eingefüllt wird, kommt sie in Kontakt mit den Sensoren und strömt wie oben beschrieben durch die Öffnungen.

3 Experimente

3.1 Aufbau

Für die Experimente befestigten wir die integrierte Baugruppe aus Reaktionsgefäß und photonischem Chip auf einem kleinen Unterdruck-Spannfutter (Vacuum

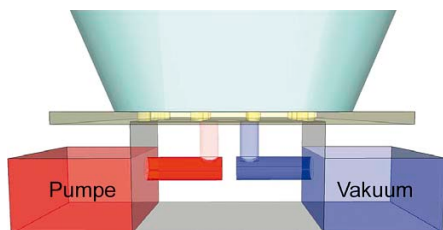


Bild 5: Die Baugruppe fixiert auf einem Vacuum Chuck mit zusätzlicher Pumpe, um die Flüssigkeit über die Chip-Oberfläche zu bewegen

Chuck), das zusätzlich mit einer Über- oder Unterdruckpumpe verbunden war. Dies ermöglicht ein Ansaugen oder Austreiben beliebiger Gase oder Flüssigkeiten in einem bestimmten Bereich des Chuck. Die Baugruppe wurde sorgfältig so ausgerichtet, dass die Chip-Perforationen in diesem Bereich lagen. Eine Flüssigkeit strömt durch die Löcher im Chip nach unten oder oben, je nach Pumprichtung. **Bild 5** zeigt die auf dem Spannhalter fixierte Baugruppe.

Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben wird Licht aus einem abstimmbaren Laser über die Gitterkoppler in den Chip ein- und wieder ausgekoppelt, um von einer Infrarot-Kamera erfasst zu werden. Als neuer Aspekt und Verbesserung gegenüber unseren früheren Arbeiten [2] erfolgt die Lichtkopplung nun wie in **Bild 6** von der Unterseite des Chip aus, durch das 750 µm dicke Silizium-Substrat.

Silizium zeigt hohe Transparenz bei der verwendeten Wellenlänge von 1,55 µm. Um die Streuung an der rauen Substratoberfläche zu verringern, und um sowohl die Ausrichtung des Laserstrahls als auch die Detektion des ausgekoppelten Lichtes zu vereinfachen, wurde das Siliziumsubstrat auf 300 µm verdünnt und planarisiert. Dies erfolgte durch chemisch-mechanisches Schleifen (CMG) und Polieren (CMP).

Als Grundlagenuntersuchung und zum Aufzeigen der Möglichkeiten der kombinierten Baugruppe wurden verschiedene Schritte eines Assays mit den bekannten hohen Affinität der Paarung Biotin-Streptavidin gemessen. Dazu wurden kleine

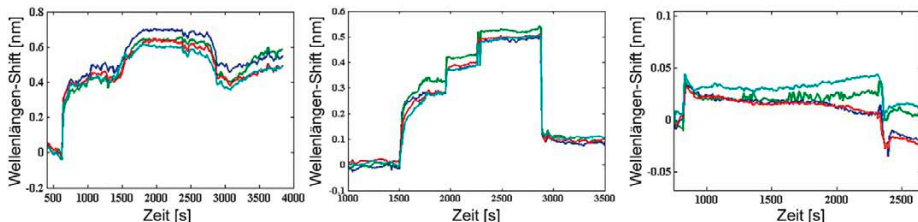


Bild 7: Drei individuelle Schritte des Bioassays wurden gemessen: 1) Silanisierung der Oberfläche mit APTES (Ethanol – APTES – Ethanol); 2) Immobilisierung des Biotin (PBS – Biotin – PBS); 3) Bindung des Streptavidin an Biotin (PBS – Streptavidin – PBS)

Mengen verschiedener Lösungen manuell in das Reaktionsgefäß pipettiert und unten durch die Chip-Perforationen angesaugt, während Messwerte erfasst wurden. Das Experiment bestand aus den drei folgenden individuellen Arbeitsschritten:

- 1 Silanisierung der Oberfläche: Durchsatz einer 2%igen Aminosilan-Lösung (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES), vor- und nachher Spülen mit Ethanol.
- 2 Immobilisierung des Biotin: Durchsatz von 3 mg/ml Biotin in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), vor- und nachher Spülen mit PBS pH 7.
- 3 Bindung des Streptavidin: Durchsatz einer Lösung von 0,1 mg/ml Streptavidin in PBS, vor- und nachher Spülen mit PBS pH 7.

Die Zeitdauer zur Durchführung jedes dieser Schritte betrug weniger als eine Stunde.

3.2 Ergebnisse

Bild 7 zeigt drei Graphen, die den oben genannten Schritten des Assays entsprechen. Sie zeigen die zeitliche Entwicklung der Wellenlängenverschiebung der Ringresonatoren während der Messungen mit den verschiedenen Lösungen. Jede Farbe entspricht einem Sensor.

Die Assoziation und Dissoziation von APTES im Sensor lässt sich links in Bild 7 leicht quantifizieren. Das mittlere Bild 7 zeigt die Bindung von Biotin in PBS-Lösung, sowie die Dissoziation beim Spülen mit PBS. Eine Verschiebung der Resonanzwellenlänge um 30 pm ist zu messen, sobald Streptavidin durch den Chip geleitet wird, was die Bindung von Streptavidin an Biotin anzeigt. Diese Messergebnisse sind als vorläufig zu betrachten, da der Aufbau gerade erst entwickelt wurde. In zukünftigen Arbeiten sollen die Baugruppe und die Messungen optimiert werden.

4 Fazit

Wir haben eine einfache Plattform für Reaktionsgefäße oder Mikrotiterplatten vorgestellt, in Kombination mit Markerlosen nanophotonischen Biosensoren und

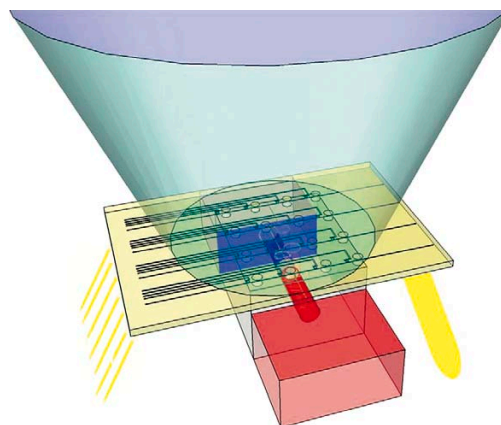


Bild 6: Baugruppe auf Vacuum Chuck, während Messungen von der Chip-Unterseite durchgeführt werden. Licht wird von unten durch das Chip-Substrat hindurch ein- und ausgekoppelt

Mikrofluidik, die im gleichen Chip integriert sind. Dies ermöglicht die benutzerfreundliche Hochleistungs-Anwendung photonischer Ringresonatoren.

Wir danken unseren Kollegen vom Zentrum für Mikrosystemtechnik, von der Arbeitsgruppe Polymerchemie und Biomaterialien sowie vom Zentrum für Nano- und Biophotonik, alle an der Universität Gent.

Übersetzung: J. Kuppe

Literaturhinweise:

- [1] S.K. Selvaraja, P. Jaenen, W. Bogaerts, P. Dumon, D. Van Thourhout, R. Baets, *Fabrication of Photonic Wire and Crystal Circuits in Silicon-on-Insulator Using 193nm Optical Lithography*, J. Lightw. Technol. 27(18), S. 4076-4083 (2009)
- [2] K. De Vos, J. Girones Molera, T. Claes, Y. De Koninck, S. Popelka, E. Schacht, R. Baets, P. Bienstman, *Multiplexed antibody detection with an array of silicon-on-insulator microring resonators*, IEEE Phot. J., 1(4), S. 225-235 (2009)
- [3] W. Bogaerts, R. Baets, P. Dumon, V. Wiaux, S. Beckx, D. Taillaert, B. Luyssaert, J. Van Campenhout, P. Bienstman, D. Van Thourhout, *Nanophotonic Waveguides in Silicon-on-Insulator Fabricated with CMOS Technology*, J. Lightw. Technol. 23(1), S. 401-412 (2005)

Ansprechpartner:

Cristina Lerma Arce
Universität Gent
Photonics Research Group (INTEC)
Sint-Pietersnieuwstraat 41
9000 Gent
Belgien

Tel. +32/9264-3318

Fax +32/9264-3593

eMail: cristina.lermaarce@intec.ugent.be

Internet: photonics.intec.ugent.be

