

# Entwicklung eines Aptamer-basierten Multisensorsystems zum Nachweis von Pathogenen in Wässern

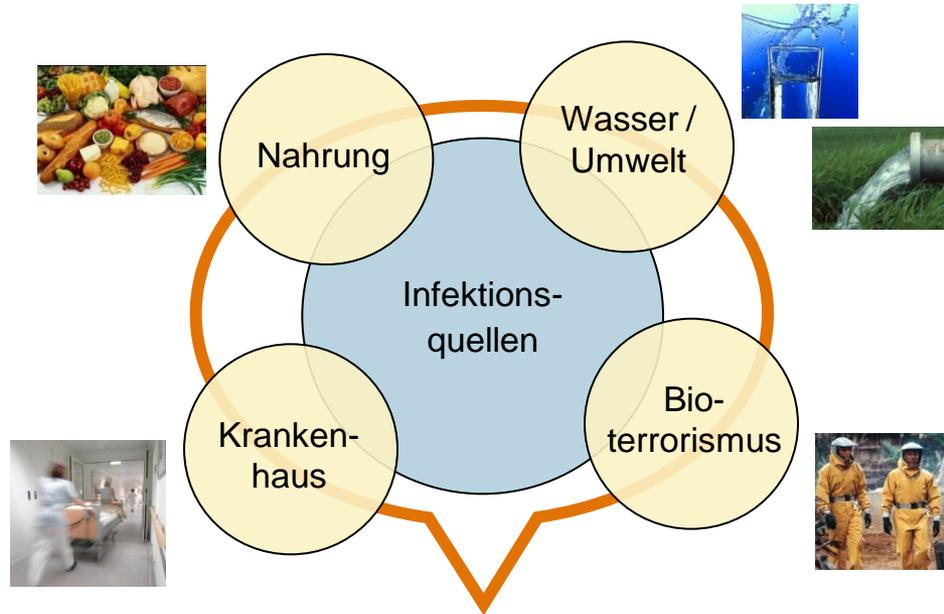
(Q2 – Technologieentwicklung und Implementierung)

Regina Stoltenburg, Sören Linkorn, Elke Boschke,  
Frank Sonntag, Beate Strehlitz

<http://www.iwas-initiative.de>

# Hintergrund: Schutz der menschlichen Gesundheit

- Mikroorganismen sind integraler Bestandteil des Lebens auf der Erde
- einige Mikroorganismen verursachen Krankheiten, die auch lebensbedrohlich sein können

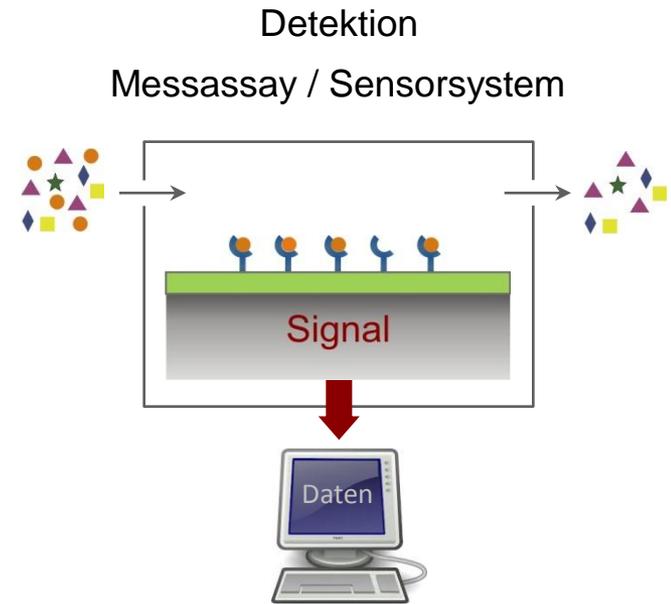


schneller, sensitiver and spezifischer Nachweis pathogener Mikroorganismen ist für den Schutz der menschlichen Gesundheit wichtig

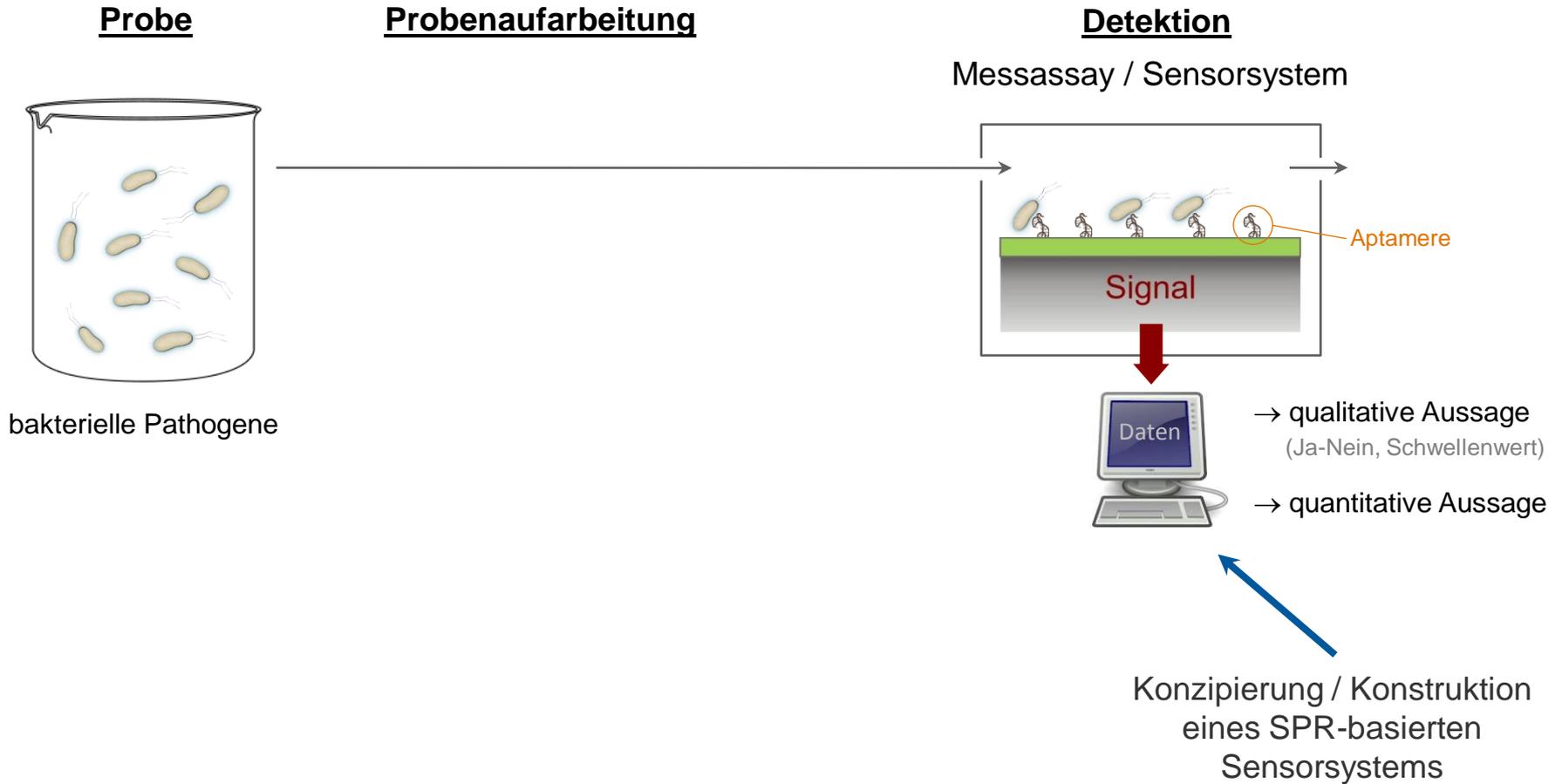
## neue Methoden und Instrumente

(einfach handhabbar, schnell und zuverlässig, portabel, kosteneffektiv)

# Detektion von Pathogenen in Wässern



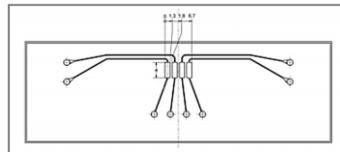
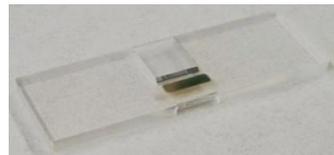
# Aptamer-basierte Detektion bakterieller Pathogene



# Gerätetechnische Entwicklung des Sensorsystems

## ▪ Gerätekonzept (Fraunhofer IWS)

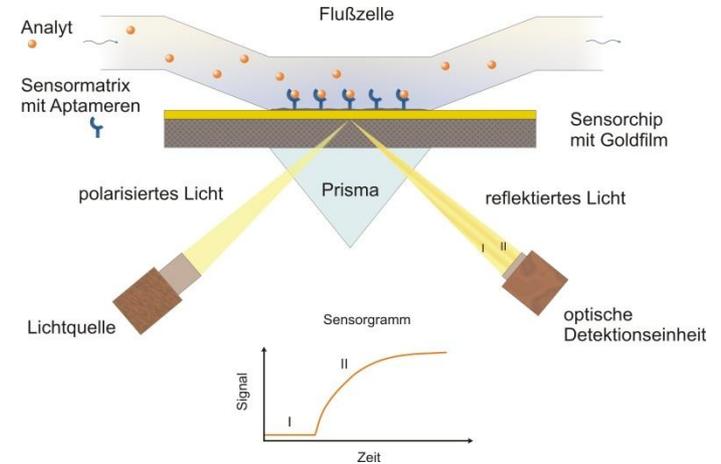
- ⊕ kompaktes, portables, bench-top Multisensorsystem
- ⊕ Lab-on-Chip-System
- ⊕ automatisches Probenhandlungssystem integrierbar



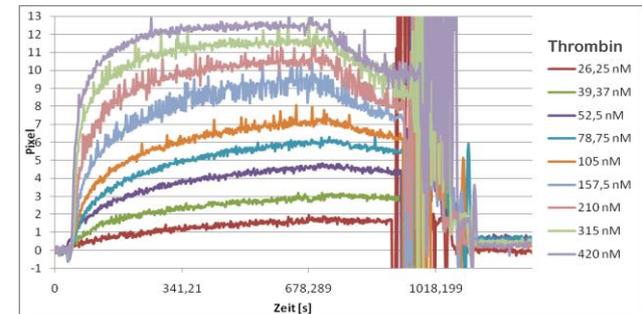
- ⊕ Sensorchip mit Goldfilm
- ⊕ On-Chip-Mikrofluidik, 4- bzw. 17-Kanal-Flusssystem
- ⊕ hohe Parallelität

## ▪ Detektionsprinzip

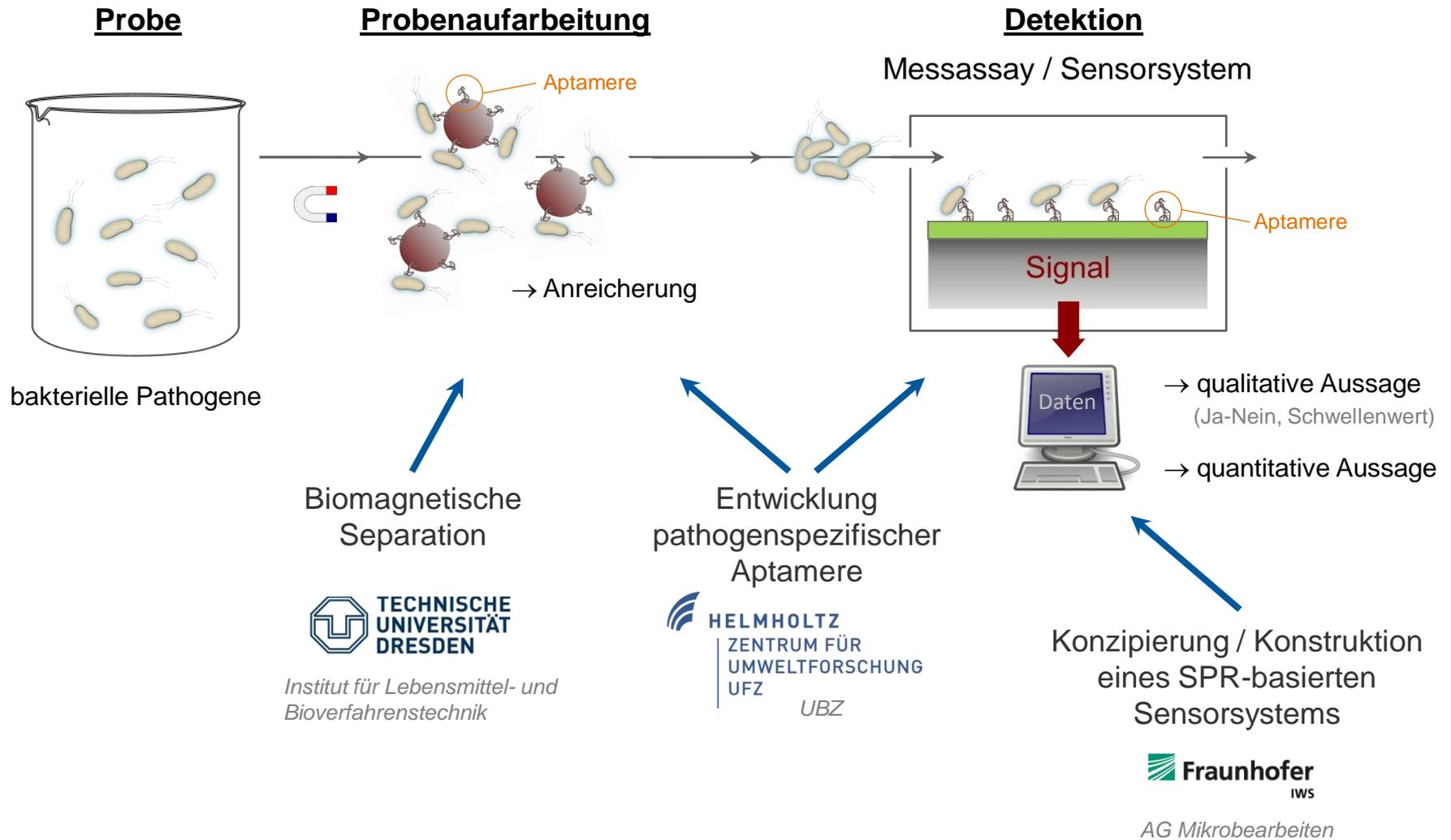
- ⊕ markierungsfreie Messung mittels Surface Plasmon Resonance Spektroskopie (SPR)



## ⊕ Modellsystem: Thrombin-Aptamer

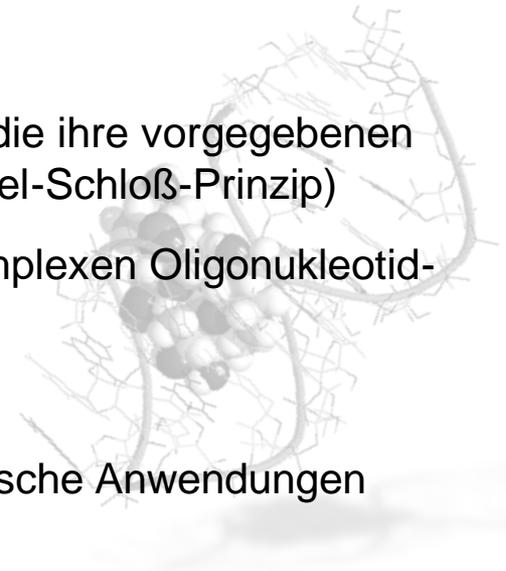


# Aptamer-basierte Detektion bakterieller Pathogene

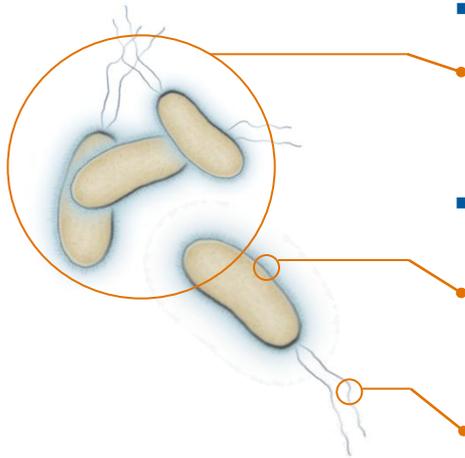


# Aptamere

- hoch affine Nukleinsäuremoleküle mit komplexer 3D-Struktur, die ihre vorgegebenen Zielmoleküle spezifisch erkennen und binden können (Schlüssel-Schloß-Prinzip)
- mittels SELEX-Technologie aus einer randomisierten, hochkomplexen Oligonukleotid-Bibliothek selektiert und angereichert
- für verschiedene Klassen von Zielmolekülen
- hohes Potential als biologische Erkennungselemente für analytische Anwendungen

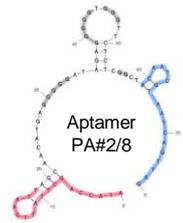


→ Auswahl des Selektionstargets



- komplexe Targets
- **intakte, hitzegetötete Bakterienzellen** von *E. coli*, *S. typhimurium* und *L. monocytogenes*
- definierte Targetmoleküle
- **Protein A** von *St. aureus* (Zellwandprotein)
- **O-spezifische Seitenketten** der LPS von *E.coli* und *S. typhimurium* (Strukturkomponente der gramnegativen Zellwand)
- **Flagellin** von *S. typhimurium* (Strukturprotein der Flagellen)

# Aptamer-Biosensor für Protein A aus *St. aureus*



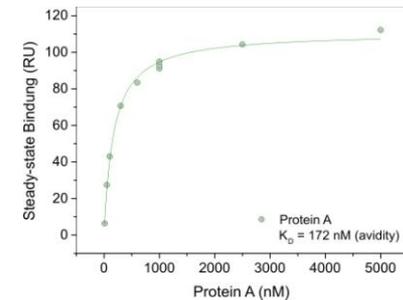
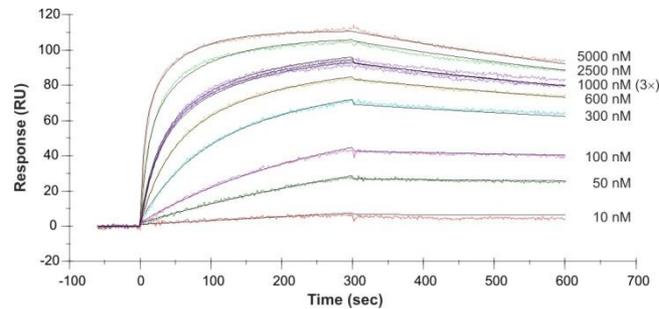
## ■ Charakterisierung der Bindungseigenschaften mittels Biacore X100

- ⊕ SPR-basierter Affinitätssensor zur markierungsfreien Interaktionsanalyse zwischen Biomolekülen
- ⊕ Referenzsystem
- ⊕ Identifizierung optimaler Assaybedingungen

### Affinität

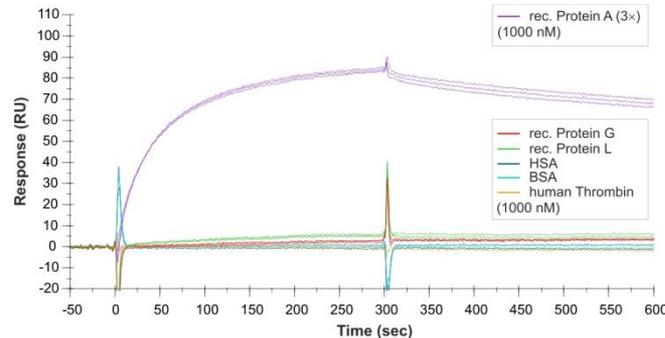


Analyt: Protein A  
Ligand: Aptamer, immobilisiert



### Spezifität

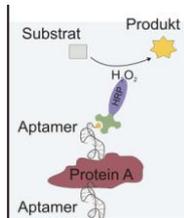
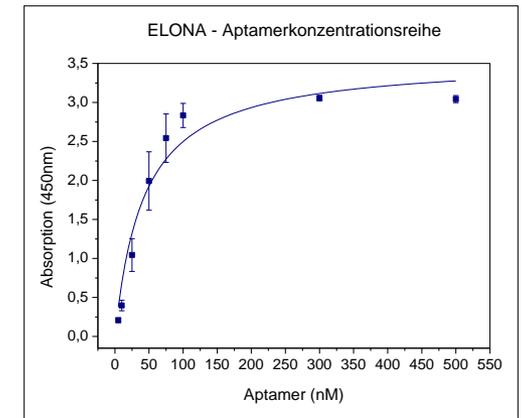
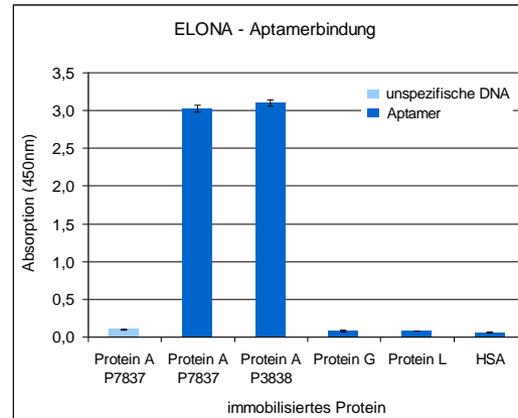
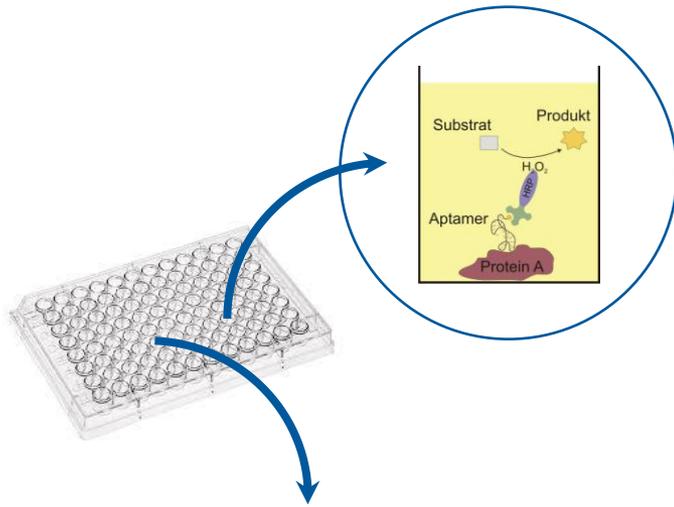
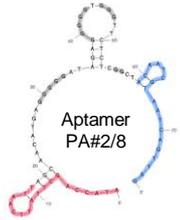
Analyt: verschied. Proteine  
Ligand: Aptamer, immobilisiert



# Aptamer-basierter Assay für Protein A aus *St. aureus*

## ▪ ELONA

- ⊕ analog ELISA (antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
- ⊕ kolorimetrisches Detektionsprinzip
- ⊕ MTP-basiert, dadurch hohe Parallelität



**Ziel: Entwicklung eines Sandwich-Assay**

# Zusammenfassung, → Ausblick

## ▪ Aptamere für verschiedene bakterielle Targets selektiert, Biosensor, ELONA (UFZ)

⊕ für Bakterienzellen (*E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*)

⊕ für Protein A (*St. aureus*)<sup>1</sup>

⊕ Aptamer-Pool für O-spezifische Seitenketten der LPS von *E.coli*

⊕ Aptamer für Protein A: SPR-Biosensor (Biacore)

ELONA (kolorimetrischer MTP-Assay)

→ Protein A - Aptamer in SPR-Multisensorsystem integrieren (Fraunhofer IWS)

→ Weiterentwicklung des kolorimetrischen Assays (ELONA als Sandwich-Assay); Nachweis von Bakterienzellen

→ Aptamer-basierte biomagnetische Separation der Bakterienzellen als Probenaufarbeitung (TUD)

## ▪ SPR-basiertes Multisensorsystems entwickelt (Fraunhofer IWS)

⊕ kompaktes, portables, bench-top Multisensorsystem mit integrierbarem automatischen Probenhandlungssystem

⊕ Funktionalität mit Modellaptamer für Thrombin getestet<sup>2</sup>

→ Softwareentwicklung

→ Optimierung der Funktionalisierung der Chipoberflächen

<sup>1</sup> Stoltenburg, R., Strehlitz, B.: Dt. Patent DE102011006612.8, 31.03.2011, Int. Patent PCT/EP2012/055655, 29.03.2012.

<sup>2</sup> Henseleit, A. et al. (2011): Eng.Life Sci. 11 (6), 573-579.

# Perspektiven

- **Aptamere als spezifische Erkennungselemente im Multisensorsystem**

weitere bedarfsgerechte Entwicklung pathogenspezifischer Aptamere mittels SELEX-Technologie → hohe Flexibilität und Erweiterbarkeit des Multisensorsystems

darüber hinaus: Einsatz von Aptameren für andere Analyte

- **Multisensorsystem als kompakter, portabler Messplatz mit automatisiertem Probenhandlingsystem**

prinzipiell in verschiedenen Regionen/Standorten oder unterschiedlichen Bereichen der Wasserwirtschaft einsetzbar, überall dort, wo eine mikrobielle Beurteilung der Qualität von Wässern gefragt ist

darüber hinaus: Einsatz des Multisensorsystems in anderen Bereichen (z. B. Lebensmittelanalytik)

Verwendung verschiedener Erkennungselemente (z. B. Aptamere, Antikörper, Peptide, DNA)

**Vielen Dank**

---

**für Ihre Aufmerksamkeit**