

just in time-Selection: Entwicklung eines halbautomatisierten SELEX-Verfahrens für die zeitnahe Generierung von Aptameren

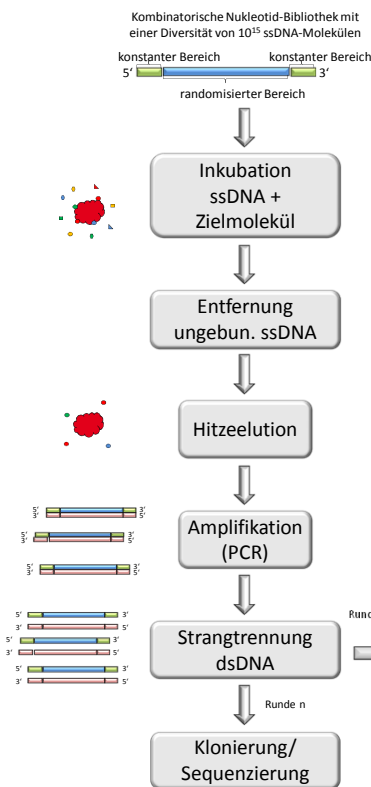
Hünniger, Tim; Wessels, Hauke; Fischer, Christin; Herrmann, Luise; Fischer, Markus

HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, www.hsf.org, www.chemie.uni-hamburg.de/lc
Ansprechpartner: Tim.Huenniger@chemie.uni-hamburg.de

Einführung und Zielsetzung

Als Aptamere werden ssDNA-Fragmente mit einer Länge von 25 - 80 Basen bezeichnet, welche ähnlich wie Antikörper in der Lage sind, über intramolekulare Watson-Crick-Wechselwirkungen dreidimensionale Strukturen auszubilden und dadurch mit hoher Spezifität und Affinität an verschiedenste Targets zu binden. Der einmalig durchzuführende SELEX-Prozess (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) zur Selektion der entsprechenden Aptamere aus einer kombinatorischen Nukleotid-Bibliothek erfolgt im Gegensatz zur Antikörperherstellung *in vitro*, sodass die Anforderungen der RL 2010/63/EU erfüllt werden und diese somit eine kostengünstige und robuste Alternative für die Bioanalytik darstellen^[1]. Ein Nachteil der klassischen SELEX ist der relativ hohe zeitliche Aufwand, sodass im Rahmen der hier vorgestellten Prozessevolution mehrere Parameter optimiert wurden und dadurch eine zeitnahe Generierung von Aptameren für verschiedenste Fragestellungen erfolgen kann. Im Mittelpunkt der vorgestellten Entwicklung steht die Aufteilung der SELEX in zwei separate Teilprozesse (Fishing und BEAMing), welche bei kombinierter Durchführung dem iterativen SELEX-Prozess entsprechen und hinsichtlich der Automatisierung und Reproduzierbarkeit zu stark verbesserten Resultaten führen.

SELEX-Prozess



Der SELEX-Prozess ist gekennzeichnet durch eine iterative Abfolge von Selektion und Amplifikation, wodurch die Affinität des Aptamerpools gegenüber dem Target sukzessive gesteigert wird. Grund hierfür ist die mit steigender Zyklenzahl erhöhte Stringenz, welche durch zusätzliche Waschschritte und Vergrößerung der eingesetzten Volumina verstärkt wird.

Die Durchführung des klassischen SELEX-Prozesses ist mit einem hohen personellen und materiellen Aufwand verbunden. Dieser nimmt darüber hinaus zumeist 3 - 6 Monate in Anspruch.

Fishing

Das Fishing beinhaltet die SELEX-Teilschritte Inkubation, Entfernung der ungebundenen ssDNA sowie Hitzeelution und kann für bis zu 12 Fragestellungen parallel durchgeführt werden. Die entsprechenden Waschlösungen, Aptamerlösungen und SELEX-Puffer werden in DeepWell-Plates vorgelegt, wodurch die kovalent an magnetische Partikel gebundenen Targets durch einen magnetischen Separator (*KingFisher Duo™*, Thermo Fisher Scientific Inc.) automatisch in die entsprechenden Lösungen transportiert werden können. Die Volumina und Inkubationszeiten sind variabel, sodass mit fortschreitender SELEX-Zyklenzahl eine Stringenzsteigerung möglich ist. Final erfolgt die Elution der gebundenen Aptamere durch Temperaturerhöhung damit die Lösungen direkt als Templat für das folgende BEAMing eingesetzt werden können.



KingFisher™, Thermo Thermo Fisher Scientific Inc.

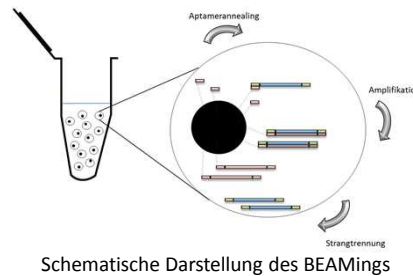


Magnetischer Kamm

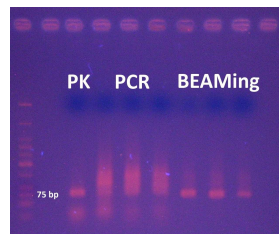
BEAMing

Das BEAMing (**B**eads, **E**mulsion, **A**mplifikation, **M**agnetic) stellt eine optimale Amplifikationsmethode für die Vervielfältigung der selektierten Aptamere im Rahmen des SELEX-Prozesses dar. Durch die Verwendung einer Wasser-in-Öl-Emulsion werden durch Kompartimentierung eine Vielzahl separater Reaktionsräume geschaffen, die trotz einer hohen Templatdiversität im Gegensatz zur konventionellen PCR nur wenige Nebenprodukte bilden und dadurch entsprechende Aufreinigungsschritte wie bspw. Gelextraktionen nicht durchgeführt werden müssen^[2].

Darüber hinaus wird der *Reverse-Primer* an magnetische Partikel gebunden, wodurch die gebildeten BEAMing-Produkte an den *Beads* immobilisiert vorliegen und isoliert werden können^[3]. Anschließend erfolgt die magnetische Separation der selektierten Aptamere von den immobilisierten Komplementärsträngen mittels Hitzedenaturierung. Die dadurch vervielfältigten Aptamere können für die folgenden SELEX-Runden (Fishing) verwendet werden.



Schematische Darstellung des BEAMings



Vergleich der Amplifikation mittels konventioneller PCR und BEAMing

Der iterative SELEX-Prozess als kombinierte Durchführung von Fishing und BEAMing bietet gegenüber dem konventionellen Ablauf vor allem einen zeitlichen Vorteil, da 12 parallele Aptamerselektionen halbautomatisch im Mitteldurchsatz binnen 10 Tagen möglich sind. Des Weiteren ist die SELEX-Effizienz durch die Anwendung des BEAMings aufgrund der geringeren Nebenproduktbildung während der Amplifikation deutlich verbessert, wodurch in kurzer Zeit und mit höherer Zuverlässigkeit Aptamere für unterschiedlichste Fragestellungen generiert werden können.

Literatur:

[1] McKeague, M., et al., Advances in aptamer based biosensors for food safety, Environmental Biosensors, Prof. Vernon Somerset (Ed.), 2011, [2] Schütze, T., et al., A streamlined protocol for emulsion polymerase chain reaction and subsequent purification. Anal Biochem, 410(1): p. 155-7, 2011, [3] Diehl, F., et al., BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. Nat Methods, 3(7): p. 551-9, 2006.

Diese Arbeit ist Teil des Projektes „Affinitätsanreicherung von Sporen von *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *A. acidiphilus* und *A. herbarius* aus wirtschaftlich relevanten Säften und Saftkonzentraten für die Qualitätskontrolle im Routinebetrieb“ in Kooperation mit der Universität München, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim, sowie dem Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie (VdF) e.V., Bonn. Das Forschungsvorhaben (AiF 17245 N) wird im „Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.