

Selektion und Charakterisierung von Aptameren mit einer Affinität gegenüber *Alicyclobacillus*-Sporen für eine Bioaffinitätsanreicherung

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

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

Einführung und Zielsetzung

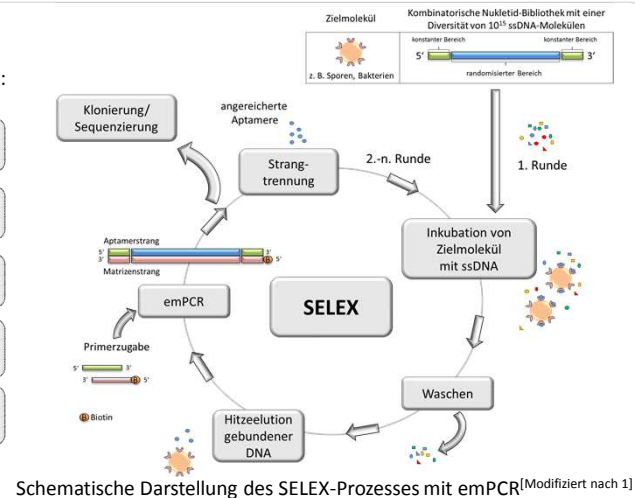
Derzeit stehen der Fruchtsaftindustrie nur bedingt analytische Methoden zur Verfügung, die während des Routinebetriebes einen zeitnahen Nachweis von *Alicyclobacillus* ermöglichen, da stets ein zeitaufwendiger Anreicherungsschritt durch Kultivierung notwendig ist. Die nach Auskeimung der Sporen vorliegenden Mikroorganismen produzieren durch ihren Stoffwechsel ein rauchig bzw. nach Desinfektionsmitteln riechendes off-Flavour (hauptsächlich verursacht durch Guajacol). Dieses Fehl aroma führt bei entsprechenden Kontaminationen zu erheblichen Produktausfällen.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Aptamer-basierten Bioaffinitätsanreicherungssystems für *Alicyclobacillus*-Sporen über modifizierte Nanopartikel für die Lebensmittelmatrix Orangensaft, wobei der anschließende Sporennachweis mittels molekularbiologischer Methoden erfolgen soll. Die verwendeten Sporen-spezifischen Aptamere dienen dabei als Rezeptor- sowie evtl. als Detektionsmoleküle und ersetzen die zeitaufwendige mikrobiologische Anreicherung der *Alicyclobacillus*-Sporen. Bei möglichen Kontaminationen von Orangensäften ist somit innerhalb kurzer Zeit eine sichere Analytik mit dieser molekularbiologischen Methode möglich.

• SELEX-Prozess

»Die Aptamere wurden über ein iteratives, evolutionäres *in vitro* Selektionsverfahren (SELEX-Prozess: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) generiert:

Inkubation	• Inkubation der Sporen mit einer Aptamerbibliothek (10^{15} unterschiedliche Aptamere)
Waschen	• Waschen des Inkubationsansatzes zur Entfernung nicht-bindender Aptamere
Elution	• Hitzeelution der bindenden Aptamere
emPCR	• Vervielfältigung der bindenden Aptamere mittels emPCR (Emulsion-PCR)
Strangtrennung	• Strangtrennung zur Separation der vervielfältigten Aptamere für weitere SELEX-Runden
Nach 17 Selektionsrunden wurde eine Klonierung, Sequenzierung, Sequenzanalyse sowie eine umfangreiche Charakterisierung durchgeführt	

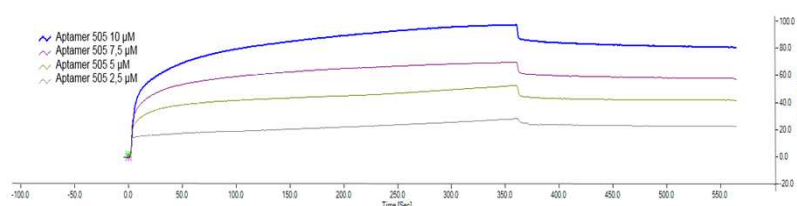


• Charakterisierung der selektierten Aptamere

»Es folgte eine umfangreiche Charakterisierung der selektierten Aptamere mittels SPR (Surface Plasmon Resonance), FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting), CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie sowie Fluoreszenzmikroskopie.

• SPR

»Mittels SPR wurden die Dissoziationskonstanten (K_D -Wert) der Aptamere ermittelt.



Beispielhaftes Sensorgramm (Overlay) der Messung eines Aptamers.

• Fluoreszenzmikroskopie

»Die Visualisierung der Aptamer-Sporen-Interaktionen wurde durch Fluoreszenzmarkierung der Aptamere dargestellt.



Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Interaktionen von *Alicyclobacillus*-Sporen mit Fluoreszenz-markierten Aptameren (links = Fluoreszenzbild, Mitte = visuelles Bild, rechts = Überlagerung der Bilder).



Es wurden für die 12 selektierten Aptamere K_D -Werte im ein- bzw. zweistelligen nanomolaren Bereich bestimmt.

Ausblick: Die selektierten Aptamere werden weiterhin hinsichtlich der Selektivität gegenüber unterschiedlichen, für Orangensaft relevanten, Sporen überprüft.

Im Anschluss folgt die Kopplung an magnetische Partikel sowie die Entwicklung und Validierung unterschiedlicher Nachweisverfahren.

Literatur:

[1] Helmholz, FluMag-SELEX, www.ufz.de/index.php?de=18568, 02.2014, [2] Sefah, K., et al., Development of DNA aptamers using Cell-SELEX, Nat. Protoc., 5(6): p. 1169-85, 2010, [3] Barlen, B., et al., Detection of salmonella by surface plasmon resonance, Sensors, 7(8): p. 1427-1446, 2007.

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.