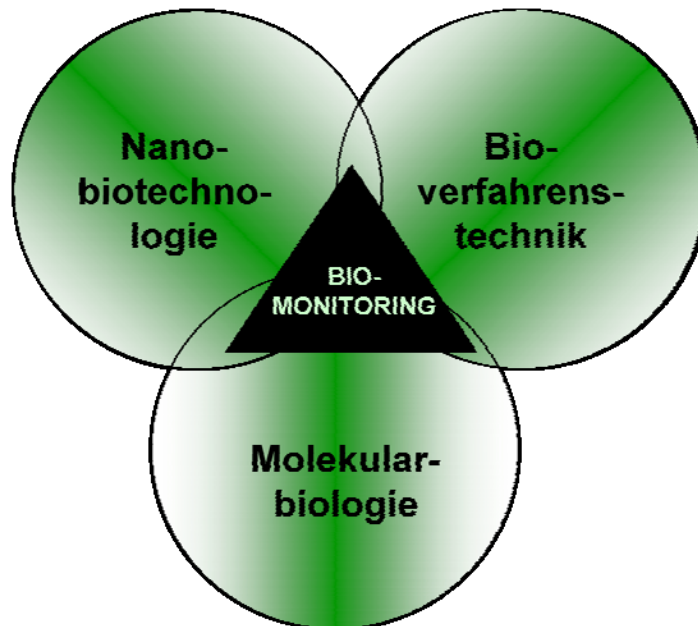


Neue Lösungsansätze zum schnellen Biomonitoring auf der Basis von Biomagnetischer Separation und Nanotechnologie (LÖBISENA)



Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben (Zeitraum: 01.05.2006 – 31.12.2008)

Förderprogramm:	AiF/ZUTECH
Förderkennzeichen:	AiF-Nr. 217 ZBR
Forschungsvereinigungen:	DECHEMA (Gesellschaft für chemische Technik und Biotechnologie e.V.) und IVLV (Industrievereinigung für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V.)
Forschungsstellen:	Technische Universität Dresden Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (ILBT) Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V. Heiligenstadt (iba e.V.)

Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der hier vorgestellten Arbeiten stand die Etablierung eines neuartigen, Zeit und Kosten sparenden Systems zur Detektion pathogener Mikroorganismen. Anschließend an eine Biomagnetischen Separation (BMS) sollten die Zellen mit fluoreszierenden Mikro-kapseln markiert und danach vereinzelt werden. Die Detektion der Mikroorganismen sollte semiautomatisch in den Kompartimenten erfolgen (Abb. 1).

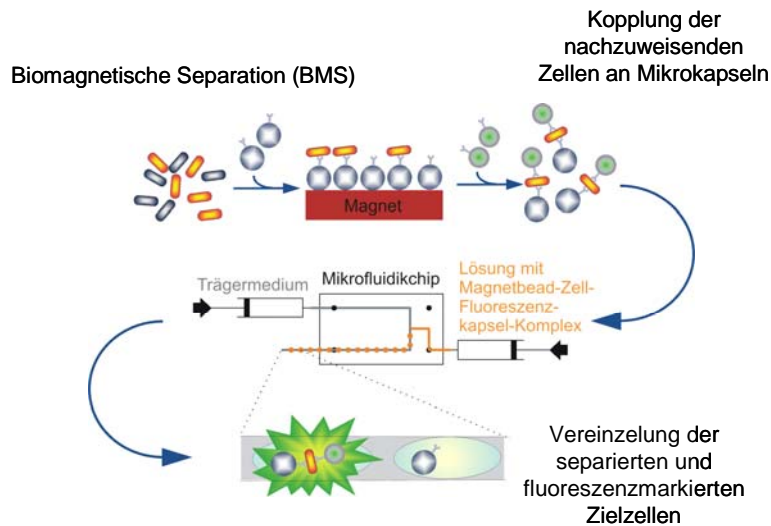


Abb. 1: Schematische Darstellung des Prozesses beginnend mit der Biomagnetischen Separation, über die Kopplung der fluoreszierenden Mikro-kapseln bis hin zur Vereinzelung und Detektion des Magnetbead-Zielzellen-Mikro-kapsel-Komplexes

Im Rahmen der Projektbearbeitung wurde die technische Realisierbarkeit aller Einzelschritte demonstriert. Lösungsansätze für einzelne Detailprobleme mündeten in der Etablierung neuartiger molekularbiologischer Methoden (SELEX) und der PDMS-Chip-Technik an den Forschungsstellen. Ein leicht zu bedienendes Detektionssystem konnte als Labormuster realisiert werden.

Die größten Schwierigkeiten traten bei der Gewinnung selektiv bindender Liganden zum Funktionalisieren der Magnetbeads bzw. Mikro-kapseln auf. Mehrere Versuche zur Selektion von im Vergleich zu Antikörpern sehr kostengünstigen, selektiv bindenden Peptiden und Aptameren blieben zunächst erfolglos. Erst das Biopanning gegen *Staphylococcus aureus* zum Ende der Projektlaufzeit brachte Bindepeptide mit gewünschter Funktionalität. Aus heutiger Sicht erscheint es dennoch schwierig, ganze Zellen als Targets für die Selektion zu verwenden. Zwar bieten Bakterien auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl potentieller Targetstrukturen. Jedoch stellen nicht alle zwangsläufig gute Bindestellen für die Anlagerung funktionalisierter Magnetbeads bzw. Mikro-kapseln dar.

Für die angestrebte Separation und Detektion einer Zelle ist es notwendig, dass sowohl Magnetbeads als auch Mikro-kapseln gleichzeitig an sie binden. Als besonders kritisch für die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit erwies sich die Agglomerationsneigung der verwendeten Partikel. Für ein Modellsystem konnten die Prozessparameter soweit optimiert werden, dass die Agglomerationsneigung beherrschbar scheint. Diese Optimierung muss aber jeweils für den Einzelfall erfolgen, da die eingesetzten Liganden maßgeblichen Einfluss auf das Agglomerationsverhalten haben.

Basierend auf der Technik des segmentierten Flusses wurde die Vereinzelung der Magnetbead-Zielzellen-Mikro-kapsel-Komplexe im Chip (Glas, PDMS) und alternativ dazu mit einer Zwei-Fluid-Sonde (ZFT) erfolgreich durchgeführt. Ziel war eine gleichmäßige Verteilung eines Magnetbead-Zielzellen-Mikro-kapsel-Komplexes in jeweils einem Kompartiment.

Durch die Entwicklung der automatisierten mikroskopischen und spektroskopischen Detektionsplattform wurde mikroskopisch die Präsenz von mit Mikrokapseln markierten Zellen in einem Kompartiment detektiert. Eine anschließende Validierung der Detektion auf spektroskopischer Basis im Sinne einer Ja-Nein-Entscheidung diente als Qualitätskontrolle. Die Arbeiten mündeten in der Konstruktion und Bau eines Labormusters für die spektroskopische Analyse. Durch seinen modularen Aufbau ist es variabel und schnell einsetzbar und dient als Entwicklungsgrundlage eines Prototyps, der in verschiedenen Bereichen (Lebensmittel, Pharmazie) Anwendung finden kann.

Aus heutiger Sicht scheint mit dem Nachweissystem eine Verkürzung der Detektionszeiten auf einen Arbeitstag möglich. Dies haben die Untersuchungen der einzelnen Verfahrensschritte gezeigt, auch wenn eine zusammenhängende Testung des Gesamtverfahrens an realen Proben aus Zeitgründen noch offen bleiben muss. So kann erst nach Validierung der neu entwickelten Methode endgültig beurteilt werden, ob damit ein wesentlicher Beitrag in Richtung einer produktions- und produktnahen Qualitätskontrolle und –sicherung erfolgt ist.

Das Vorhaben (AiF-Nr. 217 ZBR) wurde aus den Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF) gefördert.

Forschungsergebnisse der einzelnen Arbeitspakete

Biomagnetische Separation (ILBT)

Die Kinetik der Bindung von Magnetbeads an Zellen ist abhängig von der Wahrscheinlichkeit ihres Zusammentreffens. Sie lässt sich mittels eines am ILBT entwickelten parametrisierten Modells beschreiben¹. Es sind relativ hohe Konzentrationen an Beads notwendig, um eine Bindung an die Zellen innerhalb weniger Stunden zu garantieren. Entsprechend der Aussagen des Modells wurden für die Experimente Konzentrationen von 10^3 Zellen/mL und 10^6 .. 10^7 Beads/mL festgelegt.

Projektziel war, die BMS in realen Proben mit komplexer Matrix zu realisieren. Um Aussagen über ggf. notwendige Vorbehandlungsschritte treffen und die relevanten Kopplungsparameter bestimmen zu können, wurden zunächst Untersuchungen mit antikörperbeladenen Magnetbeads und Reinkulturen der Modellorganismen *Salmonella* Typhimurium und *E. coli* O55 in PBS durchgeführt. Parallel dazu fanden Untersuchungen in realen Stoffsystemen (Bier, Fruchtsaft und Milch) statt. In allen Versuchsreihen lagen die Separationserfolge bei über 90 %. Deshalb konnte für die Projektbearbeitung auf eine zusätzliche mechanisch/enzymatische Probenvorbehandlung der untersuchten realen Stoffsysteme verzichtet werden.

Selektion spezifischer Liganden (ILBT)

Biopanning gegen *Lactobacillus brevis*

Gegen den Modellkeim *Lactobacillus brevis* wurde ein Biopanning bis zur vierten Runde durchgeführt. Die Selektion unspezifisch bindender Peptide sollte durch Subtraktion gegen *Pediococcus* sp. und *Enterococcus faecalis* unterbunden werden. In 40 vereinzelt Phagen ließen sich nach der Sequenzierung vier verschiedene Fusionspeptide identifizieren. Eine Synthese aller vier identifizierten Peptide war mit dem zur Verfügung stehenden Budget nicht möglich. Nur das Peptid mit der größten Häufigkeit wurde von der Firma SeqLab GmbH synthetisiert und für die anschließende Kopplung an Magnetbeads einerseits am N-terminalen und andererseits am C-terminalen Ende mit Biotin funktionalisiert.

Zur Beurteilung der Eignung dieser Peptide als Liganden für die Biomagnetische Separation wurden streptavidinlabelte Magnetbeads mit den biotinylierten Peptiden beladen und die Wiederfindungsrate für verschiedene Puffersysteme, pH-Werte und Salzkonzentrationen bestimmt. Es zeigten sich wie erwartet höhere Wiederfindungsraten bei einer BMS von *L. brevis* im Vergleich zu anderen Mikroorganismen. Eine Biotinfunktionalisierung am C-terminalen Ende brachte höhere Wiederfindungsraten. Das entsprach den Erwartungen, da die präsentierten Peptide während des Biopannings über ihr C-terminales Ende mit dem Phagen verbunden sind.

Insgesamt blieben die Wiederfindungsraten mit maximal 25 % jedoch weit hinter den Erwartungen zurück. Demnach sind die getesteten Peptide als Liganden für die Biomagnetische Separation von *L. brevis* ungeeignet. Als denkbare Ursachen kommen in Frage:

- Die Bindung der biotinylierten Peptide durch das Streptavidin auf den Magnetbeads behindert die Anlagerung der Peptide an die Zielzellen. Deshalb wurde in nachfolgenden Experimenten stets ein Spacer zwischen Bead und Ligand eingefügt.
- *L. brevis* bildet auf der Oberfläche der Zellen Exopolysaccharide. Binden die funktionalisierten Magnetbeads an diese Schicht, ist fraglich, ob während der Waschschriffe oder beim Anlegen eines Magnetfeldes nicht nur Teile davon abgelöst werden. Da diese Effekte zumindest nicht ausgeschlossen werden können, wurden weitere Experimente mit *L. brevis* zurückgestellt.

Biopanning gegen *Campylobacter jejuni*

In einem ersten Biopanningexperiment gegen *Campylobacter jejuni* wurden parallel zwei Ansätze bis zur vierten Runde geführt. Subtraktionskeime waren *Campylobacter fetus* und *Campylobacter*

¹ S. Deponte u. a., 'Biomagnetic separation of *Escherichia coli* by use of anion-exchange beads: measurement and modeling of the kinetics of cell-bead interactions', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379 (2004), 419-426.

coli. Die Sequenzierung lieferte mit 8 bzw. 10 verschiedenen Sequenzen deutlich mehr Varianten, als in anderen Biopannings am ILBT bisher beobachtet. Viele der Sequenzen traten jedoch nur in einem einzigen Klon auf. Die beiden Sequenzen mit der je Ansatz höchsten Häufigkeit wurden von der Firma Genaxxon mit einem um zwei Cysteine erweiterten C-terminalen Ende synthetisiert. Die SH-Gruppen der Cysteine dienen als Bindestellen für Crosslinker, die die Peptide über ihr C-terminales Ende an die Beads koppeln und gleichzeitig als Spacer fungieren. Eine zusätzliche Fluoreszenzmarkierung ermöglicht das Monitoring des Anbindens der Peptide an Magnetbeads bzw. Zielzellen.

Die Kopplung der Peptide an die Beads konnte erfolgreich durchgeführt werden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich dies durch eine deutliche Zunahme der peripheren Fluoreszenz der Beads. Die hohe Eigenfluoreszenz der Beads verhinderte jedoch eine quantitative Bestimmung der gebundenen Peptidmenge.

Beide Peptide interagierten in nachfolgenden Experimenten kaum mit dem Zielkeim. Es konnten weder bei der BMS akzeptable Wiederfindungsraten erreicht werden, noch führte eine Inkubation der Zellen mit ungebundenem, fluoreszierendem Peptid zu einer Fluoreszenzmarkierung. Demnach sind beide Peptide als Liganden für die BMS ungeeignet.

Für das Biopanning wurden die *Campylobacter sp.* submers in Flüssigmedium mit lysiertem Blut kultiviert. Dabei ließen sich nur geringe Zellkonzentrationen erreichen. Hinzu kommt, dass durch Koagulation des zugesetzten Bluts zusätzliche Feststoffe bilden, die von den Zellen nicht abgetrennt werden konnten. Zum einen verfälschte dies die Bestimmung der Zellkonzentration, zum anderen stellten die Koagulate zusätzliche Targets während des Biopannings dar. Zwar kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil dieser falsch selektierten Peptide durch die Subtraktion entfernt werden konnte. Ob dies jedoch ausreicht, wenn die Konzentration des eigentlichen Targets zu gering war, bleibt unklar.

Das Biopanning gegen *C. jejuni* wurde wiederholt, diesmal nur als einfacher Ansatz, mit Zellmaterial, das auf Platten gezogen wurde, von denen einzelne Kolonien entnommen und für die Biopanningexperimente in PBS suspendiert wurden. Komponenten des Nährmediums bleiben so im Agar oder können durch eine Filtration über Glaswolle zurückgehalten werden. Das Biopanning verlief deutlich stringenter, 20 sequenzierte Proben enthielten nur zwei verschiedene Sequenzen. Beide Sequenzen wurden mit der oben beschriebenen Funktionalisierung am C-terminalen Ende synthetisiert.

C. jejuni Zellen hafteten nur in sehr geringen Maße an Beads, die mit den Peptiden funktionalisiert waren. Entsprechend niedrig waren die Wiederfindungsraten. Auch ein Anfärben der Zellen mit ungebundenem Peptid gelang nicht, obwohl in diesem Biopanning genug Zellmaterial zum Einsatz kam. Denkbar ist, dass die von den Platten entnommenen Zellen eine hohe physiologische und morphologische Diversität aufwiesen, denn die notwendigen Kultivierungszeiten lagen z. T. bei 2 Wochen.

SELEX gegen *Campylobacter jejuni*

Wegen des ausbleibenden Separationserfolgs wurde die so genannte SELEX-Methode als alternatives Verfahren am ILBT etabliert. Hierbei werden Aptamere (einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle) ähnlich dem Biopanning aus einer hochdiversen Bibliothek selektiert. Ein erster Schwerpunkt der Arbeiten lag in der Anpassung der Protokolle auf den Einsatz ganzer Zellen als Selektionstargets.

In den ersten Versuchen wurden biotinylierte Reverse-Primer genutzt, um später die während der PCR gebildeten Komplementärstränge mit streptavidinlabelten Magnetbeads abzuscheiden. Dieses Trennverfahren erwies sich als unzulänglich. Im Verlauf des SELEX-Prozesses reicherten sich fehlerhaft amplifizierte Aptamere an, deren Länge kontinuierlich zunahm. Die Falschamplifikation entstand wahrscheinlich durch unerwünschte Zusammenlagerung einzelner Aptamere bei der Amplifikation und ließen sich mit Hilfe der Magnetbeads nicht abscheiden. Die SELEX-Versuche mit biotinylierten Primern mussten daher vorzeitig abgebrochen werden. Daraufhin wurde das Protokoll an die Verwendung eines HEGL-funktionalisierten Primers angepasst. Dessen Verwendung

bewirkt, dass sich bei der PCR zwei unterschiedlich lange DNA-Stränge bilden, die durch eine denaturierende PAGE voneinander getrennt werden können. Insbesondere die PCR-Bedingungen mussten mehrfach modifiziert werden, bis die Amplifikation zuverlässig lief.

Es folgte ein SELEX gegen *C. jejuni* bis zur 6. Runde. Hierbei wurden die Zellen in einem blutfreien Medium unter Schutzatmosphäre mit einer für *Campylobacter* sp. optimalen Sauerstoffkonzentration angezogen und so die oben beschriebenen Probleme vermieden.

Um zu beurteilen, ob das angereicherte Aptamergemisch Liganden mit den gewünschten Eigenschaften enthält, wurde direkt im Anschluss an die SELEX geprüft, inwiefern die Aptamere in der Lage sind, an Zellen von *C. jejuni* zu binden. Durch die Verwendung FITC-markierter Primer fluoreszieren alle Aptamere ab Runde 2. Erwartet wurde, dass mit steigender Rundenzahl die Zellen stärker fluoreszieren, da eine zunehmende Zahl von Aptamere an sie binden kann. Dies konnte jedoch weder mikroskopisch, mit einem Fluoreszenzspektrometer oder mittels Flowcytometry nachgewiesen werden. Zwar ist denkbar, dass das Aptamergemisch einzelne spezifisch bindende Aptamere enthielt, offenbar waren aber deren Zielstrukturen auf der Zelloberfläche nicht so häufig vertreten, dass ein detektierbares Anfärben der Zellen über die Aptamere möglich war. Von der aufwändigen Vereinzelung und anschließenden Sequenzierung der Aptamere wurde daher abgesehen.

Biopanning gegen *Staphylococcus aureus*

Zum Abschluss der Arbeiten zur Identifizierung spezifisch bindender Liganden wurde *Staphylococcus aureus* als weiteres Target für ein Biopanning verwendet. Als Subtraktionskeime kamen hier *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus capitis* zum Einsatz. Nach der vierten Biopanningrunde wurden die entsprechenden Gensequenzen analysiert. Sie kodierten für 8 verschiedene Fusionspeptide.

Die Bindung der entsprechenden Phagen an die Zielzellen konnte mit Hilfe von ELISA-Tests bestätigt werden. Außerdem wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz gezeigt, dass einige der Phagenklone mit Hilfe des präsentierten Peptides in der Lage sind, den von *S. aureus* zu binden.

Zwei der identifizierten Peptide wurden durch die Firma Genaxxon synthetisiert und mit Cys-Cys-Lys(FITC) funktionalisiert. Mit beiden Peptiden gelangen eine Fluoreszenzmarkierung von *S. aureus*, sowie eine Abscheidung von *S. aureus* Zellen bei der BMS mit Wiederfindungsraten von bis zu 80 %. Aus Zeitmangel konnten die beiden Peptide für Kompartimentierungsversuche und zur Herstellung von Magnetbead-Zielzellen-Mikrokapsel-Komplexen (s. u.) im Rahmen dieses Projekts nicht mehr eingesetzt werden.

Markierung der separierten Zellen (ILBT und iba)

Das ursprüngliche Konzept zur Detektion sah vor, an separierte Zellen Mikrokapseln zu binden, die nach Änderung ausgewählter Parameter (pH, Temperatur, etc.) Fluorochrome ausschütten. Im Verlauf der Projektbearbeitung stellte sich heraus, dass dieser Prozessschritt nicht notwendig ist, wenn Mikrokapseln mit einer ausreichend hohen Fluoreszenzdichte eingesetzt werden. Zum Einsatz kamen deshalb mit Antikörper funktionalisierte Mikrokapseln mit einem Rhodamin B Kern.

Für die angestrebte Separation und Detektion einer Zelle ist es notwendig, dass sowohl Magnetbeads als auch Mikrokapseln gleichzeitig an sie binden. In Ermangelung selbst selektierter spezifischer Liganden wurde ein Testsystem mit kommerziell verfügbaren Antikörpern gegen *E. coli* und *S. Typhimurium* etabliert, um die Bildung dieser Magnetbead-Zielzellen-Mikrokapsel-Komplexe (MZM-Komplexe) nachzustellen.

Getestet wurden zunächst Melaminharz (MF)- und SiO₂-Mikrokapseln. Die positiv geladenen MF-Mikrokapseln hatten einen größeren Durchmesser (1000 nm) als die negativ geladenen SiO₂-Mikrokapseln (600 nm). Zwar wiesen diese ohne Antikörper funktionalisierten Mikrokapseln keine nennenswerten Agglomerationen und eine gute Verteilung in der Suspension und im Tropfen auf, allerdings waren die Fluoreszenzintensitäten nicht ausreichend, um sie auf das Detektionssystem zu applizieren. Die daraufhin untersuchten Mikrokapseln (Ø 910 nm bzw. 2,8 µm), deren Fluorochrom (Rhodamin B) im Kern lokalisiert ist, wiesen eine weitaus höhere Fluoreszenzintensität (100-

fach) auf. Es konnte eine erhöhte Agglomerationsneigung für die mit Antikörper funktionalisierten Mikrokapseln (\varnothing 910 nm und 2,8 μ m) und Magnetbeads (\varnothing 2,3 μ m) festgestellt werden. Weitere Untersuchungen der Partikel zeigten, dass in Wasser die geringste Agglomerationsneigung zu beobachten war. Andere Faktoren wie die Zugabe von Additiven (Imidazol), Puffer (Sörensen, PBS) oder pH-Wert Änderungen erbrachten keine signifikanten Verringerungen, sondern in bestimmten Fällen eher Verstärkungen der Agglomerationen zwischen Magnetbeads und Mikrokapseln, sowie auch untereinander. Grund für dieses Verhalten sind die sich bei höherer Salzkonzentration bildenden Salzbrücken, die elektrostatisch die Agglomeration der Partikel erhöhen. Ein vollkommen unterschiedliches Agglomerationsverhalten zwischen Magnetbeads und Mikrokapseln konnte man bei der Zugabe des Tensids Triton X-100 feststellen. In einem Mischungsverhältnis von 1:1 zwischen der wässrigen Partikel- und Tensidlösung reduzierte sich die Agglomeration bei den Mikrokapseln, während sie sich bei den Magnetbeads stark erhöhte. Ein allgemein die Agglomeration verringernder Effekt konnte nach Ultraschallbadbehandlung (10 min; $v_{HF} = 35$ KHz) beobachtet werden. Bestätigt wurden diese Untersuchungen durch Zetapotentialmessungen der verschiedenen Partikelsorten. Hier zeigte sich bei Antikörper funktionalisierten Magnetbeads eine wesentlich stärkere Verringerung der interpartikulären Abstoßungskräfte (8-fach) als bei Mikrokapseln (3-fach) gegenüber den nicht funktionalisierten Partikeln. Grund können unterschiedliche Beladungen mit dem Antikörper während der Partikelbeschichtung sein. Diese Ergebnisse bilden einen wichtigen Ansatz für weitergehende Untersuchungen zur gezielten Vermeidung der Agglomerationen, die die Bildung der MZM-Komplexe negativ beeinflussen.

Entwicklung einer geeigneten Kompartimentierungsmethode (iba)

Chip- und sondenbasierte Kompartimentierung

Eine weitere Zielvorgabe innerhalb des Projektes betraf die Integration eines Chips auf Polymerbasis (Polydimethylsiloxan, PDMS) in das mikroskopische Detektionssystem. Als kostengünstige Alternative zum bereits etablierten Glas-Chip (IPHT, Jena) sollte dieser Chip als „disposable“ die Prozessschritte Kompartimentieren, Mischen und Mikroskopieren ermöglichen. Um die räumlichen Möglichkeiten für diese Prozessschritte zu gewährleisten, wurden Veränderungen in den Chipdimensionen (von 22 mm x 22 mm auf 22 mm x 50 mm) vorgenommen. Untersuchungen mit einem Glas-Chip ergaben, dass aufgrund der entsprechenden Kanaltiefe (200 μ m) eine zweifache Einstellung der z-Achse am Mikroskop notwendig war, um die Mikrokapseln vollständig zu erfassen. Die Modifizierung der Kanaldimension des neu etablierten PDMS-Chips im Mikroskopierbereich sollte dafür sorgen, dass keine Veränderung in der x- und y-Achse vorgenommen werden muss, um die Mikrokapseln im Durchfluss zu erfassen. Im Ergebnis steht eine Kanalstruktur, die eine einmalige Nachstellung der z-Achse am Mikroskop notwendig macht, aber eine mikroskopische Untersuchung jedes einzelnen Kompartiments ermöglicht. Bei weiteren Optimierungen entstanden fluidische Probleme beim Durchgang von Kompartimenten zwischen Haupt- und Mikroskopierkanal. Mischprobleme innerhalb des segmentierten Flusses traten keine auf. Trotzdem konnte durch eine deutlich verbesserte Passgenauigkeit zwischen dem Master für den PDMS-Chip und dem Polycarbonat-Körper (Chiphalterung), sowie der Verbindungstechnik gleichmäßig große Kompartimente in kleinen Mikrokanälen (0,5 mm x 2 mm) über einen längeren Zeitraum (4 Stunden) erzeugt werden, ohne Undichtigkeiten im System zu beobachten. Dieser Zeitraum ist bereits ausreichend für die hier neu zu entwickelnde Biomonitoring-Methode. Weitere Untersuchungen mit anderen Polymeren (Polyoxymethylen (POM) und Polyethersulfon) und verschiedenen organischen Lösungsmitteln zeigten unterschiedliche Ergebnisse und keine schnelle kostengünstige Lösung.

Eine zum Chip-basierten System alternative Kompartimentierungsmethode wurde für diese Applikation getestet. Diese auf der Zwei-Fluid-Technik (ZFT) basierende Sonde ermöglicht die gleichmäßige Kompartimentierung der aus Antikörper beladenen Magnetbeads-Zielzellen-Komplexe (MZ-Komplexe). Eine Kompartimentierung von MZM-Komplexen scheiterte bereits bei der Inkubation aufgrund der unterschiedlichen Agglomerationscharakteristika der Partikelsorten. Die Bildung des MZ-Komplexes berücksichtigte die zuvor vom ILBT erstellten theoretischen Untersuchungen der Bindungskinetiken zwischen Magnetbeads und Zielzellen (*E. coli*) und entsprechende empiri-

sche Tests. Zur mikroskopischen Beobachtung der Bindungsverhältnisse wurden die *E. coli* sowohl mit Cy3-Hybridisierungssonden (λ_{Ex} : 550 nm; λ_{Em} : 572,5 nm) „gelabelt“ als auch mit Nalidixinsäure behandelt und mit DAPI (λ_{Ex} : 360 nm; λ_{Em} : 461 nm) gefärbt. Die stabilsten MZ-Komplexe wurden durch Hybridisierungssonden gelabelte *E. coli* mit Magnetbeads (\varnothing 2,3 μm) erhalten (Abb. 2). Diese Bindung erwies sich sowohl vor als auch nach der BMS als stabil. Untersuchungen des MZ-Komplexes nach der Kompartimentierung ergaben auch erkennbare Bindungen zwischen den *E. coli* und den Magnetbeads. Beeinträchtigt wurde die Beobachtung durch den Einfluss des Fixierungsmittels für *E. coli*. Weniger stabil waren die Bindungsverhältnisse zwischen *E. coli*, die mit Nalidixinsäure behandelt und anschließend mit DAPI gefärbt wurden. Die Methode diente zur besseren Beobachtung der hierdurch größeren *E. coli* und des entsprechenden Bindungsverhaltens der Magnetbeads. Stabiler erwiesen sich hier *E. coli* (DAPI gefärbt ohne Nalidixinsäurebehandlung) mit den Magnetbeads, da im Vergleich zu Nalidixinsäure behandelten *E. coli* nach der Kompartimentierung teilweise gebundene Bereiche beobachtet werden konnten. Die Gründe der unterschiedlichen Komplexstabilität können neben dem entstehenden Scherstress während der BMS und der Kompartimentierung, die Beeinflussung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem am Magnetbead gebundenen Antikörper und den Bakterien durch die Nalidixinsäure sein. Deren Carboxylgruppen können bei entsprechendem pH-Wert (neutral bis alkalisch) leicht H^+ -Ionen freisetzen, die die negative Oberflächenladung des entsprechenden Bakteriums herabsetzen und somit eine Schwächung der Bindung zwischen den am Magnetbead funktionalisierten Antikörpern und den Bakterien verursachen.

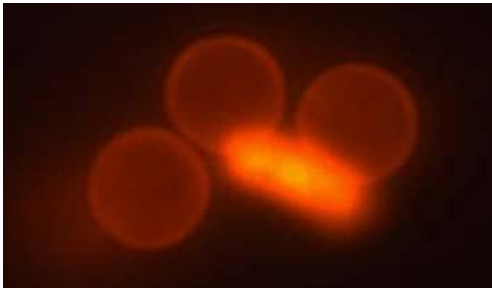


Abb. 2: Mikroskopische Aufnahme (Belichtungszeit: 5 s) von mit Hybridisierungssonden gelabelten *E. coli*, die an Antikörper funktionalisierte Magnetbeads (\varnothing 2,3 μm) gebunden sind.

Detektion / Quantifizierung / Validierung (iba und IBLT)

Vergleich der mikroskopischen und spektralphotometrischen Fluoreszenzdetektion

Ziel war die optische Detektion mit dem Mikroskop und mit einem kundenspezifischen Aufbau, der auf einer spektroskopischen Messung basiert. Das kostengünstig und modular aufgebaute System sollte eine mikroskopisch kontrollierte Kalibrierung des Fluoreszenzsignals des MZM-Komplexes basierend auf einer Ja-Nein-Entscheidung sowie einer anschließenden spektroskopischen Validierung des Signals für eine entsprechende Qualitätskontrolle ermöglichen. Als Referenzmethode wurde die Kopplung eines kommerziellen Spektralphotometers im Durchfluss für den segmentierten Fluss etabliert. Hinsichtlich der Automatisierung der chipbasierten mikroskopischen Detektion konnte mit hauseigenen Mitteln das Beleuchtungssystem des Mikroskops durch eine bezüglich der Lichtintensität nicht schwankende Lichtquelle ausgetauscht werden (MT20-Beleuchtungssystem, Olympus Deutschland GmbH), die es ermöglicht, in Bezug auf die Fluoreszenzintensität ein reproduzierbares Bild pro Kompartiment aufzunehmen. Die Steuerungs- und Datenbanksoftwaremodule zur Qualitätskontrolle wurden integriert. Entsprechende Datenblattvorlagen liegen bereits vor und können bei Versuchen mit entsprechenden Realproben zum Einsatz kommen, die aufgrund der Probleme der selektiven Bindung der Zielzellen bisher nicht durchgeführt werden konnten. Von den getesteten Fluorochrome (FITC, Rhodamin B; Fluka und DY-481XL, DY-485XL; Dyomics GmbH) erwies sich im Spektralphotometer FITC am sensitivsten, aufgrund der besseren Fluoreszenzsignalstabilität wurde allerdings Rhodamin B ausgewählt. Weitere Untersuchungen zeigten,

dass bei Verdünnung der Ausgangsstammlösung die Detektion einer Mikrokapself pro Kompartiment sowohl mikroskopisch (Abb. 3) als auch spektroskopisch möglich ist.

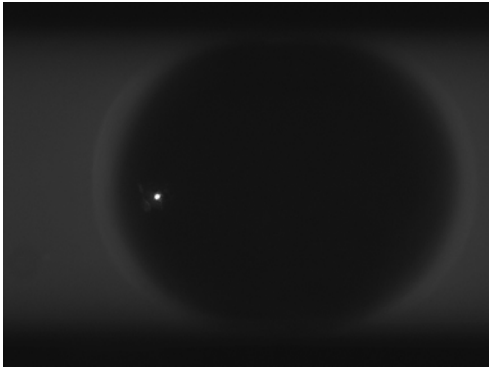


Abb. 1: Mikroskopische Aufnahme (Belichtungszeit: 200 ms) von einer detektierten Mikrokapself (\varnothing 910 nm) im Kompartiment. Das Fluorochrom Rhodamin B befand sich im Kern dieser Mikrokapself.

Die Mikrokapselfmenge und die entsprechende Fluoreszenzintensität (hier als elektrisches Signal in mV in Abhängigkeit von Detektorempfindlichkeit und Verstärkungsfaktor angegeben) in einem Tropfen stehen vor allem bei den größeren Mikrokapselfn (\varnothing 2,8 μ m) nicht in einem direkten Verhältnis zueinander (Tab. 1). Einfluss hierauf können die bei der Detektion beobachteten Schwankungen der Kompartimentgröße nehmen. Außerdem können Verschleppungseffekte mit zuvor gemessenen kleineren Mikrokapselfn (\varnothing 910 nm) nicht ganz ausgeschlossen werden. Zusätzlich entstehen durch die speziellen Strömungsverhältnisse im Kompartiment, die zu Mikrokapselfbewegungen führen, möglicherweise Streueffekte, die die Detektion der Fluoreszenzintensität beeinflussen. Dies ist aber für die Bestimmung eines Schwellenwertes im Rahmen der neuen Methode unerheblich.

Tab. 1: Übersicht der spektroskopische Detektion verschiedener Fluoreszenz- „gelabelter“ Mikrokapselfn im Kompartiment in Relation mit einer wässrigen Lösung

Substanz	Mikrokapselfdurchmesser [nm]	Fluoreszenzintensität [mV]	Differenz Fluoreszenzintensität Mikrokapselfn gegen Wasser [mV]	Anzahl Mikrokapselfn pro Kompartiment	Kompartimentengröße [nl]
	910	85	5	1	294
Mikrokapself	910	96	16	3	196
	2800	110	30	2	235
	2800	150	70	3	235
Wasser	-	80	-	-	196

Spektroskopische Untersuchungen zur Sensitivität des Fluoreszenzsignals ergaben für die *E. coli*-Färbung mit Hybridisierungssonden eine um etwa 10-fach höhere Sensitivität als für *E. coli*, die mit DAPI gefärbt waren. Eine mögliche Erklärung könnte hier die niedrige Quanteneffizienz, die die Stärke des Fluoreszenzsignals definiert, im UV-Wellenlängenbereich des Photomultipliers sein. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich eine 10-fach höhere Sensitivität bei DAPI gefärbten *E. coli*, gegenüber denen mit Hybridisierungssonden gefärbten *E. coli*.

Überprüfung des Gesamtkonzepts (iba und ILBT)

Aufbau eines Labormusters

Den Validierungsschritt, den bisher ein kommerzielles Fluoreszenz-Spektralphotometer als Detektionseinheit übernommen hat, sollte durch ein entsprechendes Labormuster ersetzt werden. Um den kostenintensiven Einsatz eines Lasers zu vermeiden, wurde ein LED-basiertes Detektionssystem entwickelt. Es zeigte sich, dass bei Messungen mit dem Fluorochrom FITC und Rhodamin B mit Hilfe 20 kurzer Lichtpulse (10 ms/Blitz) deutlich niedrigere Schwellenwerte (100-fach) als bei den kontinuierlichen Fluoreszenzanregungen erreicht wurden. Im neu überarbeiteten Labormuster wurden zum Einen ein Anregungs- und Emissionsfilter, sowie eine kommerzielle Durchflussküvette ($V = 2 \mu$ L, 0,3 mm x 1 mm x 12 mm, UB-Analytik) integriert. Der Ersatz durch eine kostengünstige-

re entwickelte Glasküvette (LTF GmbH, Ilmenau), mit in der Küvette bereits integrierten Lichtleitern, konnte innerhalb des Berichtszeitraums aufgrund von Dichtigkeitsproblemen innerhalb des Küvettenkanals mit Fluorochromen nicht getestet werden. Im Vergleich zum vorherigen Aufbau konnte eine Reduktion des Signal-Rausch-Verhältnisses um 30% erzielt werden. Allerdings wurde bis zum Ende des Berichtszeitraums durch Softwaregründe nur mit kontinuierlicher LED-Anregung gearbeitet, so dass die Schwellenwerte von jeweils 1 μM für Rhodamin B und FITC nur vorübergehende Aussagen über die Sensitivität des Systems geben. Vorangegangenen Untersuchungen an einzelnen Modulen lassen hier eine Sensitivitätssteigerung um das 100-fache erwarten. Die Basis für die Konstruktion und Bau eines marktfähigen Gerätes ist damit gelegt, was aufgrund seiner kompakten kleinen Größe und seiner modularen Form für viele verschiedene Applikationen einsetzbar ist.

Veröffentlichungen

Publikationen:

Steingroewer, J. (2006) Biomagnetische Separation in einem Verfahren zum schnellen Biomonitoring von Kontaminanten in Lebensmitteln. (Dissertation) Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik. Technische Universität Dresden.

Steingroewer, J., Boschke, E., Lemke, K., Gastrock, G., Metze, J., Bley, Th. (2006) Schnelldachweis von Mikroorganismen auf Basis von Biomagnetischer Separation und Nanotechnologie. 13. Heiligenstädter Kolloquium: „Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt“, Tagungsband 255-263.

Steingroewer, J., Bley, Th., Boschke, E. (2006) New Approaches in the Diagnostics of Food Contaminants in a Combined System by Biomagnetic Separation, Karlsruhe Symposium on Magnetic Separation and Nanomagnetism, Tagungsband.

Steingroewer, J., Bley, Th., Bergemann, C., Boschke, E. (2007) Biomagnetic Separation of Salmonella Typhimurium with high affine and specific ligand peptides isolated by Phage Display Technique. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 311 (1), 295-299.

Boschke, E. (2007) Verfahren zum Biomonitoring in Lebensmitteln - etablierte Methoden und Entwicklungstrends, Chancen und Grenzen (Habilitation) Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik. Technische Universität Dresden.

Schemberg, J., Grodrian, A., Römer, R., Gastrock, G., Lemke, K. (2008) Optische Detektion von mikrobiellen Lebensmittelkontaminanten im segmentierten Fluss. 14. Heiligenstädter Kolloquium: „Technische Systeme für die Lebenswissenschaften“, Tagungsband S.169 – 176, ISBN 978-3-00-025695-0.

Schemberg, J., Grodrian, A., Römer, R., Gastrock, G., Lemke, K. (2008) Online optical detection of food contaminants in microdroplets. Eng. Life Sci. (eingereicht).

Vorträge

Steingroewer, J., Boschke, E., Lemke, K., Gastrock, G., Metze, J., Bley, Th. (2006) Schnelldachweis von Mikroorganismen auf Basis von Biomagnetischer Separation und Nanotechnologie. 13. Heiligenstädter Kolloquium: „Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt“, Heilbad Heiligenstadt, 25.-27. September.

Steingroewer, J., Bley, Th., Boschke, E. (2006) New Approaches in the Diagnostics of Food Contaminants in a Combined System by Biomagnetic Separation, Karlsruhe Symposium on Magnetic Separation and Nanomagnetism, Karlsruhe, 04.-05. Oktober.

Steingroewer, J., Bley, Th., Boschke, E. (2006) New Approaches in the Diagnostics of Contaminants from Complex Samples by Biomagnetic Separation, 16th Annual Conference of DGfZ, Leipzig, 18.-21. Oktober.

Schemberg, J., Lemke, K., Grodrian, A., Gastrock, G., Schumacher, J.T., Metze, J. (2008) The pipe based bioreactors: An innovative high-throughput bioreaction platform with a wide spectrum of analytical applications, 4. Workshop „Chemische und biologische Mikrolabortechnik“, Elgersburg, 26.-28. Februar.

Schemberg, J., Grodrian, A., Römer, R., Gastrock, G., Lemke, K. (2008) Optische Detektion von mikrobiellen Lebensmittelkontaminanten im segmentierten Fluss, 14. Heiligenstädter Kolloquium: „Technische Systeme für die Lebenswissenschaften“, Heilbad Heiligenstadt, 22.-24. September.

Schemberg, J., Grodrian, A., Römer, R., Gastrock, G., Lemke, K. (2008) Online optical detection of food contaminants in microdroplets, Workshop “Droplet-based microfluidics for high-throughput applications in life sciences”, Jena, 13.-14. November.

Poster

Steingroewer, J., Bley, Th., Bergemann, C., Boschke, E. (2006) Biomagnetic separation of Salmonella spp. with high affine and specific ligands isolated by Phage Display. 6th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Krems, 17.-20. Mai.

Steingroewer, J., Boschke, E., Bley, Th. (2006) Biomagnetische Separation in einem Verfahren zum Schnelldachweis von Mikroorganismen in Lebensmittelproben, Jahrestagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Dresden, 18.-20. September.

Schemberg, J., Grodrian, A., Weber, Ph., Steingroewer, J., Gastrock, G., Bley, Th., Lemke, K. (2007) Schnelldachweis von Mikroorganismen auf der Basis Biomagnetischer Separation und Nanotechnologie. 5. Symposium Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittel-Mikrobiologie, Lemgo, 27.-29. Juni.

Schemberg, J., Grodrian, A., Weber, Ph., Steingroewer, J., Gastrock, G., Bley, Th., Lemke, K. (2007) Rapid Detection of Microorganisms Based on Biomagnetic Separation and Nanotechnology. Symposium Nano Engineering meets Life Science, Hannover, 08.-09. Oktober.

Lemke, K., Schemberg, J., Grodrian, A., Gastrock, G., Schumacher, J., Metze, J. (2007) „pipe based bioreactors“ – Eine innovative High-Throughput Bioreaktionsplattform mit breitem Anwendungsspektrum. Dechema-Tagung „Lebensmittelwissenschaften im Fokus Lipide und Lipoide – Proteine und Enzyme“, Frankfurt am Main, 05.-06. November.

Schemberg, J., Grodrian, A., Gastrock, G., Weber, Ph., Steingroewer, J., Boschke, E., Bley, Th., Lemke, K. (2008) Schnelle Qualitätskontrolle mit der „pipe based bioreactors“-Plattform in der Lebensmittelmikrobiologie, 4. Workshop „Chemische und biologische Mikrolabortechnik“, Elgersburg, 26.-28. Februar.

Schemberg, J., Grodrian, A., Gastrock, G., Weber, Ph., Steingroewer, J., Boschke, E., Bley, Th., Lemke, K. (2008) Biomagnetic separation technique meets the „pipe based bioreactors“-platform, ANALYTICA, München, 01.-04. April.

Schemberg, J., Grodrian, A., Gastrock, G., Weber, Ph., Steingroewer, J., Boschke, E., Bley, Th., Lemke, K. (2008) Angewandte Mikrosystemtechnik – schnelle Qualitätskontrolle in der Lebensmittelindustrie, „Biotechnika 2008“, Hannover, 07.-09. Oktober.

Weber, Ph., Steingroewer, J., Juthong, T., Bley, Th., Boschke, E. (2008) Gewinnung spezifischer Liganden zur Anreicherung und Detektion mikrobieller Kontaminanten, 14. Heiligenstädter Kolloquium „Technische Systeme für die Lebenswissenschaften“, Heilbad Heiligenstadt, 22.-24. September.

Schemberg, J., Grodrian, A., Weber, Ph., Steingroewer, J., Boschke, E., Bley, Th., Lemke, K., Gastrock, G. (2008) Angewandte Mikrosystemtechnik - schnelle Qualitätskontrolle in der Lebensmittelindustrie, Innovationstag Thüringen, Erfurt, 05. November.

Schemberg, J., Grodrian, A., Römer, R., Quade, M., Gastrock, G., Lemke, K. (2008) New devices for online analysis and generation of microdroplets, Workshop „Droplet-based microfluidics for high-throughput applications in life sciences“, Jena, 13.-14. November.

Messen:

TU-Dresden, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik und iba e. V., Fachbereich Bioprozesstechnik (2007) Biomonitoring auf Grundlage der magnetischen Separation. Messe „Nanosolution“, Frankfurt am Main, 21.-23. November.

iba e. V., Fachbereich Bioprozesstechnik und TU-Dresden, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (2008) Entwicklung eines Schnelldachweises von Verderbnis- und Krankheitserregern in Lebensmittelproben. Präsentation auf der Messe „ANALYTICA“, München, 01. -04. April.

Radiobeitrag:

Turbo für die Lebensmittelkontrolle: Beitrag für K. Lemke im Deutschlandfunk am 09.05.2008 um 16.35 Uhr im Rahmen von „Forschung Aktuell“ zum Thema: „Schnelltests könnten bald Bakterienkulturen ersetzen“; von Hellmuth Nordwig

Durchführende Forschungsstellen

Technische Universität Dresden
Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (ILBT)
Lehrstuhl Bioverfahrenstechnik
Bergstrasse 120
01069 Dresden

Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba e.V.)
Fachbereich Bioprosesstechnik
Rosenhof
37308 Heilbad Heiligenstadt

Leiter der Forschungseinrichtungen

Prof. Dr. Th. Bley (ILBT, TU Dresden)

Prof. D. Beckmann (iba e.V., Heiligenstadt)

Projektleiter

PD Dr. E. Boschke (ILBT, TU Dresden)

Dr. K. Lemke (iba e.V., Heiligenstadt)