

Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

Nr (1), Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur
Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **16816BR**

***Multiplex Diagnosechip - On-Chip-Nachweis von phytopathogenen Viren und
Bakterien mittels Oberflächenplasmonenresonanz***

(Bewilligungszeitraum: 01.12.2010 - 31.12.2013)

der AiF-Forschungsvereinigung

Forschungsgesellschaft für Messtechnik, Sensorik und Medizintechnik e.V. Dresden
(fms)

Quedlinburg, den 31.03.2014

Ort, Datum

Dr. Thomas Kühne

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)
an der/den Forschungsstelle(n)

1 Darstellung der Ergebnisse

1.1 Projektteil JKI

1.1.1 Entwicklung eines immunologischen Schnellnachweises für Kartoffelviren

1.1.1.1 Auswahl und Reinigung der nachzuweisenden Pflanzenviren

Die nachzuweisenden Viren PVA, PVM, PVS, PVX und PVY (*Potato virus A, M, S, X, Y*) wurden auf geeigneten Wirtspflanzen im Gewächshaus angezogen und gereinigt (Tabelle 1). Aufgrund der erschwerten Vermehrung des nur blattlausübertragbaren, phloemständigen *Potato leafroll virus* (PLRV) wurde zur Erarbeitung der SPR-Bedingungen auf das *Carnation ringspot virus* (CRSV) ausgewichen. Als ebenfalls isometrisches Virus weist es ähnliche Partikeleigenschaften wie PLRV auf.

Tabelle 1: Im Rahmen des Vorhabens verwendete Virusisolate. Die Konzentration aller gereinigten Virusisolate wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen und mit einem virusspezifischen Faktor die Konzentration berechnet.

Virus	Isolat	Wirtspflanze	gereinigt am	Puffer	Konzentration [mg/ml]
PVA	PVA „Juliniere“	Tabak „Samsun“	29.04.2011	0,1M Kaliumcitrat-Puffer pH7,0 mit Zusätzen EDTA	1,41
PVM	PVM "Fortuna"	Tomate "Newski"	06.05.2011	0,01M Phosphatpuffer pH 7.5	1,20
PVS	PVS „DSMZ PV-0740"	Tomate "Newski"	17.04.2013	0,1M Kaliumcitrat-Puffer pH7,0 mit Zusätzen EDTA	0,33
PVX	PVX-"N"	<i>N. glutinosa</i>	24.02.2011	0,05 m Boratpuffer pH 8,2	5,10
PVY	PVY-C 268	<i>N. glutinosa</i>	23.03.2011	0,1M Kaliumcitrat-Puffer pH7,0 mit Zusätzen EDTA	0,64
PVY	PVY-N CH 605	<i>N. glutinosa</i>	30.03.2011	0,1M Kaliumcitrat-Puffer pH7,0 mit Zusätzen EDTA	2,40
PVY	PVY-NTN	<i>N. glutinosa</i>	17.03.2011	0,1M Kaliumcitrat-Puffer pH7,0 mit Zusätzen EDTA	2,09
PVY	PVY-O Tomate	<i>N. glutinosa</i>	05.04.2011	0,1M Kaliumcitrat-Puffer pH7,0 mit Zusätzen EDTA	2,20
PVY	PVY-O Wilga	<i>N. glutinosa</i>	10.03.2011	0,1M Kaliumcitrat-Puffer pH7,0 mit Zusätzen EDTA	2,81
CRSV		Buschbohne "Pinto"	13.04.2012	0,01 M Kalium-Natriumphosphat-Puffer pH 5,0 mit 0,001 M MgSO ₄	1,45

1.1.1.2 Auswahl der Antikörper

Die Eignung aller im JKI verfügbaren polyklonalen Antiseren gegen die o. g. Viren im Standard-DAS (Double-Antibody-Sandwich)-ELISA nach Clark und Adams (1977) wurde wie bei Richter et al. (1994) beschrieben durchgeführt. Als Antigene kamen in Extraktionspuffer verdünnte virushaltige lyophilisierte Pflanzensäfte als Positivkontrolle bzw. lyophilisiertes Material aus Gesundkontrollen (GK, Tabelle 2) zum Einsatz. Hierdurch wird gesichert, dass vergleichbare Antigenkonzentrationen in den jeweiligen Testkombinationen eingesetzt werden. Zusätzlich wurden für PVY und PLRV auch infizierte Pflanzen als Realproben einbezogen, da einige der geprüften lyophilisierten Kontrollen nur schwache bzw. im Falle des PLRV keine Reaktion mehr ergaben.

Die Ergebnisse der am besten geeigneten Testkombinationen (homologes IgG und Phosphatase (AP)-Konjugat) sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenstellung der im DAS-ELISA am besten geeigneten IgG und homologen AP-Konjugate zum Nachweis von 6 Kartoffelviren unter Verwendung lyophilisierter Presssäfte. Die Testantigene wurden in Extraktionspuffer in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4} geprüft.

Testsystem	Verdünnungsstufe Positivkontrollen			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
PVA-3	2,80	0,85	0,15	0,04
GK*	0,03	0,02	0,01	0,02
PVM-1	0,80	0,16	0,04	0,03
GK	0,02	0,01	0,01	0,01
PVS-2	2,94	1,31	0,82	0,25
GK	0,02	0,01	0,01	0,02
PVX-1	2,95	1,78	0,18	0,05
GK	0,03	0,02	0,01	0,00
PVY-2	1,18	0,6	0,26	0,06
GK	0,02	0,01	0,00	0,00
PLRV-1	0,07	0,02	0,01	0,01
GK	0,01	0,00	0,00	0,00

GK* = Gesundkontrolle

In den PLRV-Positivkontrollen konnte kaum noch Antigen festgestellt werden, während das PVS in den lyophilisierten Kontrollen noch bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} detektierbar war (Tabelle 2). Mit den übrigen ausgesuchten Testsystemen konnte ein Virusnachweis im DAS-ELISA bis zu einer 1000fachen Verdünnung der Positivkontrollen festgestellt werden, wobei z. B. vier Testkombinationen zur Detektion des PVY keine wesentlichen Unterschiede in der Nachweisgrenze ergaben (Abb. 1).

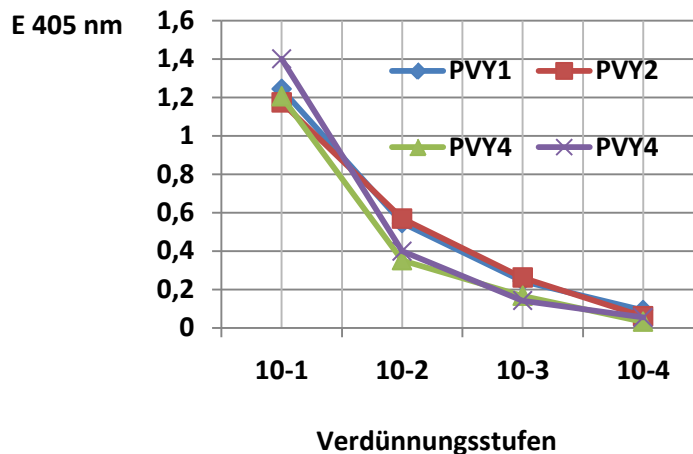


Abb. 1: DAS-ELISA mit 4 verschiedenen homologen IgG bzw. AP-Konjugat-Kombinationen (PVY1 bis PVY4) zum Nachweis des PVY unter Verwendung lyophilisierter Positivkontrollen (Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4}). Dargestellt sind die Mittelwerte der Extinktionen gemessen bei 405 nm ($E_{405 \text{ nm}}$) aus zwei separaten Versuchen.

Um die Eignung von Testsystemen für den Nachweis von Realproben zu prüfen, war die Untersuchung von Proben infizierter Kartoffelblätter unerlässlich. Als Beispiel ist in Abb. 2 die Detektion von PVY und PLRV in Frischmaterial infizierter Blätter mit dem entsprechend optimierten DAS-ELISA-System dargestellt. Ein Nachweis des Phloem-limitierten PLRV war hier nur bis zu einer Saftverdünnung von 10^{-1} möglich, während PVY bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} noch erfasst werden konnte.

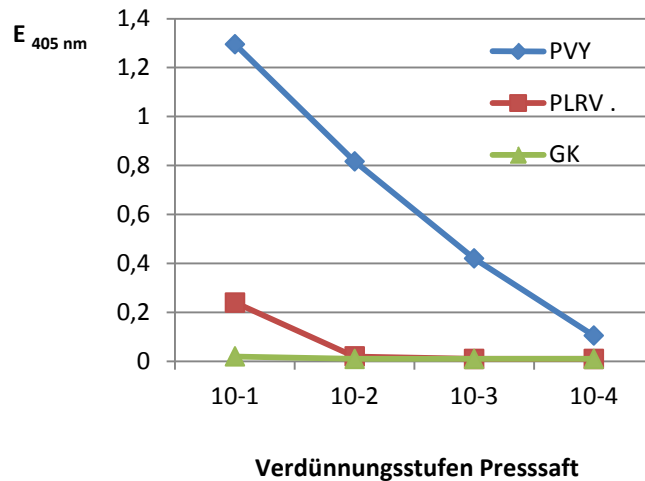


Abb. 2: DAS-ELISA mit optimierten IgG und AP-Konjugat-Kombinationen zum Nachweis des PVY bzw. PLRV in Realproben (Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4}). Dargestellt sind die Mittelwerte der Extinktionen gemessen bei 405 nm ($E_{405 \text{ nm}}$) nach 1 h Substratinkubation aus zwei separaten Versuchen. GK = Saft aus gesunden Pflanzen.

Die monoklonalen Antikörper wurden auf ihre Eignung als sekundäre Antikörper im TAS (Triple-Antibody-Sandwich)-ELISA (Hampton et al. 1990) in Kombination mit dem jeweils besten polyklonalen Antikörper als Coating-Antikörper getestet und verglichen. Auf diese Weise wurden die für die Testsysteme am besten geeigneten polyklonalen und monoklonalen Antikörper ermittelt (Tabelle 3 und 4).

Tabelle 3: Monoklonale Antikörper mit besten Signalen im TAS-ELISA.

Lfd. Nr.*	Klonbezeichnung	Antigen	Datum
1309	Asc. A3H10H4	PVA	03.05.1990
1009	IgG M4C1	PVM	11.04.1988
1008	IgG S4A4	PVS	11.04.1988
1184	IgG 21XD2	PVX	10.02.1989
1643	IgG 3E11	PVY/N	11.02.2004
1704	IgG BE3	PLRV	11.05.2005

* Lfd. Nummer im Serumbuch der JKI-Kollektion

Tabelle 4: Liste der im TAS-ELISA verwendeten polyklonalen Coating-Antikörper.

Lfd. Nr.	Antiserum-Nr.	Antigen	Tierart
PVA	207	PVA	Kaninchen
PVM	287	PVM	Kaninchen
PVS	Z-5	PVS	Ziege
PVX	251	PVX	Kaninchen
PVY	284	PVY /C	Kaninchen
PLRV	265	PLRV	Kaninchen
IgG 202	202	CRSV	Kaninchen
IgG 96	96	CRSV	Kaninchen

Mehrere CRSV-Antiseren standen zur Verfügung. Trotz vergleichsweise relativ geringer Empfindlichkeit der Antiseren im Standard-ELISA, wurden gute Ergebnisse in der SPR erreicht und die Etablierung eines Modellassays für ein isometrisches Pflanzenvirus aus diesen ermöglicht.

1.1.2 Optimierung der Versuchsbedingungen für den Virusnachweis mittels SPR

Für die Optimierung aller Prozessschritte des SPR-Systems kam das leicht zu reinigende PVX als Modellantigen zum Einsatz. Als Bezugssystem diente immer der DAS-ELISA, der mit einer Verdünnungsreihe eines gereinigten PVX-Präparates (1 mg/ml bis 1 pg/ml) eine Nachweisgrenze von 5 ng/ml erreichte (Abb. 3).

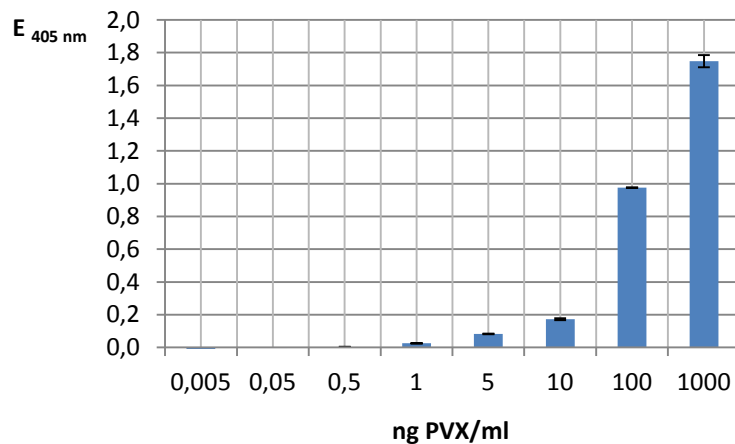


Abb. 3: Standard-DAS-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen von gereinigtem PVX. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=2).

Um die Möglichkeiten und Grenzen der SPR-Technologie auszuleuchten, wurden verschiedene Ansätze des immunologischen Nachweises vergleichend geprüft. Neben dem direkten Nachweis, bei dem die Bindung des Virus an die immobilisierten Antikörper an der Oberfläche allein die Signalerhöhung verursacht (Abb. 4A), wurde ein Sandwich-Assay etabliert, bei dem ein sekundärer Antikörper das Signal weiter verstärkt (Abb. 4B). Zusätzlich wurde die Möglichkeit eines kompetitiven Assays (Abb. 4C) geprüft.

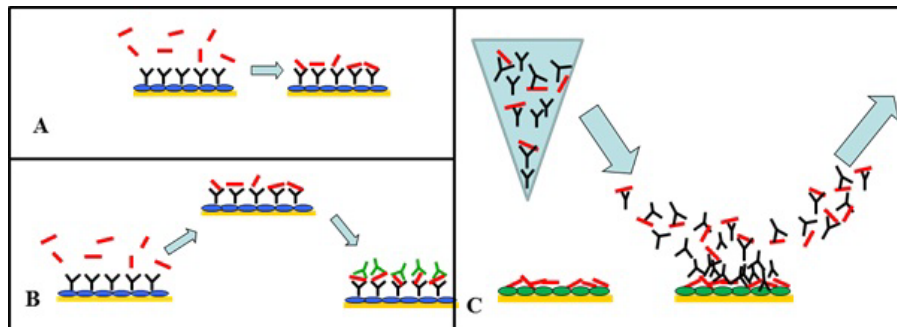


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsprinzips der getesteten Varianten: Im direkten Nachweis wird virushaltiger Pflanzensaft über die auf der Goldfläche mittels Protein A immobilisierten Antikörper gespült. Es kommt zur Bindung der Viruspartikeln an die Oberfläche, dadurch zu einer Zunahme der Schichtdicke und des Brechungsindex und so zu einer Signalerhöhung (A). Im Sandwich-Assay wird nach erfolgter Anbindung des Virus an den Coating-Antikörper ein weiterer spezifischer Antikörper gebunden, so dass die Schichtdicke, der Brechungsindex und damit das Signal weiter erhöht werden (B). Im kompetitiven Test wird auf der Goldoberfläche das Virus gebunden, spezifische Antikörper werden separat in einem Reaktionsgefäß mit dem zu untersuchenden virushaltigen Saft inkubiert; wenn anschließend das Gemisch eingespritzt wird, können nur die Antikörper an die immobilisierten Viruspartikel binden, welche vorher nicht an die Viruspartikel im Pflanzensaft gebunden haben. Je höher also die Konzentration an Viruspartikeln im zu untersuchenden Pflanzensaft ist, desto weniger Antikörper verbleiben im Ansatz, welche an die Partikel auf dem SPR-Chip binden können, und desto niedriger ist das Signal (C).

1.1.2.1 Direkter Nachweis

Zur Immobilisierung von Antikörpern auf einer Goldfläche bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Vom Projektpartner IWS wurde bereits die Immobilisierung mittels Protein A erfolgreich angewandt. Ausgehend von den guten Ergebnissen mit dieser Methode wurden neben Protein A auch Protein G und Protein L als mögliche Crosslinker vergleichend getestet. Alternative Immobilisierungen des Fängerantikörpers mittels selbstorganisierter monomolekularer Schichten (SAM)) sowie eine Immobilisierung mittels DTSSP wurden ebenfalls erprobt.

Die Immobilisierung mittels Protein G hat sich als die empfindlichste Methode herausgestellt. Zwar wurde in Online-Immobilisierungsversuchen ermittelt, dass mit Protein G weniger Fängerantikörper gebunden werden als mit Protein A oder Protein L, allerdings war die Bindung der Viruspartikel (100 µl Lösung mit 10 µg/ml) an die immobilisierten Antikörper bei Protein G effektiver (Abb. 5), was zu einer besseren Signaldifferenz führte (Abb. 6).

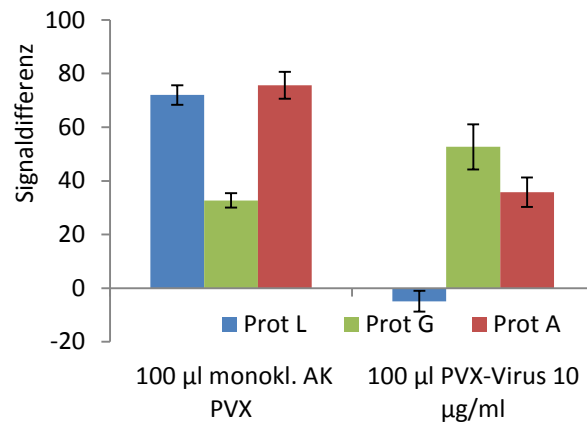


Abb. 5: Signalerhöhung nach der Injektion des monoklonalen PVX Antikörpers und nach der darauf folgenden Injektion von 10 µg/ml PVX. Obwohl offenbar weniger Antikörper an Protein G als an Protein A oder L gebunden werden, können diese anschließend eine größere Menge an Viruspartikeln binden.

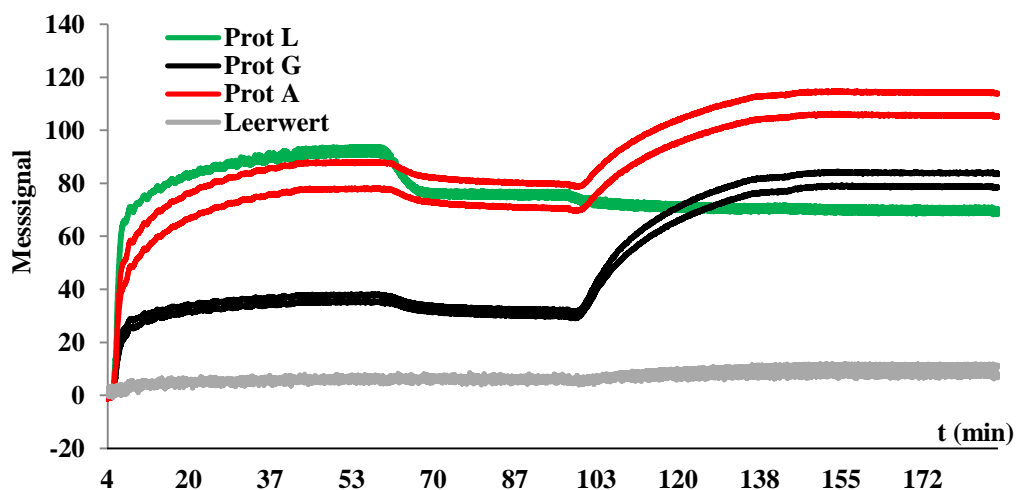


Abb. 6: Vergleich verschiedener Proteine als Crosslinker zwischen monoklonalem PVX-Antikörper und der Goldfläche. Es wurden 100 µl mAk in 4,5 min eingespritzt (1. Anstieg), anschließend gespült und 100 µl PVX-Suspension (10 µg/ml) im Verlauf von 50 min 25 mal über den Chip gespült (2. Anstieg).

Die Immobilisierung mittels SAM und mittels DTSSP führte dagegen zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Bei den Versuchen mit der SAM ist die Immobilisierung nicht gelungen und bei dem Einsatz von DTSSP kam es zu einer erheblich geringeren Bindung der Viruspartikel an die Antikörper, so dass beide Methoden verworfen wurden. Die Gründe hierfür liegen vermutlich in der ungerichteten Immobilisierung der Antikörper. Dadurch können die Antigen-Bindungsstellen teilweise verdeckt werden, was zu einer geringeren Bindung der Viruspartikel führt.

In weiteren Versuchen zur Variation der Messparameter mit dem Ziel, die Empfindlichkeit des ELISA zu erreichen, wurde das Volumen der eingespritzten Probe von 100 µl auf 500 µl erhöht und die Fließgeschwindigkeit von 0,9 µl/s auf 0,4 µl/s verringert. Das hatte bei einer Messzeit von 1 h die Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit von 10 µg Virus/ml auf 1 µg/ml zur Folge. Ein Nachweis von 200 ng Virus/ml in gereinigter Viruslösung im direkten Nachweis war jedoch statistisch nicht sicher (Abb. 7).

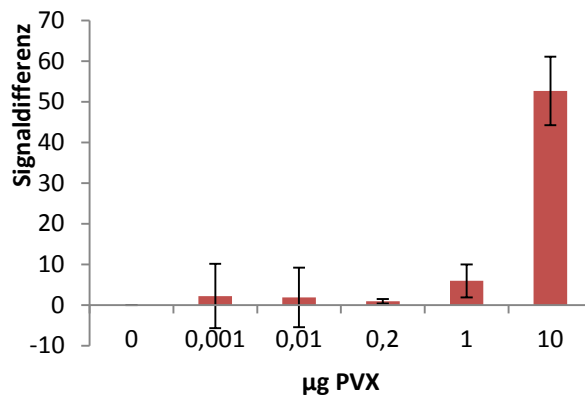


Abb. 7: Messung verschiedener PVX-Konzentrationen mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,9 µl/s und einem Probenvolumen von 100 µl. Ein sicherer und reproduzierbarer Nachweis konnte erst ab einer Viruskonzentration von 1 µg/ml erreicht werden.

Berechnet man für diese Testbedingungen die Pixeldifferenz des Messsignals je immobilisierte Fläche, war sogar der Nachweis von 200 ng PVX/ml abgesichert (Abb. 8).

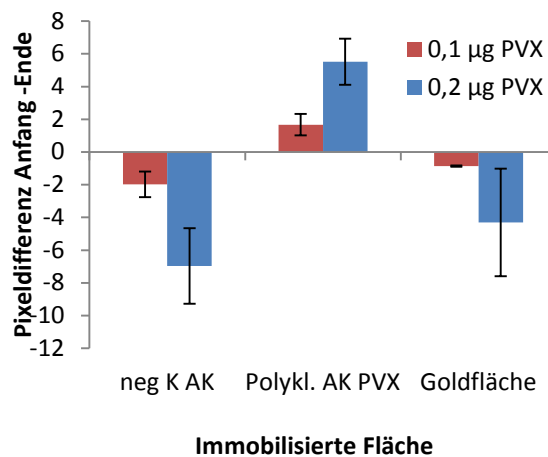


Abb. 8: Steigerung der Empfindlichkeit durch Reduzierung der Durchflussgeschwindigkeit auf 0,4 µl/s und Erhöhung des Probenvolumens von 100 µl auf 500 µl. Das Messsignal für ein PVX-Präparat mit 0,2 µg/ml wurde dadurch von 1 Pixel auf 5,5 Pixel erhöht und so die Empfindlichkeit auf 200 ng PVX/ml gesteigert; neg K AK-Immobilisierung mit heterologem Antikörper (negative Kontrolle 1); Goldfläche ohne Funktionalisierung (negative Kontrolle 2).

Eine Erhöhung der Messtemperatur von 37 °C auf 50 °C brachte dagegen keine Verbesserung.

1.1.2.2 Sandwich-Assay

Da beim Direktnachweis des PVX mittels SPR die Empfindlichkeit des ELISA nicht erreicht werden konnte, wurde eine Sandwich-Variante der SPR entwickelt. Dazu wurde nach Anbindung des Virus in der Probe an den immobilisierten Fängerantikörper ein sekundärer Antikörper eingespritzt. Dieser koppelt dann seinerseits wieder an die gebundenen Viruspartikel und sorgt so für eine weitere Zunahme der Schichtdicke auf dem SPR-Chip und somit für ein stärkeres Messsignal.

Zunächst wurde versucht, denselben polyklonalen PVX-Antikörper sowohl als Fängerantikörper als auch als Verstärkerantikörper zu nutzen. Durch Anlagerung des sekundären Antikörpers auch an freie Bindungsstellen (wahrscheinlich an Protein A) kam es allerdings zu einem hohen Hintergrundrauschen, wodurch die Testempfindlichkeit erheblich beeinträchtigt wurde. Die zusätzliche, d. h. nicht virusorientierte Anlagerung des sekundären Antikörpers an den SPR-Chip konnte auch durch den Einsatz unterschiedlicher Blockierungsagenzien (heterologes Rohserum, Rinderserumalbumin, Polyvinylpyrrolidon, Trockenmilch) nicht ausreichend verhindert werden. Da das Protein A an den Fc-Teil des Antikörpers bindet, welcher keine spezifischen Bindungsstellen für das Antigen enthält, wurden die PVX-Antikörper mittels Papain in Fab- und Fc-Fragmente enzymatisch gespalten. Die Fab-Fragmente, welche die virusspezifischen Erkennungssequenzen enthalten wurden präparativ abgetrennt und als modifizierter und hochspezifischer sekundärer Antikörper eingespritzt. Überraschenderweise kam es dabei in allen Versuchen zu keiner Steigerung, sondern zum starken Absinken des Gesamtsignals. Einzige Erklärung hierfür ist eine Restaktivität von Papain in der Fab-Fraktion, die auch die Fängerantikörper auf dem SPR-Chip spaltet und somit zu einem Ablösen der zuvor gebundenen Viruspartikeln führt. Da ausschließlich immobilisiertes Papain (Pierce Fab Preparation Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA) zur Spaltung des sekundären Antikörpers eingesetzt worden war, konnte eine Papain-Aktivität in der Fab-Fraktion von vornherein nicht erwartet werden. Die Verwendung von Fab-Antikörperfragmenten als sekundäre Antikörper wurde daher verworfen.

Als alternativer Ansatz zur Lösung des Problems wurden monoklonale Antikörper als Fänger verwendet und polyklonale als sekundärer Antikörper eingesetzt. Protein L hat die Eigenschaft, monoklonale Maus-Antikörper zu binden; polyklonale Kaninchen-Antikörper hingegen werden nicht/kaum gebunden (<http://www.piercenet.com/files/TR0034-Ab-binding-proteins.pdf>). Auch diese Strategie war nicht erfolgreich, weil der einzige verfügbare monoklonale Antikörper durch die Bindung an das Protein L offenbar verändert wurde und seine Bindungsfähigkeit an PVX Partikel verlor. Als weitere methodische Variante wurde ein Verstärkungssystem erprobt, bei dem der polyklonale sekundäre Antikörper an Nanogoldpartikel mit einem Durchmesser von 10 nm gekoppelt wurde.

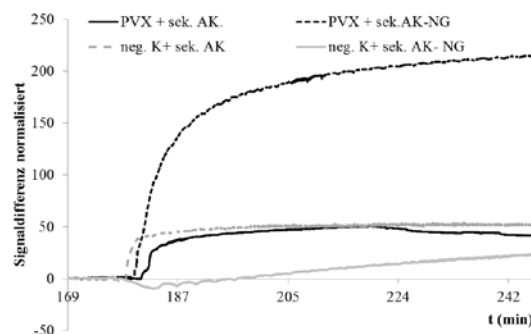


Abb. 9: Vergleich der Verstärkungswirkung von sekundärem Antikörper mit (schwarz-gestrichelte Linie) und ohne (schwarze Linie) Nanogold-Kopplung nach der Bindung von 1 µg/ml PVX an den monoklonalen Fängerantikörper, der mit Protein G an die Goldfläche gekoppelt ist. Jede Kurve in dieser Abbildung repräsentiert eine einzelne, unabhängige Messung. Der Chip wurde nach jeder Messung durch Spülen mit 0,1 M KOH regeneriert, anschließend der Fängerantikörper neu immobilisiert, 1 µg/ml PVX eingespritzt und anschließend das Antikörper-Nanogold Konjugat injiziert. In der negativen Kontrolle wurde direkt nach dem Fängerantikörper das Nanogold-Konjugat eingespritzt.

Es gelang sowohl eine Bindung direkt an die Goldpartikel mittels elektrostatischer Bindungen, als auch eine Kopplung mittels Protein A als Crosslinker. Versuche zur Verstärkung des SPR-Signals mit Nanogold wurden nur mit den Antikörpern durchgeführt, welche mittels elektrostatischer Wechselwirkungen an die Nanogold-Partikel gebunden waren. Hierbei gelang eine Erhöhung des Signals um ein vielfaches. Allerdings wurde weiterhin eine starke unspezifische Anlagerung des Verstärkerantikörpers auch an Flächen mit dem immobilisierten heterologen Kontrollantikörper beobachtet (Abb. 9 und 10).

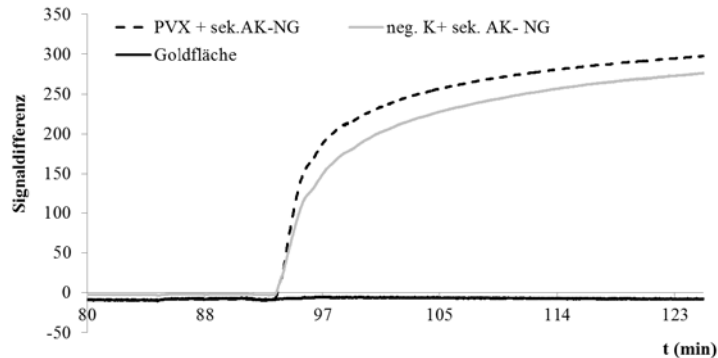


Abb. 10: Erfassung der unspezifischen Anheftung des Nanogold-Konjugates. Nach Vorbehandlung eines Teils des Chips mit Protein G (500 µg/ml) wurde auf einigen Messflächen der PVX-spezifische monoklonale Antikörper (PVX) immobilisiert, auf anderen Messflächen ein heterologer Kontrollantikörper (neg. K). Danach wurde über den gesamten Chip zunächst 200 ng/ml PVX gepumpt und anschließend das sekundäre Antikörper-Nanogold-Konjugat (sek. AK-NG). Bei der zweiten Kontrollvariante (Goldfläche) wurden Viruslösung und Nanogold-Konjugat über nicht funktionalisierte Messflächen (ohne Protein G und Antikörper) gepumpt. Die Grafik zeigt die Ergebnisse einer multiplexen Messung.

Dies wirkte sich auch in der anschließenden Vermessung einer Verdünnungsreihe aus, bei der Saft einer infizierten Tabakpflanze in der SPR mittels direktem Test und Sandwich-Test auf ihren Gehalt an PVX vermessen wurde. Der direkte Nachweis war unempfindlicher; bereits ab einer Verdünnungsstufe von 1:10000 war wiederholbar kein Signal mehr messbar (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** 11A). Die Kontrollmessung mit Presssaft aus nicht infizierten Tabakpflanzen war negativ.

Wenn nach dem Pflanzensaft der sekundäre, an Nanogold gekoppelte Antikörper eingespritzt wurde, kam es zu einer Erhöhung des Messsignals (Abb. 11B). Allerdings war die Höhe des Signals unabhängig von der Verdünnungsstufe des Pflanzensafte. Gleichzeitig wurde in diesem Testformat auch immer ein hohes Signal mit gesunden Kontrollpflanzen erreicht.

Der Einsatz von Nanogold-Konjugaten zeigte sich als prinzipiell geeignet, das Signal erheblich zu verstärken, allerdings wurde auch hier das ungelöste Problem der unspezifischen Anheftung an die Kontrollflächen des Chips offensichtlich.

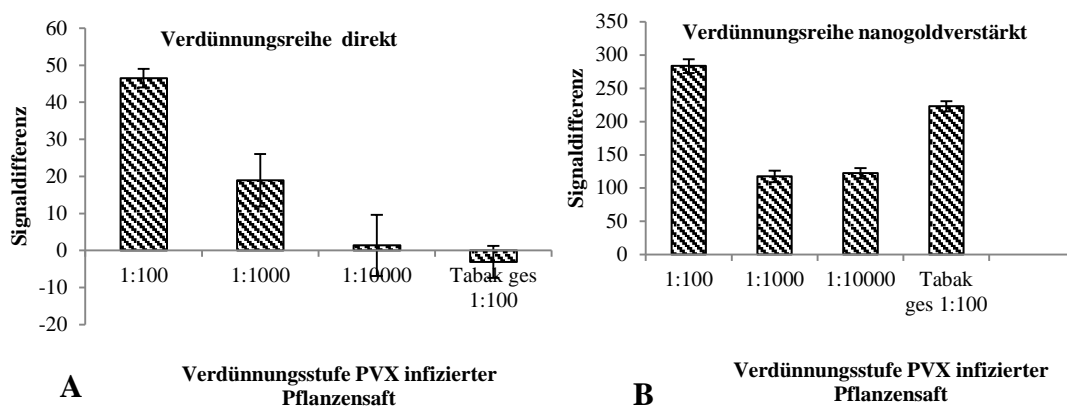


Abb. 11: Ergebnisse der Vermessung einer Verdünnungsreihe mit Presssaft aus einer PVX infizierten Tabakpflanze. Auf dem Chip wurde mittels Protein G der monoklonale PVX-spezifische Antikörper immobilisiert. Im direkten Nachweis wurden Messsignale

erreicht, die in Abbildung 11A dargestellt sind. Anschließend wurde ein Konjugat aus polyklonalem PVX spezifischem Antikörper und Nanogold eingespritzt. Die daraufhin erzielten Signalhöhen sind in Abbildung 11B dargestellt.

1.1.2.3 Kompetitiver Nachweis

Als Alternative zu den bisher beschriebenen Varianten des Sandwich-Assays wurde im Rahmen des Vorhabens auch ein kompetitiver Versuchsansatz erprobt. Nach Literaturangaben (Shankaran et al., 2006; Shankaran & Miura, 2007) lassen sich in der SPR hohe Nachweisempfindlichkeiten in kompetitiven Assays erreichen. Daher wurden entsprechende Versuche mit PVX und dem homologen polyklonalen Antikörper durchgeführt. Hierbei wurden PVX-Viruspartikel als Positivkontrolle und PVY-Viruspartikel als Negativkontrolle mittels DTSSP an die Goldoberfläche immobilisiert. Danach wurde eine Antikörper-Lösung mit einer definierten Konzentration des homologen PVX-Antikörpers über die Fläche gespült. Die Antikörper binden und ein Signal wird messbar. Anschließend wurden mittels 0,1 M KOH die Antikörper wieder von den immobilisierten Viruspartikeln auf der Goldfläche gelöst und ein Gemisch aus PVX-Antikörpern und Viruslösung nach 1 h Inkubation bei 37 °C über den Chip gespült. Nur die freien Antikörper, die nicht bereits im Gemisch an das homologe Antigen gebunden haben, können nun wieder an die Viruspartikel auf dem Chip binden. Daher ist gegenüber dem ersten Schritt mit einem geringeren Signal zu rechnen. Die Differenz aus dem Signal der reinen Antikörperlösung und dem Virus-Antikörper-Gemisch ist das erzielte Nettosignal. Zunächst wurde die erforderliche Mindestmenge an Antikörpern ermittelt, welche an das immobilisierte Virus binden muss, um ein messbares Signal zu erhalten. Dazu wurden je 500 µl Antikörper-Lösung (Konzentrationsreihe) mit 0,4 µl/s eingespritzt. Ein messbares Signal wurde erst bei einer Antikörperkonzentration von 5 µg/ml erhalten (Abb. 12A). Bei einer solch hohen Antikörperkonzentration musste das Gemisch wenigstens 1 µg/ml PVX enthalten, um zu einer deutlichen Reduzierung des SPR-Signals im Vergleich zur Negativkontrolle zu führen (Abb. 12B). Damit blieb der kompetitive Assay in der Nachweisempfindlichkeit deutlich hinter dem direkten Nachweis zurück, so dass diese Strategie ebenfalls nicht weiter verfolgt wurde.

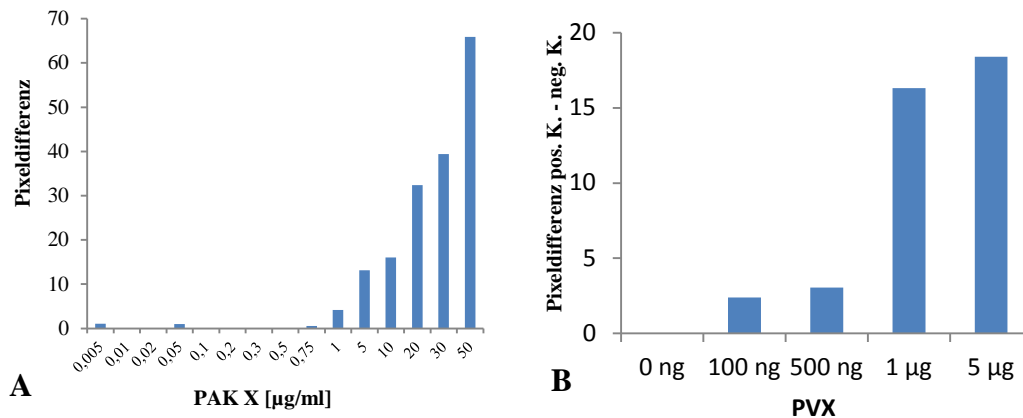


Abb. 12: Bestimmung Nachweisempfindlichkeit des kompetitiven Assays. (A) PVX (Stock-Lösung 1 mg/ml) wurde mittels DTSSP auf die Goldfläche des Chips immobilisiert und anschließend polyklonaler PVX-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen über den Chip gespült. Ein Signal oberhalb des Schwellenwertes von 5 Pixel wurde erst bei einer Konzentration von 5 µg/ml PVX-Antikörper erreicht. (B) Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von gereinigten PVX-Viruspartikeln im kompetitiven Assay vermessen. Dazu wurde auf den Chip mit immobilisierten PVX-Partikeln zunächst 5 µg/ml polyklonaler PVX Antikörper (PAK X) eingespritzt und das Signal gemessen. Nachfolgend wurde der Chip regeneriert (Spülen mit 0,1 M KOH zum Ablösen der PVX-Antikörper) und ein PAK X (5 µg/ml)-Viruslösung-Gemisch (nach 1 h Inkubation bei 37 °C) eingespritzt. Das hierbei erzielte Signal wurde ebenfalls bestimmt. Anschließend wurden der Chip erneut regeneriert und noch einmal 5 µg/ml PAK X eingespritzt. Die in der Abbildung dargestellten Pixeldifferenzen sind die Differenz aus dem Mittelwert der beiden Messwerte für den reinen Antikörper und dem Messwert, der mit dem Gemisch erzielt wurde.

1.1.3 Ermittlung der Nachweisempfindlichkeit des Systems

Mit gereinigten Viren konnte im SPR-Assay im direkten Nachweis eine Empfindlichkeit von 200 ng/ml PVX bei einem Einspritzvolumen von 500 µl erreicht werden. Bei einem Messvolumen von

100 µl lag die Nachweisgrenze nicht unter 1 µg/ml. Das ist zu unempfindlich im Vergleich zu den ELISA-Varianten, die eine Empfindlichkeit bis ca. 5 ng/ml bieten.

Aus der Literatur ist bekannt, dass deutlich kleinere Analyte mithilfe der SPR oftmals besser nachzuweisen sind als die vergleichsweise großen Viruspartikel. Es wurden daher Versuche zur Verbesserung der Testempfindlichkeit durch die Zerkleinerung der Viruspartikel mittels enzymatischen, physikalischen und chemischen Aufschluss‘ durchgeführt. Als effektivste Methode erwies sich die Zerkleinerung mittels Ultraschall-Homogenisator (Abb. 13). Nach unterschiedlicher Behandlungszeit wurden die PVX-Lösungen mit einheitlicher Ausgangskonzentration (100 µg/ml) mit der SPR-Direktvariante vermessen.

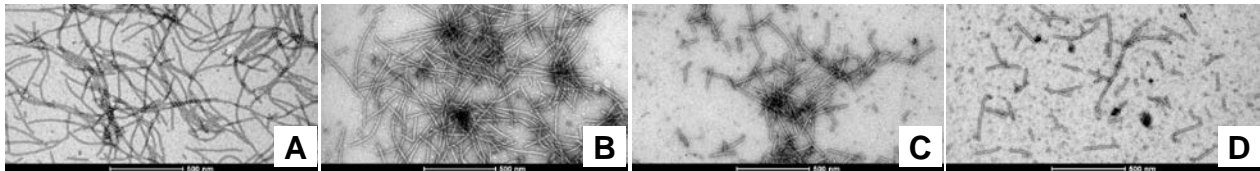


Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer PVX-Lösung (100 µg/ml), (A) unbehandelt und nach (B) 5 s, (C) 15 s, (D) 25 s Behandlung im Ultraschall-Homogenisator.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Signalstärke beobachtet werden (Abb. 14).

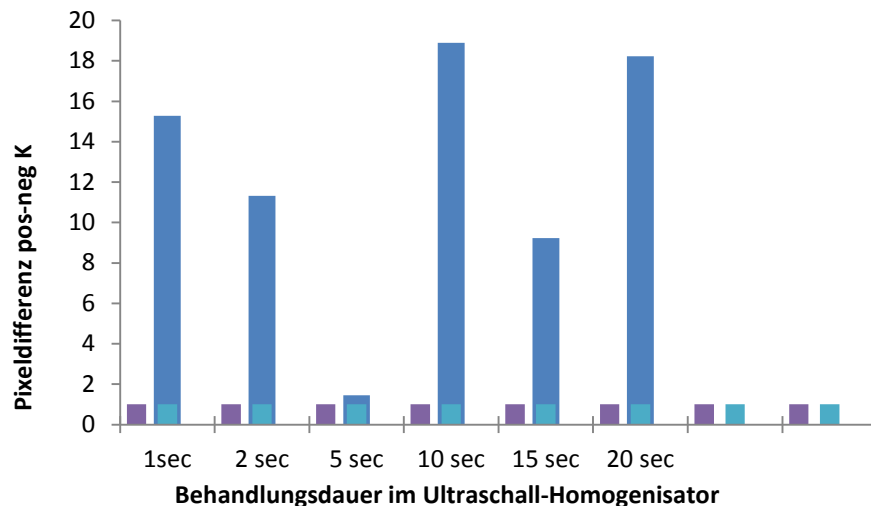


Abb. 14: Vermessen einer Lösung mit 100 µg/ml PVX nach Zerkleinerung der Viruspartikel mittels Ultraschall-Homogenisator. Die Einspritzgeschwindigkeit betrug 0,9 µl/s, die Lösung wurde 50x über den Chip gespült.

Um dennoch der Frage nachgehen zu können, ob durch hydrodynamische Kräfte in der Messzelle die Bindungseffizienz von Viruspartikeln an Antikörper infolge ihrer unterschiedlichen Größe und Gestalt wesentlich beeinflusst wird, wurde das isometrische CRSV als Modellobjekt in die Untersuchungen einbezogen. Dies erfolgte anstelle des experimentell ungleich schwieriger zu handhabenden Kartoffelvirus PLRV. Wie dieses hat das CRSV einen Partikeldurchmesser von ca. 30 nm, während ein gestrecktes Virus wie PVX etwa 700 nm lang ist, bei einer Breite von 12 nm. Bei einer Viruskonzentration von 1 µg/ml wurde für das CRSV ein höheres SPR-Signal erzielt als für das PVX. Allerdings fiel die Signalstärke für das CRSV bei weiterer Verdünnung stets rapide ab, so dass die Grenze im Direktnachweis bereits bei einer Konzentration von 500 ng/µl erreicht wurde (Abb. 15). Das ist nicht wesentlich besser als im Fall von PVX.

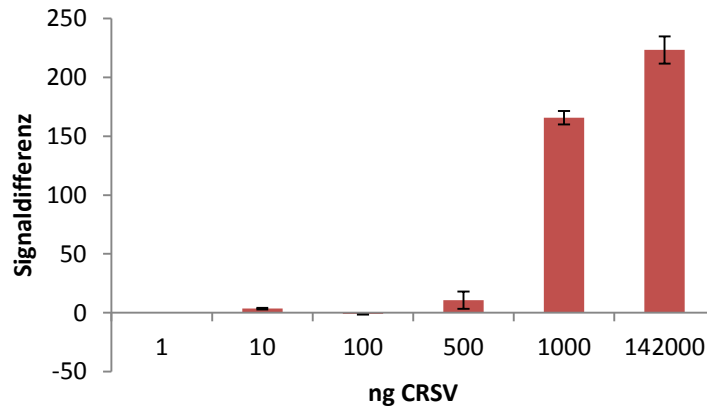


Abb. 15: Verdünnungsreihe CRSV, vermessen im direkten SPR-Nachweis mit polyklonalen Antikörpern. Es wurden 100 µl Probe eingespritzt und mit 0,9 µl/s 50 x über den Chip gespült.

Diese Ergebnisse wurden durch weitere Versuche im kompetitiven Assay bestätigt, bei denen ermittelt wurde, wieviel µg polyklonaler Antikörper notwendig ist, um ein messbares Signal zu erhalten. Ein Antikörper hat mit einer Größe von ca. 10 nm eine noch geringere Größe als ein CRSV Viruspartikel. Trotzdem waren mindestens 5 µg/ml Antikörper notwendig, um ein messbares Signal zu erhalten (Abb. 12A). Allerdings muss bei diesem Ergebnis berücksichtigt werden, dass es sich bei polyklonalen Antikörpern um ein Antikörper-Gemisch handelt, bei dem nur ein sehr kleiner Anteil spezifisch ist. Möglicherweise würden vergleichbare Versuche mit monoklonalen Antikörpern höhere Signale erzielen.

1.1.4 *Optimierung der Probenaufarbeitung*

Für die Vermessung der Verdünnungsreihe aus Presssaft infizierter Tabakpflanzen wurden die Proben für 5 min mit 10000xg zentrifugiert, der Überstand anschließend abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dies reichte im Falle von Tabak aus, um zu verhindern, dass Pflanzenfasern die filigrane Mikrofluidik verstopfen.

1.1.5 *Regenerierbarkeit der Chipoberfläche für wiederholte Messungen*

1.1.5.1 *Regeneration im kompetitiven Assay*

Am einfachsten gelang die Regeneration der Chipoberfläche im kompetitiven Assay. Hier soll bei der Regeneration der eingespritzte Antikörper von den immobilisierten Viruspartikeln gelöst werden. Idealerweise sollen die Viruspartikel an dem Crosslinker auf der Chipoberfläche verbleiben, so dass direkt anschließend eine neue Messung durchgeführt werden kann.

Durch Spülen mit 500 µl einer 0,1 M KOH-Lösung konnten die gebundenen Antikörper leicht von dem mittels DTSSP immobilisierten Virus gelöst werden, wobei das Virus an der Chipoberfläche verblieb. Dazu wurde nach jeder Messung zunächst mit 500 µl Laufpuffer gespült und anschließend auch hier 500 µl einer 0,1 M KOH-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 0,9 µl/s eingespritzt. Anschließend wurde noch einmal mit 1 ml Laufpuffer gespült, damit das Signal wieder in seine Ausgangsposition zurückkehrt. Dieses Vorgehen war für den kompetitiven Assay zwingend erforderlich, da die Differenz zwischen dem Messsignal, das mit einem Antikörper-Antigen-Gemisch erzielt wurde und dem Signal was durch Einspritzen einer reinen Antikörper-Lösung erzielt wurde, ermittelt wird. Durch mehrmalige Verwendung des gleichen Chips konnten genauere Ergebnisse im Vergleich zur parallelen Benutzung unterschiedlicher Chips erzielt werden. Ein Chip ließ sich mindestens zweimal problemlos regenerieren. Allerdings kam es zu einem leichten Absinken der Signalthöhe nach der Regeneration im Vergleich zu einem neu immobilisierten Chip

(Abb. 16). Um dieses Absinken zu kompensieren, wurde das Signal für den reinen Antikörper immer zweimal bestimmt: jeweils vor der Injektion der Probe und nach dem Vermessen der Probe. Zwischen den Messungen wurde der Chip regeneriert. Die Signaldifferenz wurde nun errechnet, indem der Wert, welcher mit der virushaltigen Probe erzielt worden war, von dem Mittelwert der beiden Negativmessung vor und nach der Probenmessung abgezogen wurde.

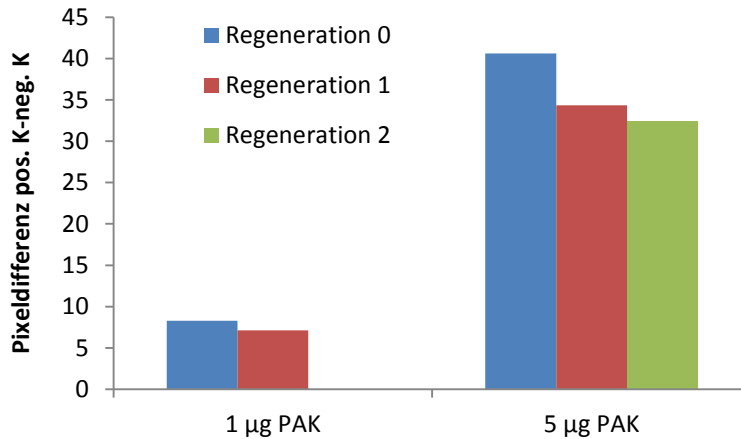


Abb. 16: Signalhöhe nach Einspritzen von 1 µg/ml bzw. 5 µg/ml polyklonalem PVX Antikörper auf einen neu immobilisierten Chip (Regeneration 0) und nach ein- bzw zweimaliger Regeneration durch Einspritzen von 500 µl einer 0,1 M KOH-Lösung.

1.1.5.2 Regeneration im direkten Nachweis und im Sandwich-Assay

Bei einer Regeneration des Chips nach direktem Nachweis bzw. in der Sandwich-Variante ist das Ziel, die an die immobilisierten Antikörper gebundenen Viruspartikel zu lösen. Idealerweise soll nur die Antikörper-Virus-Bindung gelöst werden, die Antikörper selbst sollen ohne Verlust ihrer Affinität gegenüber dem Antigen an der Chipoberfläche verbleiben. Anschließend kann direkt eine neue Messung durchgeführt werden (Abb. 17).

Eine solch ideale Regeneration ist im direkten Nachweis bzw. im Sandwich-Nachweis nicht gelungen. Bei einer Regeneration der Chipoberfläche kam es stets auch zu einer Ablösung der Fängerantikörper, während das Protein G oder A, welches dabei als Crosslinker fungierte, auf der Chipoberfläche verblieb. Auch bei diesen Nachweisvarianten erwies sich die Regeneration mittels 0,1 M KOH (500 µl mit Fließgeschwindigkeit 0,9 µl/s) und nachfolgendem Spülschritt als optimale Variante. Nach der Spülung musste erneut spezifischer Antikörper auf der mit Protein A oder G beschichteten Chipoberfläche immobilisiert werden. Dieses konnte nicht unter Verwendung der Immobilisierungsmatrize durchgeführt werden, da es nicht möglich war, den Chip wieder exakt so in die Matrize einzulegen, dass bei einer erneuten Funktionalisierung wieder die Flächen freiliegen, die bereits mit dem Crosslinker versehen sind. Daher wurden die Fängerantikörper im SPR-Gerät online eingespritzt. Der Nachteil dieses Vorgehens ist der Verlust der Möglichkeit, mehrere unterschiedliche Antikörper gleichzeitig auf einem Chip zu immobilisieren, da uns über die gesamte Projektlaufzeit nur eine Einkanal-Messflusszelle zur Verfügung stand.

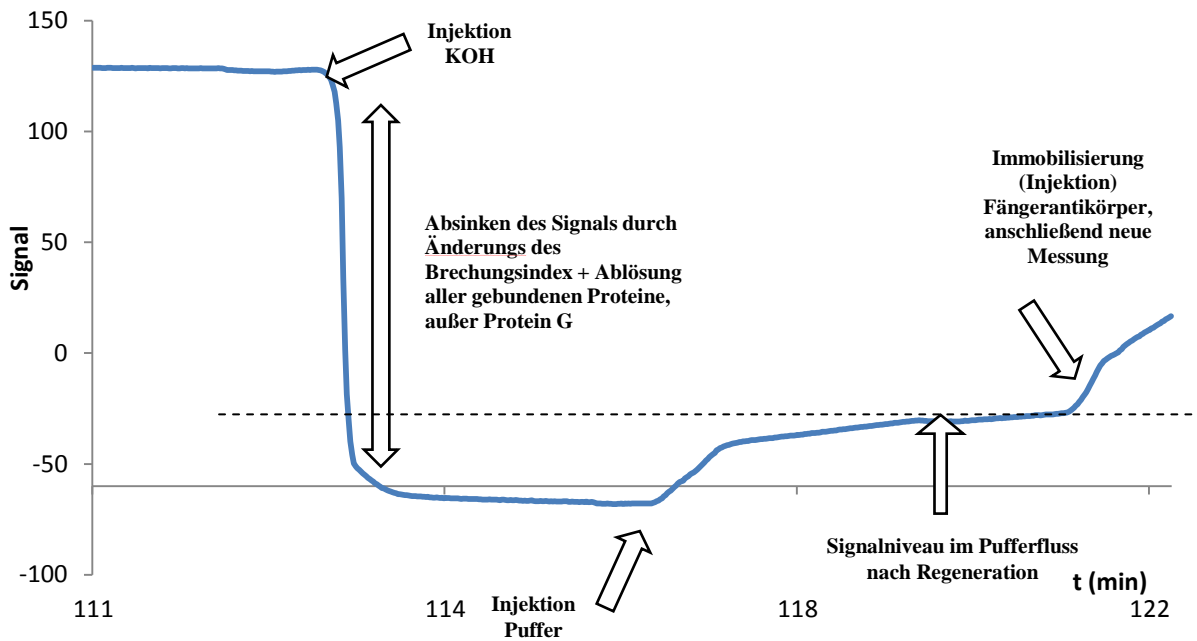


Abb. 17: Schematische Darstellung der Vorgänge in der SPR-Messung während der Regeneration. Nach dem Einspritzen der 0,1 M KOH-Lösung kommt es zu einem starken Absinken des Signals, das durch Ablösung der gebundenen Viruspartikel und der immobilisierten Antikörper verursacht wird. Nach der anschließenden Injektion von Laufpuffer wird das Ausgangssignal wieder erreicht.

Die Regeneration der Chips zur Wiederverwendbarkeit, erwies sich als eine gute Möglichkeit, Zeit und Kosten zu sparen, da die Alternative in der Funktionalisierung eines neuen Chips für jede einzelne Messung zunächst mit dem Crosslinker Protein A oder Protein G und anschließend mit dem Fängerantikörper besteht. Allerdings nimmt mit steigender Zahl der Regenerationen das erzielte Ausgangssignal im Pufferfluss immer weiter zu, bis sich die gebundenen Proteine nicht mehr lösen lassen und daher keine weitere Regeneration des Chips mehr möglich ist (Abb. 18). Die große Zeit- und Kostenersparnis könnte den Verlust an Messgenauigkeit und der Multiplexing-Möglichkeit kompensieren, wenn die Viruskonzentration im Untersuchungsmaterial deutlich oberhalb der Nachweisgrenze liegt und die Fragestellung nur eine ja/nein Antwort erfordert.

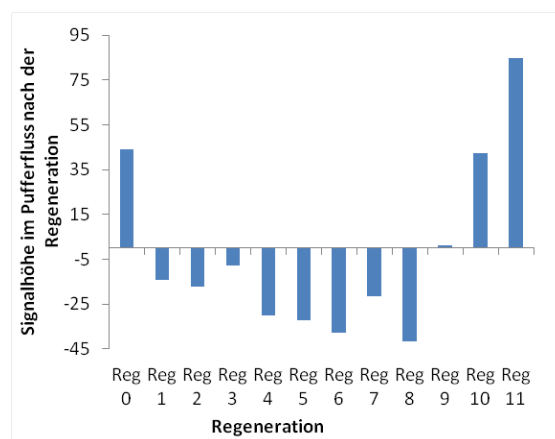


Abb. 18: Erreichtes Signalniveau im Pufferfluss nach der Regeneration. Reg0 bezeichnet die Nulllinie bei dem frisch mit Protein A oder G funktionalisierten Chip vor dem Einspritzen der Fängerantikörper. Nach der ersten Regeneration (Reg1) liegt diese Nulllinie immer unterhalb des ursprünglichen Wertes. Nach 8 Regenerationen gelingt die vollständige Ablösung der immobilisierten Proteine nicht mehr, und die Nulllinie ist erheblich höher. Zudem bindet auch nur noch wenig Fängerantikörper an das Protein A oder G.

1.1.6 Zusammenfassung Projektteil JKI

Ziel des Projektteils des JKI Quedlinburg war die Entwicklung eines multiplexen Testsystems zum schnellen und spezifischen Nachweis phytopathogener Viren. Hierzu sollte durch Übertragung des serologischen Nachweissystems auf die Surface Plasmon Resonance (SPR)-Plattform ein Lab-on-a-Chip-System generiert und somit ein labelfreier Pathogennachweis möglich werden. Gegenüber dem allgemein etablierten ELISA-Test sollte das SPR-System die Option bieten, mittels der 17-Kanal-Immobilisierungsmatrize mehrere unterschiedliche Antikörper gleichzeitig auf einem Chip zu immobilisieren und so mit nur einer Messung mehrere Viren simultan in einer Probe nachzuweisen. Als Untersuchungsobjekte wurden verschiedene Kartoffelviren gewählt, da im Rahmen der amtlichen Pflanzkartoffel-Zertifizierung jährlich ELISA-Tests in großer Zahl durchgeführt werden müssen. Durch den angestrebten multiplen Nachweis sollte insbesondere der Zeitbedarf im Vergleich zum Standardtest, der ca. 1,5 Tage beträgt, deutlich reduziert werden.

Der Nachweis unterschiedlicher Viren in Pflanzenpresssaft mit separaten Messungen konnte im Zuge dieses Projektes erbracht werden. Das angestrebte Ziel, einen multiplexen Test auf SPR-Basis zu entwickeln, konnte in der Projektlaufzeit noch nicht erreicht werden, da nach offline-Immobilisierung der Antikörper auf dem Chip (mittels Funktionalisierungsflusszelle und anschließender Überführung des Chips in die Einkanal-Messflusszelle) eine deutlich schlechtere Reproduzierbarkeit der Messwerte registriert wurde als nach online-Immobilisierung (direkt in Messflusszelle). Deshalb wurde auf den Einsatz der zu Projektbeginn bereits vorhandenen 17-Kanal-Funktionalisierungsflusszelle zur Gestaltung eines multiplexen Tests verzichtet. Die als Projektaufgabe (AP7) vorgesehene Erprobung der vom IWS neu entwickelten Dreikanal-Messzelle konnte aus Zeitgründen nur noch im IWS aber nicht mehr im IPK und JKI realisiert werden. Für den separaten Nachweis von insgesamt 6 Viren mit der SPR-Methode waren für das Einkanalssystem verschiedene Antikörper-Testformate zu erproben. Angestrebt wurden ein direkter Schnellnachweis, Sandwich-Varianten sowie ein Verstärkersystem mittels Nano-Goldpartikeln. Hierfür mussten mehrere Testparameter untersucht und bezüglich Testempfindlichkeit und Nachweissicherheit optimiert und mit dem etablierten Standard-ELISA verglichen werden.

Der direkte Schnellnachweis, bei dem die Bindung des Antigens durch an der Chipoberfläche immobilisierte Antikörper labelfrei über SPR gemessen wird, wurde für das Kartoffelvirus X (*Potato virus X*, PVX) und das Nelkenringflecken-Virus (*Carnation ringspot virus*, CRSV) demonstriert. Für die Immobilisierung der Antikörper erwies sich Protein G am geeignetsten. Außerdem bewirkten ein größeres Probenvolumen und eine verringerte Durchflussgeschwindigkeit eine verbesserte Testempfindlichkeit. Dagegen hatten Größe und Form der nachzuweisenden Partikel (PVX mit gestreckten, flexiblen Partikeln von ca. 700 nm Länge und ca. 12 nm Durchmesser sowie CRSV mit isometrischen Partikeln und einem Durchmesser von 30 nm) nur einen geringen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit des Systems. Der Vergleich mit dem Standard-ELISA zeigte jedoch eine insgesamt ca. 100fach geringere Nachweisempfindlichkeit des SPR-Systems, dessen Nachweisgrenze für beide Viren bei etwa 500 ng/ml lag.

Sandwich-Testformate, bei denen nach Bindung des Antigens durch immobilisierte Fänger-Antikörper ein zweiter Antikörper eingesetzt wird, zeigten generell ein erhöhtes SPR-Messsignal. Die Kopplung des sekundären Antikörpers an Nanogold-Partikel ergab eine weitere Verstärkung des Signals. Das Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, SNR) konnte jedoch bisher in allen untersuchten Sandwich-Varianten nicht wesentlich verbessert werden. Ursache hierfür könnte eine unzureichende Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Goldoberfläche des SPR-Chips sein, die eine unspezifische Anlagerungen des sekundären Antikörpers an das als Crosslinker verwendete Protein G oder Protein A bewirkt. Auch durch die Immobilisierung des Fänger-Antikörpers mittels einer selbstorganisierenden Monoschicht (Self Assembled Monolayer, SAM) oder mittels des Crosslinkers DTSSP (3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate]) an die Goldoberfläche und die damit beabsichtigte Vermeidung der unspezifischen Anlagerung des sekundären Antikörpers, ergaben bisher kein verbessertes SNR. Allerdings konnten während der

Projektlaufzeit nicht alle möglichen Testkombinationen analysiert werden, so dass die Etablierung eines Testformats mit einem Nanogold-Konjugat weiterhin als vielversprechend angesehen wird. Die Prüfung alternativer Immobilisierungsmethoden für den Fänger-Antikörper bzw. eine optimale Blockierung noch freier Bindungsstellen erscheint aussichtsreich, die unspezifische Anlagerung des sekundären Antikörpers zu umgehen und so die Testempfindlichkeit weiter zu steigern.

Die ursprüngliche Zielstellung, einen multiplexen Sandwich-Nachweis zur simultanen Detektionen mehrerer Pflanzenviren zu etablieren, wurde auch auf Grund der zwischenzeitlich mit dem Einkanal-System erzielten Ergebnisse aufgegeben, die bisher keine Lösung des Problems der Anlagerung des sekundären Detekting-Antikörpers an die Goldoberfläche des SPR-Chips aufzeigten. Für einen multiplexen Nachweis verschiedener Antigene ist der Einsatz der entsprechenden homologen Antikörper im Gemisch unumgänglich. Die Neigung der sekundären Antikörper sich an den Crosslinker zu binden, würde daher unter den bisherigen Versuchsbedingungen einen spezifischen, simultanen Virusnachweis noch weiter erschweren. Zudem kann ein Chip, der mit mehreren unterschiedlichen Antikörpern funktionalisiert wurde, nur einmal verwendet werden. Bei einer Regeneration des Chips war eine Ablösung der Fängerantikörper nicht zu umgehen. Eine neue Funktionalisierung erfolgte grundsätzlich online, das heißt, die Antikörper wurden im SPR-Gerät über den Chip gespült. Da während des Projektes nur eine Einkanal-Messflusszelle zur Verfügung stand, war es nicht möglich, unterschiedliche Antikörper gleichzeitig auf einem Chip online zu immobilisieren.

Es ist im Zuge des Forschungsvorhabens erfolgreich gelungen, verschiedene Pflanzenviren mittels SPR-Technologie im direkten Testformat schnell und spezifisch nachzuweisen. Die Empfindlichkeit des bewährten Standard-ELISA konnte dabei nicht erreicht werden, und diese scheint mit dem SPR-System in der vorliegenden technologischen Konfiguration im direkten Nachweis auch nicht realisierbar zu sein. Abhilfe könnte ein Sandwich-Assay schaffen, für den eine verbesserte Immobilisierungsmethode etabliert werden muss, die die unspezifische Anlagerung des sekundären Antikörpers ausschließt. Dies ist innerhalb der Projektlaufzeit nicht erreichbar gewesen. Das Forschungsziel des Fördervorhabens wurde zum großen Teil erreicht, einzelne Teilziele mussten aufgrund der erzielten Ergebnisse angepasst bzw. aufgegeben werden.

1.2 Projektteil IPK

1.2.1 Entwicklung eines immunologischen Schnellnachweises für phytopathogene Bakterien

1.2.1.1 Auswahl der nachzuweisenden Antigene (Bakterien) und Antikörper

Vom JKI zur Verfügung gestellt wurden die folgenden Bakterienisolate: je zwei Isolate von *Ralstonia solanacearum*, drei Isolate von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* und ein Isolat von *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, mit den jeweiligen spezifischen polyklonalen Antikörpern.

1.2.1.2 Kultivierung der Bakterienisolate *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris* und *X. hortorum* pv. *pelargonii*

Die Kultivierung der phytopathogenen Bakterienstämme erfolgt in zwei Vollmedien (*R. solanacearum* - BG-Medium; *Xanthomonas* Stämme - YDC-Medium). Zur ihrer Erhaltung wurden sie jeden Monat auf dem entsprechenden Festmedien ausgestrichen und für 48 h bei 25 °C kultiviert. Für die Gewinnung von Proteinrohextrakten wurden die Bakterien in entsprechenden Flüssigmedien für 48 h bei 25 °C kultiviert.

1.2.1.3 Auswahl geeigneter polyklonaler Antikörper

Mittels PTA (plate-trapped-antigen)-ELISA wurden die vom Projektpartner JKI zur Verfügung gestellten polyklonalen Antikörper auf ihre Eignung für die SPR-Messungen getestet. Der PTA-ELISA basiert auf der Antigen-Antikörper-Interaktion. Hierbei wird das bakterielle Antigen an die Oberfläche einer polysorbten Mikrotiterplatte gebunden und mit den zu testenden Antikörpern bzw. Antisera inkubiert. Für den Nachweis einer erfolgreichen Antikörper-Antigen-Interaktion wird abschließend ein enzymkonjugierter Sekundär-Antikörper zugesetzt, der an den Primär-Antikörper bindet und durch Zugabe des entsprechenden Substrates eine photometrisch detektierbare Farbreaktion auslöst. Da diese mit der Antigenkonzentration korreliert, lassen sich mit der Methode neben qualitativen auch quantitative Aussagen zur Antikörper-Antigen-Interaktion treffen. Sowohl die polyklonalen Antisera als auch die IgG des *Ralstonia solanacearum* DSMZ 1993 und des *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1526 reagierten sehr spezifisch. Die besten Reaktionen konnten mit einem polyklonalen Antiseren-Titer von 10^{-4} bzw. einer IgG-Konzentration von 1 µg/mL erreicht werden (Abb. 19).

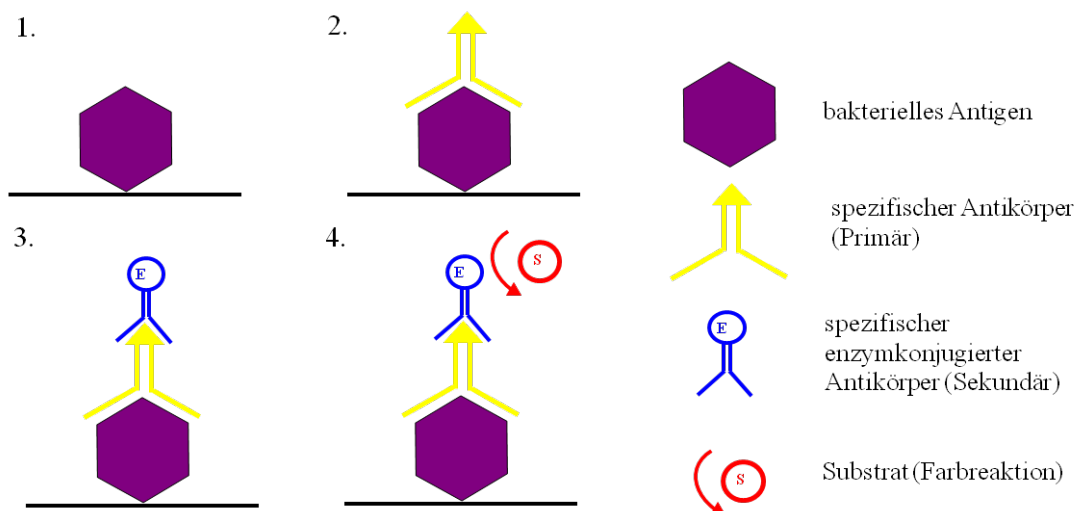


Abb. 19: Messprinzip des PTA-ELISA (plate-trapped-antigen-ELISA). (1) Bakterielle Antigen bindet an die Mikrotiterplatte, (2) Bindung des spezifischen Antikörpers an das Antigen, (3) Einsatz von spezifischen enzymkonjugierten Sekundär-Antikörpern, (4) Zugabe des spezifischen Substrates.

1.2.1.4 Ermittlung der Nachweisempfindlichkeit und Testspezifität des ELISA-Systems

Die Ermittlung der Nachweisempfindlichkeit und Testspezifität des QCM-Systems im Vergleich zu ELISA-Varianten zeigte, dass allein das ELISA-Testsystem als Vergleichssystem eingesetzt werden sollte. Dazu wurden als Antigen Bakteriensuspensionen verschiedener Verdünnungsstufen auf ihre Eignung getestet. Als optimaler Bakterientiter erwies sich eine Suspension mit $2,24 \cdot 10^3$ Zellen. Damit wurden sowohl polyklonale Antiseren, als auch die IgG der *R. solanacearum* und der *Xanthomonas* Stämme auf ihre Kreuzreaktivität gegenüber den entsprechenden Bakterienarten getestet. So zeigten von den untersuchten polyklonalen Antiseren bzw. IgG bis auf *R. solanacearum* DSMZ 1993 Serum, *R. solanacearum* DSMZ 1993 78/3 IgG, *X. campestris* pv. *campestris* 1526 14/2 Serum und *X. campestris* pv. *campestris* 1526 IgG 14/6 alle anderen Kreuzreaktionen mit diesen Antigenen. Die vier selektierten Antiseren bzw. Antikörper wurden für die weiteren Untersuchungen, speziell für die SPR-Messungen eingesetzt.

1.2.1.5 Übertragung und Anpassung der optimierten Testkomponenten an das SPR-System

Im weiteren Bearbeitungszeitraum wurden die immunologischen Komponenten und das Messregime an die SPR-Plattform angepasst. Als Modell für eine Antikörper-Antigen-Interaktion diente *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1526 als Antigen und *X. campestris* pv. *campestris* 1526 IgG 14/6 als Antikörper. Zusätzlich wurde mit dem Antikörper *R. solanacearum* DSMZ 1993 78/3 IgG eine Negativkontrolle eingesetzt. Für die Untersuchungen wurden die entsprechenden Antikörper an die Oberfläche des SPR-Chips über Protein A als Linker immobilisiert. Hierbei gelang es, das SPR-Messsystem hinsichtlich Linker- und Antikörperkonzentration, Puffer, Fließgeschwindigkeit und Messtemperatur zu optimieren. Als optimale Parameter erwiesen sich eine Linkerkonzentration von 1 mg/mL Protein A, eine Antikörperkonzentration von 500 µg/mL, ein Laufpuffer wie PBS-Tween 20 + HO-PEG, sowie eine Blockinglösung aus einem 1:1 Gemisch von 1% TM in PBS mit 0,5 mM HO-PEG, einer Fließgeschwindigkeitsstufe von 35 und einer Messtemperatur von 55 °C.

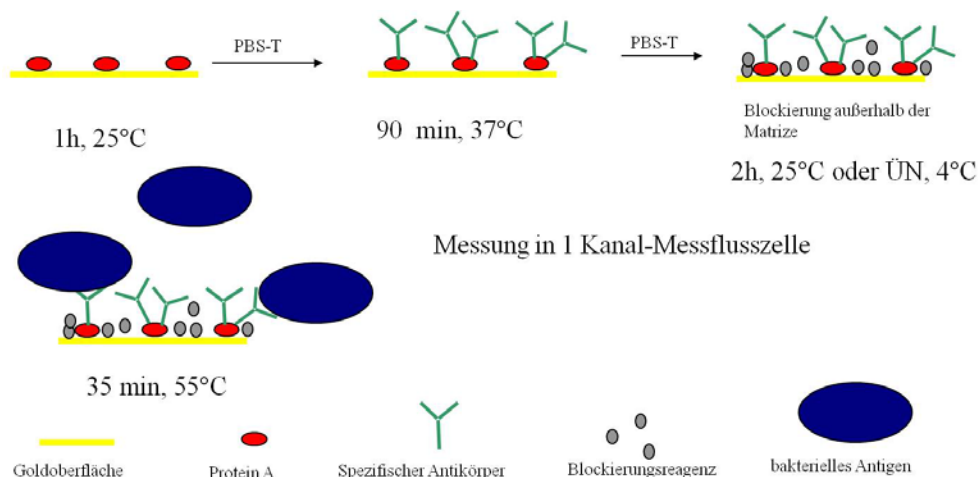


Abb. 20: Messprinzip des SPR-Systems mit (1) Immobilisierung von Protein A an die Goldoberfläche, (2) Bindung der Antikörper an Protein A, (3) Blockierung der Goldoberfläche mit 1:1 1% TM in PBS plus 0,5 mM HO-PEG, (4) Online-Messung in der 1 Kanal-Messflusszelle.

Von der Rijk Zwaan Marne GmbH wurde zahlreiches Pflanzenmaterial, wie *X. campestris* infizierter und nicht-infizierter Spitzkohl, Weißkohl, Rotkohl und Wirsingkohl zur Verfügung gestellt. Das Blattmaterial wurde zerkleinert und in Aliquote bei -80 °C gelagert. In den ersten Optimierungsschritten wurde ausschließlich reiner bakterieller Proteinextrakt vermessen. Erst anschließend wurde pflanzlicher Proteinextrakt gepoolt mit und ohne bakteriellen Proteinextrakt

verwendet, bis letztendlich Pflanzenpresssaft vermessen wurde. Für den Einsatz von Proteinextrakt wurden die lyophilisierten Zellen bzw. das Pflanzenblattmaterial in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und in PBST-HO-PEG-Puffer resuspendiert und vermessen. Für den Pflanzenpresssaft wurde das bei -80 °C gelagerte Blattmaterial in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und bei 10.000 xg für 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messung mittels SPR und ELISA eingesetzt.

1.2.2 Charakterisierung des Lab-on-a-Chip-Systems (Einkanal)

Für die Charakterisierung des Lab-on-a-Chip-Systems wurden Verdünnungsreihen verschiedener Probenansätze (*X. campestris* pv. *campestris* 1526 Proteinrohextrakt, im Labor mit *X. campestris* infiziertes Kohlpflanzenmaterial, nicht-infiziertes Kohlpflanzenmaterial - gespickt mit *X. campestris* pv. *campestris* 1526) vermessen. Zur Präparation des *X. campestris* pv. *campestris* 1526 Proteinrohextraktes wurde das Bakterium in 5 mL YDC-Flüssigmedium für 24 h bei 25 °C vorkultiviert und nach Überführung in die Hauptkultur (15 mL YDC-Medium) für weitere 48 h kultiviert. Von der erhaltenen Bakteriensuspension wurden zunächst die sog. Kolonie bildende Einheit (KBE) ermittelt, was per Ausplattieren der entsprechenden Bakterien-Verdünnungsstufen auf YDC-Festmedium erfolgte. Anhand der für jede Verdünnungsstufe erhaltenen Koloniezahl ließ sich die KBE/mL Zellsuspension berechnen. Für die SPR-Messung wurde die Bakterienkultur bei 12.000 xg (4 °C, 30 min) zentrifugiert und das dabei erhaltene *X. campestris* pv. *campestris* 1526 Pellet für 2 h bei -80 °C inkubiert. Zur Ermittlung des Trockengewichtes (TG) wurde das gefrorene Pellet 48 h lyophilisiert. Das daraus resultierende Zellyophilisat wurde anschließend in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen, analog zu den Blattproben portioniert, in SPR-Puffer resuspendiert und vermessen. Parallel wurden Gemische bestehend aus nicht-infiziertem Blattmaterial und *X. campestris* pv. *campestris* 1526 angefertigt. Als dritte und letzte Variante wurde nicht-infiziertes Blattmaterial (10 mg TG) mit entsprechenden Verdünnungen einer Bakterien-Frischkultur gespickt und deren KBE/mL ermittelt. Diese Proben wurden vor der Messung für 480 s im Ultraschalbad behandelt und zentrifugiert. Für die SPR-Messungen erfolgte die Funktionalisierung der Chips mit Protein A als Linker, *X. campestris* pv. *campestris* 1526 IgG 4/6 als positive Kontrolle und *R. solanacearum* DSMZ 1993 Serum als Negativkontrolle (Abb. 21).

Neben den SPR-Messungen wurden alle Proben per PTA-ELISA als Referenzmethode vermessen. Aus den dabei erhaltenen Messergebnissen (auf SPR- und ELISA-Basis) ließen sich die Nachweisgrenzen berechnen (Tab. 5).

Tabelle 5: Mit Hilfe der SPR bzw. ELISA erreichte Nachweisgrenzen von *X. campestris* und damit infiziertem Kohlpflanzenmaterial.

Nachweis	SPR	ELISA
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1526	7,06 x 10 ⁴ Bakterien/mL	4,7 x 10 ³ Bakterien/mL
Kohlpflanzenmaterial gespickt mit <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1526 - Frischkultur	1,86x10 ² Bakterien/mL	1,86x10 ³ Bakterien/mL

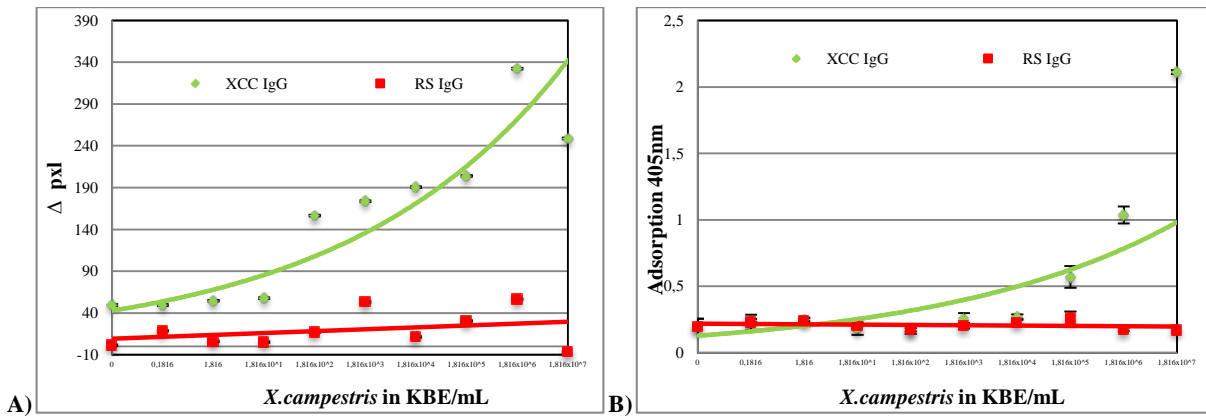


Abb. 21: Zur Ermittlung der Nachweisgrenze des SPR-Messsystems wurden polyklonale Antikörper spezifisch gegen *X. campestris* pv. *campestris* 1526 (Positivkontrolle) und gegen *R. solanacearum* 1993 (Negativkontrolle) immobilisiert. Als Messprobe wurde *X. campestris* pv. *campestris* 1526 (Frischkultur) in einer Matrix aus Spitzkohlblattmaterial eingesetzt. 10 mg TG des lyophilisierten Spitzkohlblattmaterials wurden zusammen mit unterschiedlichen Verdünnungen des *X. campestris* pv. *campestris* 1526 in PBST + HO-PEG resuspendiert. Die Suspension wurde für 480 s im Ultraschallbad behandelt, zentrifugiert und der Überstand per (A) SPR-System bzw. per (B) ELISA-Assay als Vergleichssystem vermessen.

1.2.3 Regenerierbarkeit der Chipoberfläche für wiederholte Messungen

Untersuchungen zum Aufbrechen der Bindung zwischen Antikörper und bakteriellen Antigenkomplexen, sowie der Wiederverwendbarkeit des funktionalisierten SPR-Chips konnten per Messungen zum Nachweis von im Labor mit *X. campestris* infizierten Blattproben, sowie Proteinextrakten von *X. camp.* pv. *camp.* 1526 belegt werden. Hierfür waren SPR-Chips mit Protein A als Linker, *X. campestris* pv. *campestris* 1526 IgG 14/6 als positive Kontrolle und *R. solanacearum* DSMZ 1993 Serum als negative Kontrolle funktionalisiert worden. Auf ihnen wurde infiziertes Blattmaterial bzw. *X. camp.* pv. *camp.* 1526 Proteinextrakt (10 mg TG/mL) bezüglich *X. campestris* vermessen. Die dazu genutzte Messprozedur umfasste mehrere Spül- und Waschschrte, sowie die Probeninkubation. Im ersten Schritt wurde der funktionalisierte Chip mit SPR-Laufpuffer (PBS-Tween + HO-PEG) gespült, um eine Nulllinie zu erhalten. Im zweiten Schritt wurde die Messung gestartet, d. h. 55 μ L Probe in das Messsystem eingespritzt und 50-mal über den Chip gepumpt, so dass sich so viel Antigen wie möglich an die Bindungsstellen der Antikörper anlagern kann. Der dritte sogenannte Spülschritt umfasst das Spülen des Chips mit SPR-Laufpuffer zur Entfernung noch ungebundenen Probenmaterials. Der am Ende dieses Schrittes erreichte Messwert stellt nach Abzug des Ausgangswertes (Wert vor der Probenzugabe) den sog. Endwert dar, der qualitative und quantitative Aussagen zu den bakteriellen Infektionsgrad ermöglicht. Im letzten Schritt kann nun der funktionalisierte, mit gebundenem Probenantigen beladene SPR-Chip wieder regeneriert und so für weitere Messungen genutzt werden. Hierzu wird der Chip mit 0,1 M KOH gespült, was ein Lösen der Bindung zwischen Antikörper und bakteriellen Antigen hervorruft. Dieser Vorgang lässt sich durch ein starkes Absinken des Messsignals dokumentieren. Nach wiederholtem Spülen mit SPR-Laufpuffer wurde das Ausgangssignal (Startsignal - SPR-Chip vor der Probenzugabe) wieder erreicht, d. h. es kann nun mit der nächsten Probenmessung begonnen werden. Basierend auf der beschriebenen Vorgehensweise zur Regeneration wurden pro funktionalisiertem Chip 16 Proben hintereinander vermessen. Die dabei erhaltenen Messwerte belegen, dass die Signale nach der 1. Regeneration ansteigen und ab der 5. Regeneration gering abfallen. Nach dem 13. Reperationsschritt war ein Nachweis von *X. campestris* nicht mehr möglich, d. h. der Chip steht für weitere Messungen nicht mehr zur Verfügung (Abb. 22).

Damit kann zusammengefasst werden, dass mit dem derzeit genutzten SPR-Messregime eine Wiederverwendbarkeit des funktionalisierten SPR-Chips von bis zu 13-mal möglich ist und damit eine (Ja-Nein-)Aussage zur *X. campestris* Infektion der Pflanze getroffen werden kann.

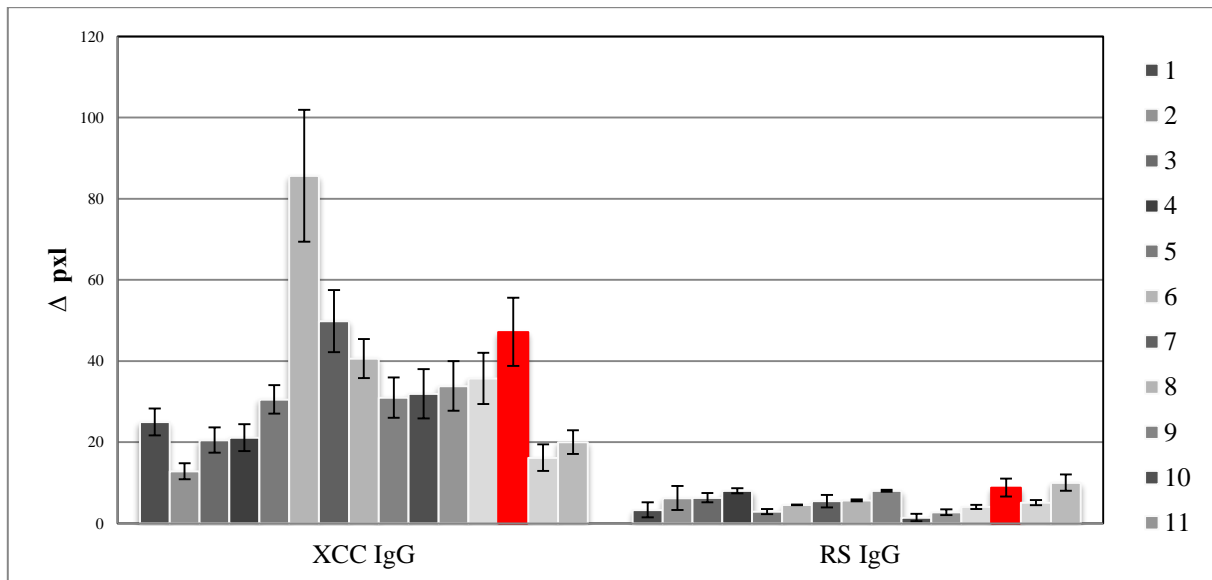


Abb. 22: Vermessung von *in vitro* *X. campestris* infizierten Weißkohlblattmaterial (10 mg TG/mL) zur Untersuchung der Regenerierbarkeit und Wiederverwendbarkeit der SPR-Chips. Auf der Chipoberfläche wurden mit Protein A als Linker, *X. campestris* pv. *campestris* 1526 IgG 14/6 als positive Kontrolle und *R. solanacearum* DSMZ 1993 Serum als negative Kontrolle funktionalisiert. Anschließend wurde die Goldoberfläche mit einem 1:1 Gemisch von 1% TM in PBS mit 0,5 mM HO-PEG geblockt.

1.2.4 Gegenüberstellung von Vergleichsmesssystem und dem SPR-Messsystem

Aus methodischen und apparativen Gründen wurde das ursprünglich als Vergleichssystem dienende QCM-System durch die ebenfalls für Vergleichszwecke eingesetzten ELISA-Tests ersetzt. Mittels ELISA-Tests sind derzeit höhere Sensitivitäten erreichbar als mit dem QCM-Messsystem.

Anhand erster Realproben-Messungen mit frischen Pflanzenpresssäften sollten sowohl das SPR-Messsystem als auch die ELISA-Tests als Vergleichssystem gegenübergestellt werden, um die Ergebnisse des SPR-Systems besser einschätzen zu können. In vorangegangenen Tests konnte bereits die Praxiseignung der SPR-Plattform nachgewiesen werden, jedoch nicht die Konkurrenzfähigkeit. Aus diesem Grund mussten Möglichkeiten eruiert werden, mit denen sich die Messsignale der SPR-Messung steigern lassen. Eine Möglichkeit ist der Einsatz von Goldpartikel mittels Sandwich-Assay. Vermessen wurden zunächst im direkten Nachweis Pflanzenpresssäfte von (1) künstlich mit *X. campestris* infiziertem Kohlblattmaterial und (2) nicht-infiziertem Kohlblattmaterial. Die frisch extrahierten Pflanzenpresssäfte wurden 1:50 mit PBST-HO-PEG verdünnt und in das SPR-Messsystem eingespritzt. Auf die Goldoberfläche der SPR-Chips wurde Protein A als Linker und *X. campestris* pv. *campestris* 1526 IgG 14/6 als positive Kontrolle bzw. *R. solanacearum* DSMZ 1993 Serum als negative Kontrolle funktionalisiert. Für den Sandwich-Assay wurden Antikörperkonjugate des *X. campestris* pv. *campestris* 1526 IgG 14/6 an Goldpartikel gebunden und diese im Anschluss für den direkten Nachweis eingespritzt. Hierbei kam es zum Anlagern der Gold-markierten Konjugate an das durch *X. campestris* pv. *campestris* 1526 IgG 14/6 gebundene Antigen, was eine Erhöhung der Messsignale verursachte (Abb. 23).

Der Vergleich zur analogen Messung ohne Zugabe von Gold-markiertem Konjugat zeigte, dass die Sensitivität der SPR-Plattform durch die Nutzung eines Sandwich-Assays mit Goldmarkierung statt des direkten Nachweises erheblich gesteigert wird.

Zusammenfassend belegen die im Rahmen des Projektes durchgeführten arbeiten, dass die Infektion der Kohlpflanzen mit *X. campestris* sowohl per ELISA-Assay als auch per SPR-Plattform erfolgreich nachweisbar ist. Unter optimierten Bedingungen lassen sich allerdings mit dem SPR-Messsystem sensitivere Nachweisgrenzen erreichen.

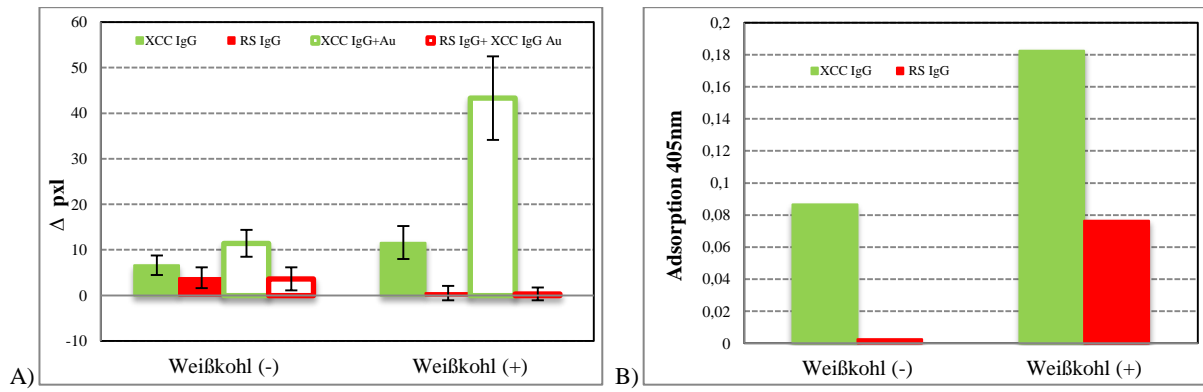


Abb. 23: Nachweis von *X. campestris* in Pflanzensäften von Weißkohlblättern per PTA-ELISA bzw. SPR-Messsystem. Für die entsprechenden Nachweise wurde der Antikörper (anti-*X. campestris* pv. *campestris* 1526 [Positivkontrolle]- bzw. anti-*R. solanacearum* 1993-Antikörper [Negativkontrolle]) immobilisiert. Als Messproben dienten frische Pflanzenpresssäfte (1:50 mit PBST+HO-PEG verdünnt) aus (1) *in vitro* *X. campestris* infizierten Weißkohlblättern bzw. aus (2) nicht-infiziertem Blattmaterial. Alle Proben wurden (A) per SPR-Messsystem mit goldmarkiertem *X. camp.* IgG Konjugat bzw. (B) PTA-ELISA als Vergleichssystem vermessen.

1.3 Projektteil IWS

1.3.1 Technische Weiterentwicklung des Lab-on-a-Chip-Systems

1.3.1.1 Konzeption

Ein wesentlicher Kostenfaktor der bestehenden SPR-Plattform ist die Goldbeschichtung der SPR-Chips. Damit in einem Beschichtungslauf zukünftig mehr SPR-Chips beschichtet werden können, wurde die Fläche der Chips von 76x26 mm² auf 60x13 mm² verkleinert. Weiterhin wurden im Rahmen des Projektes zwei Ansätze zur Steigerung von Probendurchsatz und Rentabilität verfolgt: (1) die parallele Messung mehrerer Proben auf einem Chip durch Etablierung einer 3-Kanal-Flusszelle. (2) Die serielle Vermessung mehrerer Proben auf einem Chip durch Regeneration. Beide Ansätze setzen ein automatisiertes Probenhandlungssystem voraus. Ausgehend von der Zielstellung, der bestehenden Technologieplattform und den neuen, miniaturisierten SPR-Chips wurden aus Anforderungen und Randbedingungen folgende Module erarbeitet: 15-Kanal-Funktionalisierungsstation, automatisiertes Probenhandlungssystem, 3-Kanal-Messflusszelle, Spoterkennungsalgorithmus sowie Referenz-Assays. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Sensitivitätssteigerung durch Ankopplung von Nanopartikeln durchgeführt.

1.3.1.2 Entwicklung, Konstruktion, Fertigung und Optimierung einer Funktionalisierungsstation

Ausgehend von der Konzeption und der bereits etablierten 17-Kanal-Funktionalisierungsflusszelle wurden verschiedene Varianten einer Funktionalisierungsstation entworfen und verglichen. Anschließend wurde die Vorzugsvariante ermittelt, dimensioniert, konstruiert, erfolgreich umgesetzt und optimiert (siehe Abb. 24. Spezifikation: 15 Kanäle, Kanalbreite: 150 µm, Kanalhöhe 200 µm, Schnittstelle für 100 µl Pipettenspitzen und optische Befüllungskontrolle durch Sichtfenster von oben). Zusätzlich wurden Marker etabliert, mit denen die funktionalisierten Areale im Kamerabild sehr gut identifiziert und vom Spoterkennungsalgorithmus erkannt werden.

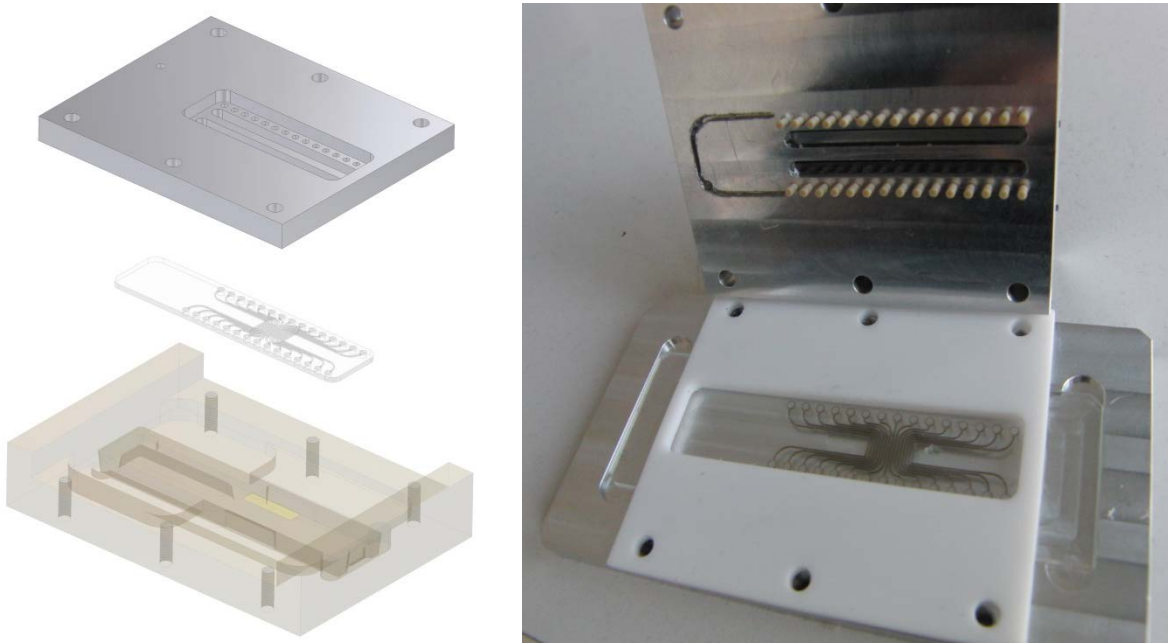


Abb. 24: Explosionsdarstellung der Funktionalisierungsstation (links) und Prototyp der Abformstation zur Herstellung der 15-Kanal-Funktionalisierungsflusszellen (rechts).

1.3.1.3 Entwicklung, Konstruktion, Fertigung und Optimierung eines Probenhandlungssystems

Ziel des Projektes war eine weitere Reduktion der Kosten durch die serielle Vermessung und Charakterisierung mehrerer Proben mit einem SPR-Chip. Dabei sollen die Messflächen zwischen den einzelnen Messungen durch Spülen mit entsprechenden Waschlösungen regeneriert werden (Abb. 25). Das Probenhandlungssystem realisiert dazu für jede Probe automatisch folgenden Ablauf:

1. Spülen mit Puffer,
2. Inkubation mit Probe,
3. Spülen mit Puffer,
4. Regeneration durch Spülen mit Waschlösung.

Zur Kompensation temperatur- und medienbedingter Signaländerungen werden bei der Funktionalisierung der SPR-Chips parallel zu den Messflächen zusätzliche Referenzflächen angelegt. Diese sind gegen unspezifische Wechselwirkungen geblockt, sodass nur Volumeneffekte - Brechungsindexänderungen von Probenlösung und Chipfunktionalisierung - gemessen werden. Die Messflächen erfassen neben den Volumeneffekten auch Oberflächeneffekte - die Anbindung von Analyten an die immobilisierten Liganden. Auf diesem Weg ist eine teilweise Kompensation von temperatur- und medienbedingten Signaländerungen durch Differenzbildung von Mess- und Referenzsignal möglich (Abb. 25). Die Auswertung der Signalverläufe ermöglicht weiterhin eine Überwachung des Regenerationsprozesses und somit eine Qualitätssicherung. Wird nach Abschluss der Regeneration das Ausgangsniveau nicht wieder erreicht, muss die Regeneration wiederholt oder der Chip verworfen werden.

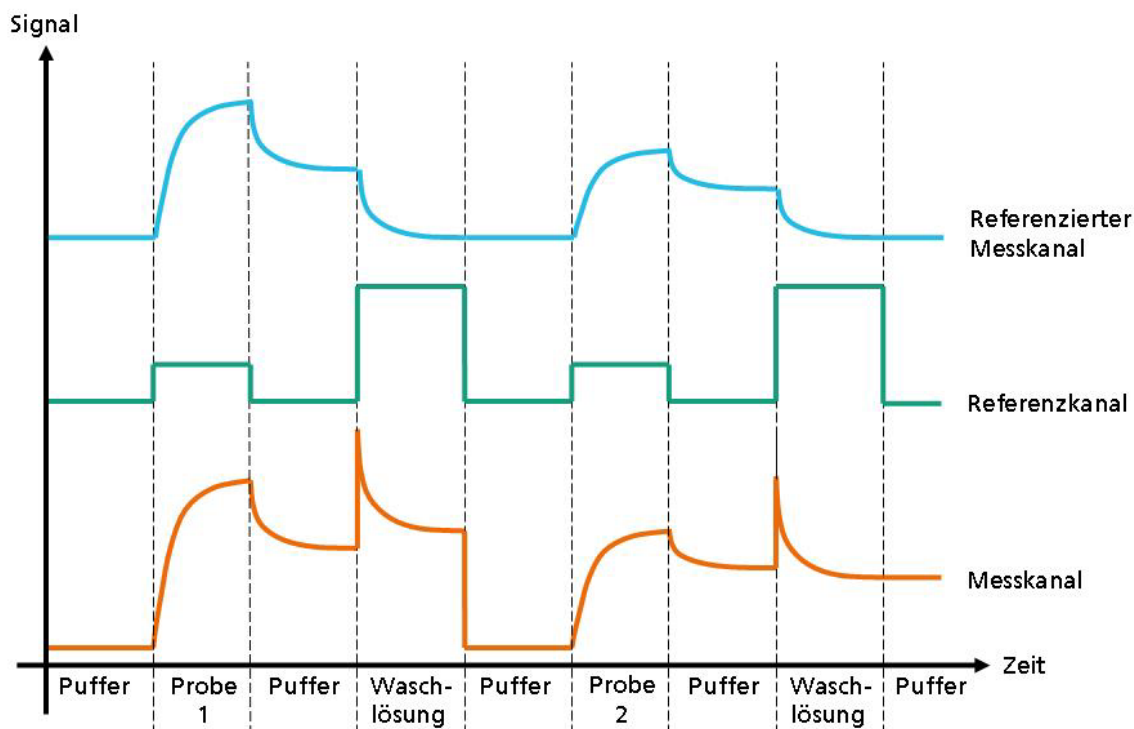


Abb. 25: Simulierte Messsignalverläufe für die serielle Vermessung mehrerer Proben mit anschließender Regeneration.

Ausgehend von der Konzeption und den bereits etablierten Autosamplern wurden in enger Kooperation mit der MLE Dresden GmbH verschiedene Varianten eines Probenhandlungssystems entworfen und verglichen. Anschließend wurden die Vorzugsvariante ermittelt, dimensioniert, konstruiert, drei Probenhandlungssysteme gefertigt, erfolgreich getestet und optimiert (Abb. 26). Spezifikation: Aufnahme von 2 Mikrotiterplatten und 3 Zusatzreservoirs, integriertes Nadelspülsystem.

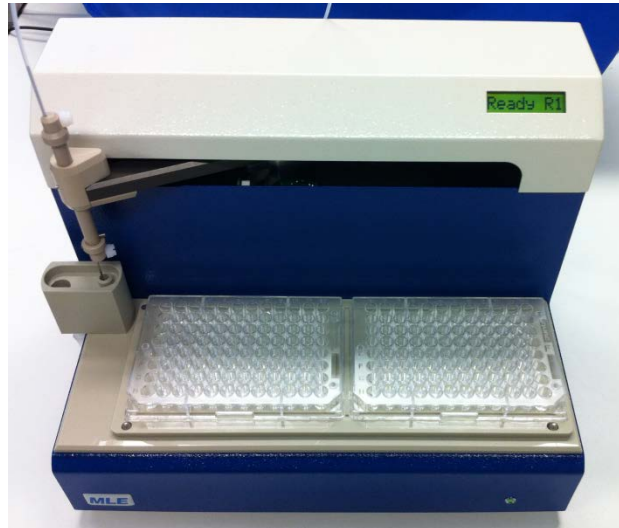
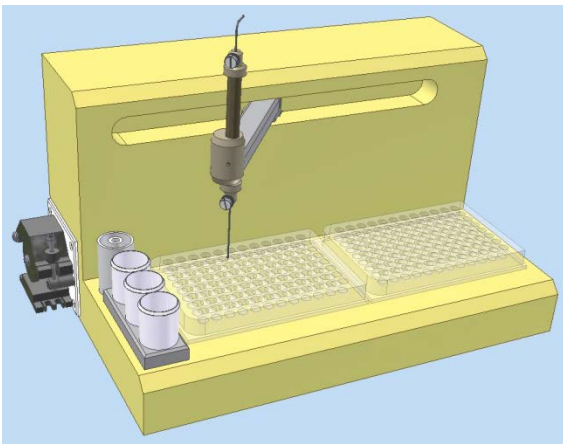


Abb. 26: Konstruktion (links) und Prototyp (rechts) des Probenhandlungssystems.

1.3.2 Entwicklung, Konstruktion, Fertigung und Optimierung einer 3-Kanal-Messflusszelle

Ein weiteres Ziel des Projektes war eine weitere Reduktion der Kosten durch die parallele Vermessung und Charakterisierung mehrerer Proben mit einem SPR-Chip. Voraussetzung für eine mehrkanalige Messung auf den SPR-Chips ist das exakte Übereinanderliegen von Mikrokanälen und Messflächen. Im Rahmen umfangreicher Experimente stellte sich heraus, dass die exakte Positionierung von Mehrkanal-Messflusszellen aus Silikon auf den SPR-Chips sehr großes experimentelles Geschick und viel Übung voraussetzt. Ausgehend von diesen Randbedingungen wurde eine neue 3-Kanal-Flusszelle entwickelt. Dabei wird die bisher in einem Abformprozess hergestellte Silikonflusszelle durch eine laserstrukturierte, doppelseitige Klebefolie ersetzt (Abb. 27 und 28).

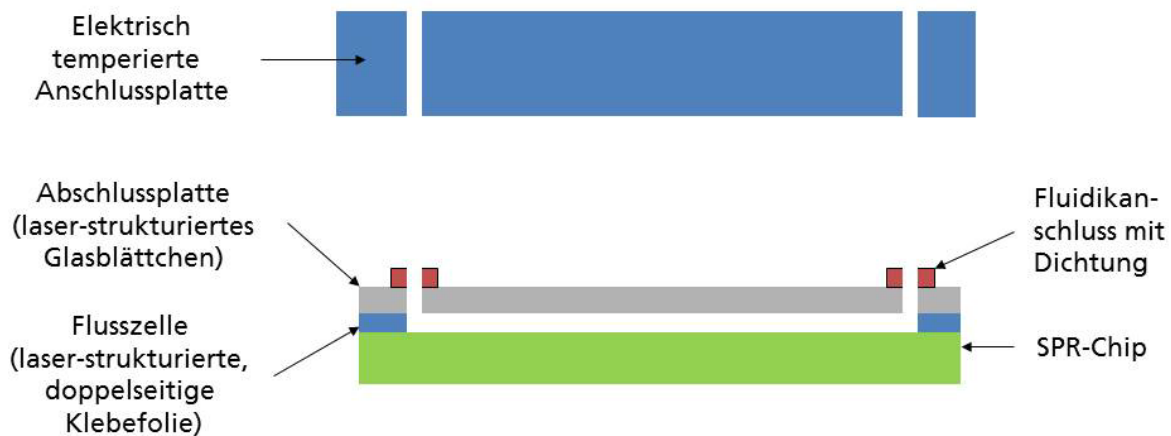


Abb. 27: Schematischer Aufbau der 3-Kanal-Flusszelle.



Abb. 28: Explosionsdarstellung (oben links), leere (oben rechts) und teilweise befüllte 3-Kanal-Flusszelle (unten).

Die entwickelten 3-Kanal-Flusszellen sind fluidisch dicht, wurden erfolgreich getestet und optimiert. Eine Beeinflussung der Assays konnte nicht beobachtet werden.

1.3.3 *Entwicklung und Implementierung eines Spoterkennungsalgorithmus*

Speziell die Arbeit mit hochdichten Spotarrays macht es für den Nutzer schwierig, die Lage der Spots manuell zu bestimmen. Im Vergleich zur 15-Kanal-Flusszelle sind mittels Spotten 60 Messflächen pro Kanal möglich. Basierend auf der signifikanten Verschiebung der SPR-Minima bei Verwendung spezieller Marker wurde ein Algorithmus zur automatischen Erkennung der Messflächen entwickelt. Dieser Algorithmus bestimmt zunächst für jede Pixelreihe der Kamera die Lage des Minimums. Ausgehend von der mittleren Lage der Minima werden durch die Marker hervorgerufene „Peaks“ in dieser Verteilung der Minima ermittelt und daraus die Position der Messflächen bestimmt.

1.3.4 *Spritzguss und Goldbeschichtung von SPR-Chips*

In enger Kooperation mit der KDS Radeberger Präzisions-Formen- und Werkzeugbau GmbH und dem Fraunhofer-Institut für Angewandte Optik und Feinmechanik IOF wurden neue, miniaturisierte SPR-Chips durch Spritzguss hergestellt, goldbeschichtet und erfolgreich getestet.

1.3.5 *Erprobung und Optimierung Gesamtsystem*

Parallel zu den Assay-Entwicklungen der Projektpartner IPK und JKI wurden am IWS Untersuchungen zur Realisierung von lagerfähigen, regenerierbaren *Ready-to-use-chips* mit Antikörperbasierten Referenz-Assays durchgeführt.

Dazu wurden vom Projektpartner JKI ein polyklonaler und ein monoklonaler Antikörper ausgewählt und bereitgestellt, die spezifisch das Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) binden. Das SBMCV wird durch den bodenbürtigen Vektor *Polymyxa graminis* in verschiedene Getreidesorten (Roggen, Triticale und Weizen) übertragen und kann in den betroffenen Gebieten zu Ertragsverlusten von 50 % bis 70 % führen. Die einzige effektive Bekämpfungsmethode ist der Anbau von resistenten Sorten. Diese Kulturpflanzen besitzen eine sogenannte Translokationsresistenz. Das bedeutet, dass der natürliche Virusbefall der Wurzeln zwar ungehindert geschieht, aber die Ausbreitung in die grünen Pflanzenteile nicht oder stark verzögert stattfindet. Für die Resistenzprüfung sind neben der visuellen Begutachtung vor allem sensitive, selektive, preiswerte sowie zeitnahe Nachweismethoden von entscheidender Bedeutung.

Für den Nachweis wurde ein Protokoll zur stabilen und funktionellen Immobilisierung von Antikörpern über Protein A auf Goldoberflächen entwickelt, optimiert und erfolgreich etabliert und die Anwendung von Polyethylenglykol zum Blocken gegen unspezifische Bindungen in das Funktionalisierungsprotokoll integriert (Abb. 29):

- Reinigen der Goldfläche mit rauchender Salpetersäure (65 %),
- Inkubation des Sensorchips in Neutralisationslösung (1 x 25 % Ammoniak, 1 x 30 % Wasserstoffperoxid, 5 x ddH₂O) für 2 min bei Raumtemperatur (RT),
- Spülen mit ddH₂O und Trocknen mittels Stickstoffgas,
- Inkubieren von 1 mg/mL Protein A für 1 h bei RT,
- Spülen der Fläche mit PBST (10 mM PBS pH 7,4 und 0,05 % (v/v) Tween 20),
- Inkubieren von 50 µg/mL Antikörper (SBCMV-pAk, SBCMV-mAk, Referenz-Ak) für 1 h bei RT,
- Spülen der Fläche mit PBST,
- Blockung mit 1 mmol/L HO-PEG für 1 h bei RT. (vi) Spülen der Fläche mit PBST.

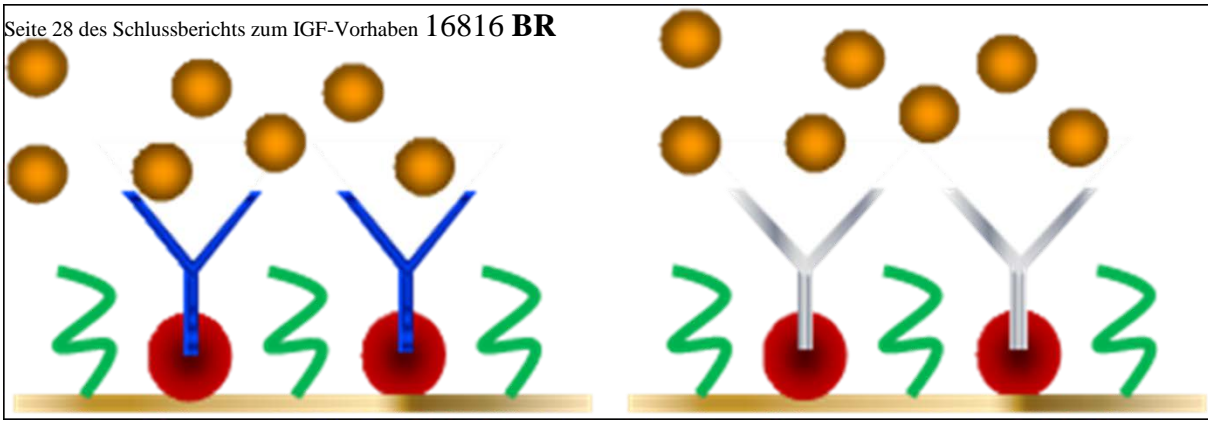


Abb. 29: Schematische Darstellung des Assays. Die Anti-SBCMV Antikörper (blau) werden über Protein A (rot) an die Goldoberfläche gekoppelt und die noch freien Bereiche mittels Polyethylenglykol (grün) geblockt. Der Referenzantikörper (grau) wird auf die gleiche Weise wie die Anti-SBCMV Antikörper immobilisiert. Die zu analysierende Probe wird auf beiden Flächen gleichzeitig vermessen.

Die SPR-Messungen wurden bei einer Fließrate von 2,48 $\mu\text{L/s}$ als Doppelbestimmung wie folgend beschrieben durchgeführt:

- Spülen der Fläche mit PBST,
- Injektion von 60 μL SBCMV,
- Spülen der Fläche mit PBST,
- Regeneration mit 60 μL 8 mmol/L NaOH,
- Spülen der Fläche mit PBST.

Als Laufpuffer sowie zur Verdünnung der Proben wurde 10 mmol/L PBST verwendet.

In umfangreichen Versuchen wurde als optimale Regeneration ein pH-Schock mit 60 μL 8 mmol/L NaOH ermittelt (Abb. 30).

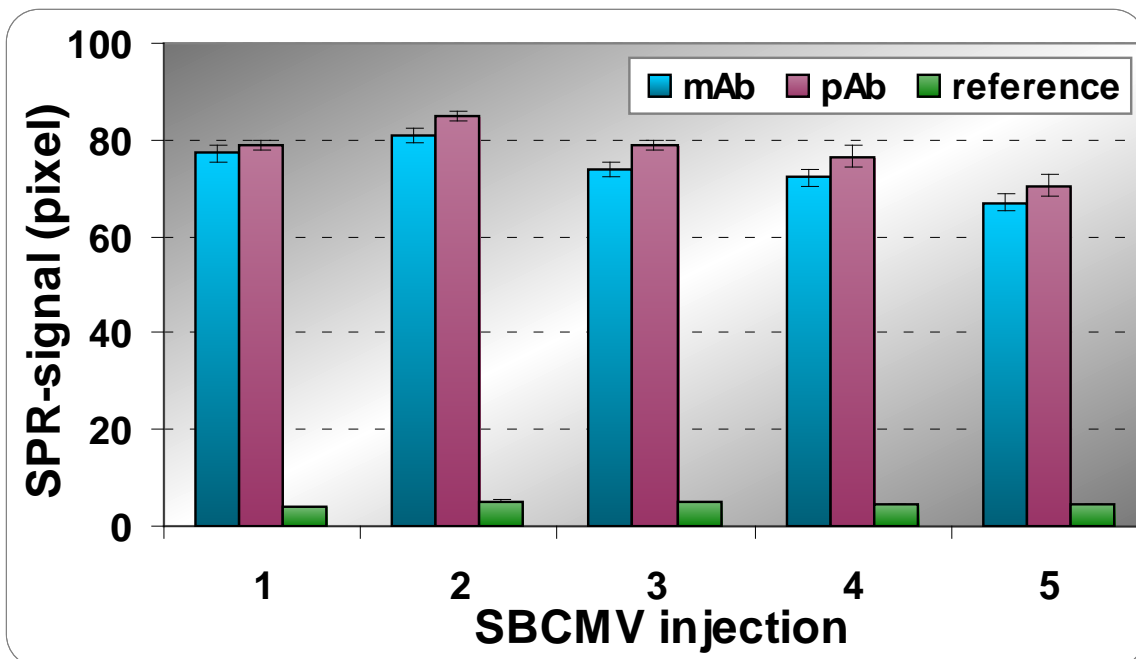


Abb. 30: Vergleich der Bindungssignale nach 5 sequentiellen Antigen-Injektionen mit nachfolgender Regeneration (mAb - monoklonaler Antikörper, pAb - polyklonaler Antikörper, reference - Referenzantikörper). Die Standardabweichung wurde aus 20 Datenpunkten berechnet.

Zur Ermittlung von Nachweisgrenze und Kalibrierungskurve wurden Viruskonzentrationen von 0,7 $\mu\text{g/mL}$ bis 92,5 $\mu\text{g/mL}$ vermessen (Abb. 31). Mit dem entwickelten Assay können SBCMV-Konzentrationen größer 0,9 $\mu\text{g/mL}$ detektiert werden.

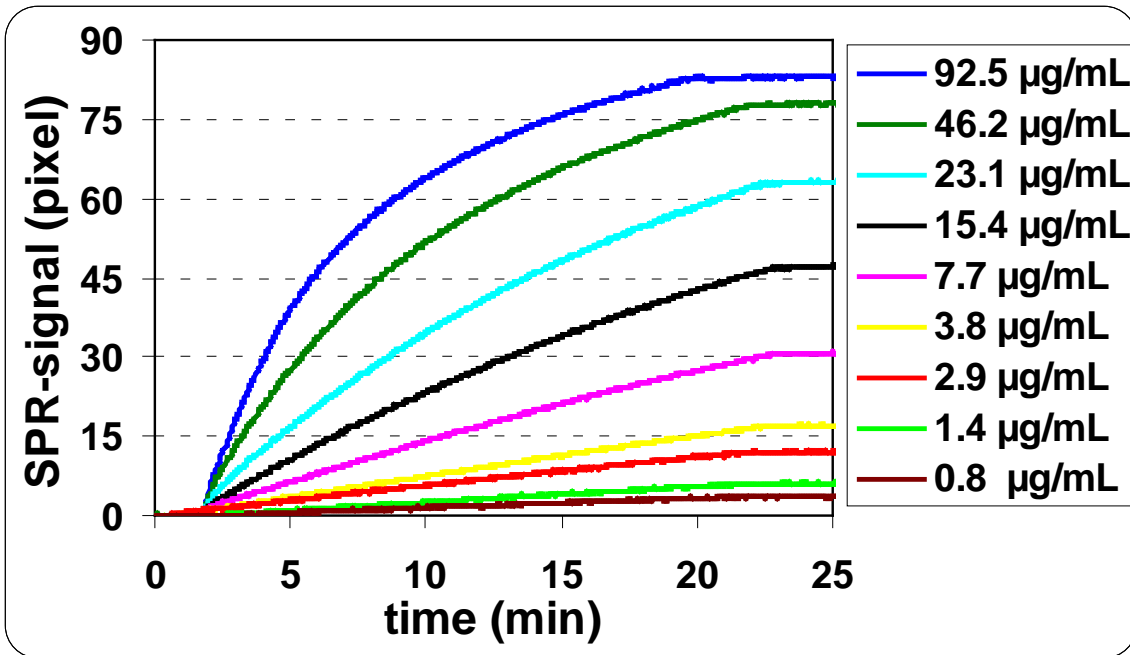


Abb. 31: Sensorgramme einer SBCMV-Konzentrationsreihe für mit polyklonalem SBCMV-Antikörper funktionalisierte Messflächen. Die Signale des Referenzantikörpers wurden von den Bindungssignalen subtrahiert.

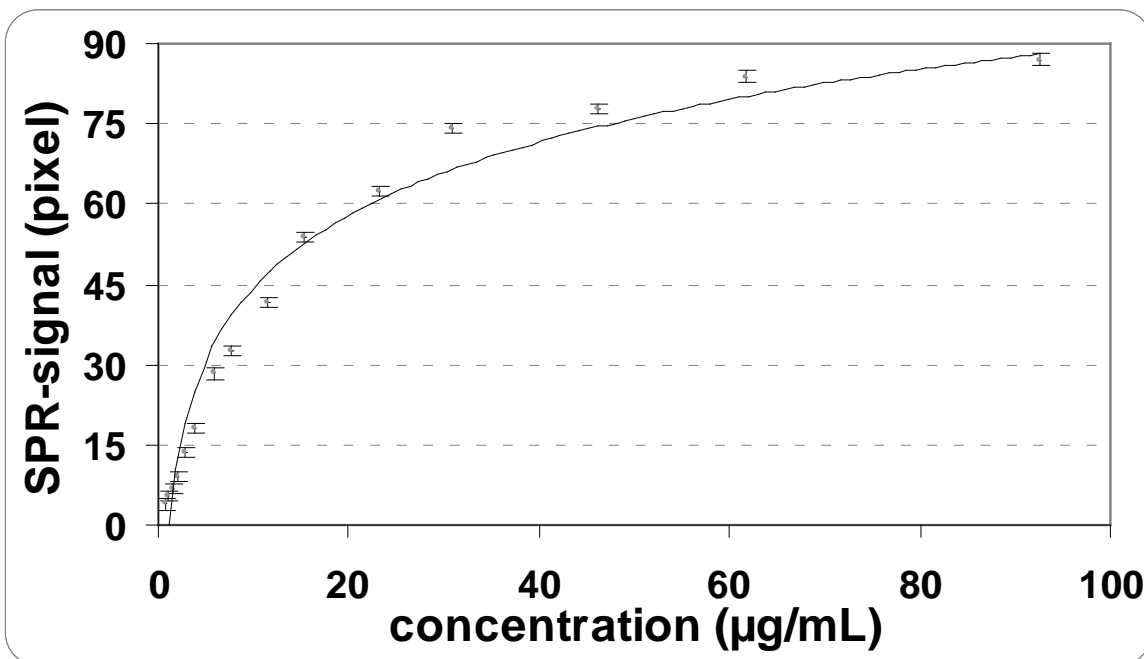


Abb. 32: Kalibrierkurve einer SBCMV-Konzentrationsreihe für mit polyklonalem SBCMV-Antikörper funktionalisierte Messflächen. Die Signale des Referenzantikörpers wurden von den Bindungssignalen subtrahiert.

Teilergebnisse wurden bereits publiziert: Henseleit, A.; Schmieder, S.; Boschke, E.; Marx, U.; Hoffmann, S.; Klapsing, R. A.; Sonntag, F.: Immunosensoren - Universelles Protokoll zur Immobilisierung von Antikörpern für die spezifische Antigen-Detektion. In: Dresdner Beiträge zur Medizintechnik 10 (2010).

Weitere Untersuchungen zur Realisierung von lagerfähigen, regenerierbaren *Ready-to-use-chips* wurden anhand des pp65-Antigen/Antikörper-Assays durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die funktionalisierten SPR-Chips mehr als 10mal regeneriert und mehr als 4 Wochen ohne Signalverlust gelagert werden können. Teilergebnisse wurden bereits publiziert: Tröger, V.; Malik, S.; Sonntag, F.; Schmieder, S.: Generation of ready-to-use SPR chips using automated nano-spotting. In: Biomed Tech 2012; 57 (Suppl. 1), DOI: 10.1515/bmt-2012-4251.

1.3.6 Steigerung der Sensitivität durch Ankopplung von Nanopartikeln

Mit dem im Projekt verwendeten SPR-Messsystem werden Änderungen des Brechungsindex (Messbereich: $n = 1,33 - 1,38$) in einem schmalen Bereich über der Goldoberfläche (0-200 nm) erfasst. Durch Ankopplung von Nanopartikeln mit hohem Brechungsindex (n -Silizium= 3,4 oder n -Gold= 3,47) kann die Brechungsindexdifferenz zwischen Puffer (n -Wasser= 1,33) und einem Analyt (n -Protein= 1,45) signifikant gesteigert werden.

Gemeinsam mit der TU Dresden (Dipl.-Ing. Anja Henseleit, Institut für Bioverfahrenstechnik) wurden erste Versuche zur Steigerung der Sensitivität durch Ankopplung von Nanopartikeln durchgeführt.

Als Modellsystem diente ein Antikörper-basierter Sandwich-Assay zum Nachweis von Humanalbumin (HSA), bei welchem der sekundäre Antikörper wahlweise mit einem Goldnanopartikel gekoppelt wird. Abbildung 33 zeigt beispielhaft ein Sensogramm für folgenden Versuch:

- Minute 0 bis 12 → Anbindung von HSA aus der Probe an die immobilisierten Antikörper,
- Minute 12 bis 16 → Spülen,
- Minute 16 bis 32 → Anbindung der sekundärer Antikörper an das gebundene HSA (blaue Kurve: sekundärer Antikörper, gelbe Kurve: sekundärer Antikörper gekoppelt mit 20 nm-Gold-Nanopartikel).

Die Ankopplung des sekundären Antikörpers bewirkt eine Signalsteigerung um das 2,5-fache. Durch Anbindung eines 20 nm-Gold-Nanopartikels an den sekundären Antikörper kann das Signal um das 16-fache gesteigert werden.

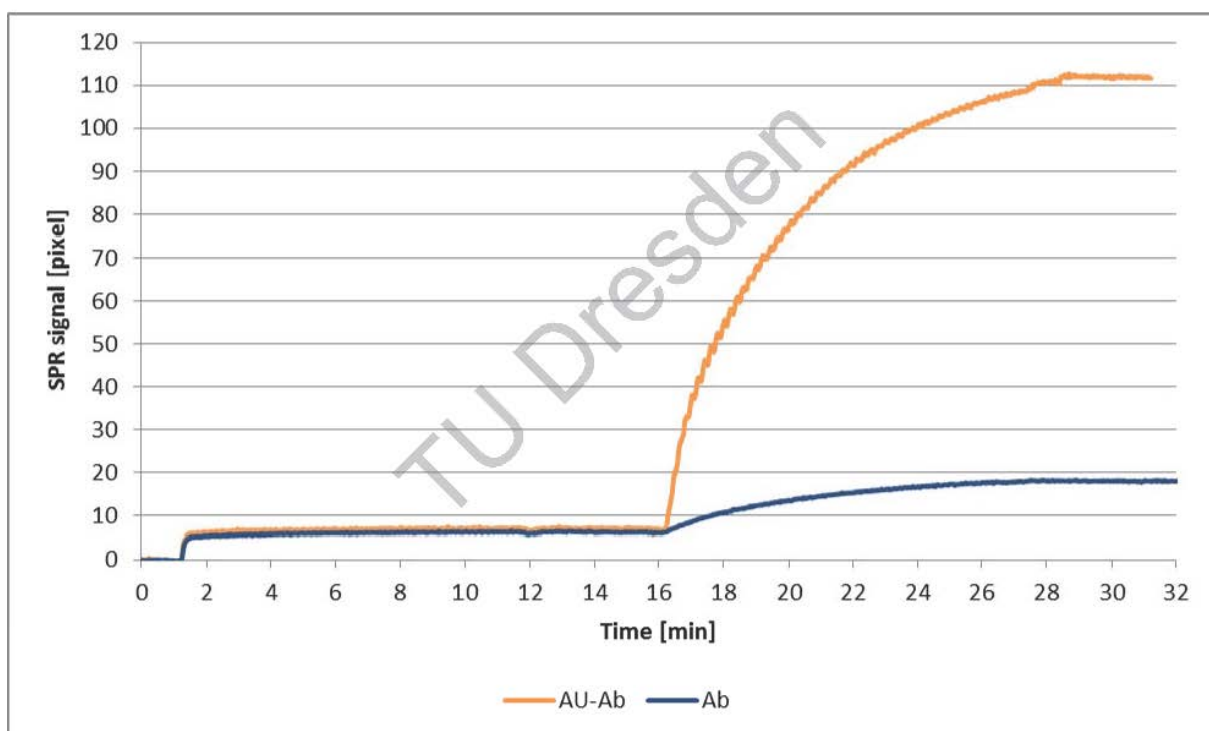


Abb. 33: Sensogramm für einen HSA-Assay. Minute 0 bis 12 → Anbindung von HSA aus der Probe an die immobilisierten Antikörper. Minute 12 bis 16 → Spülen. Minute 16 bis 32 → Anbindung der sekundärer Antikörper an das gebundene HSA (blaue Kurve: sekundärer Antikörper, gelbe Kurve: sekundärer Antikörper gekoppelt mit 20 nm-Gold-Nanopartikel).

Der Versuch zeigt, dass die Nachweisgrenze durch Ankopplung von Nanopartikeln signifikant herabgesetzt werden kann.

2 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse und Anwendungsmöglichkeiten

Die SPR-Technologie ist eine allgemein etablierte Methode, um Interaktionen auf molekularer Ebene zu messen (Schasfoort & Tudos, 2008). Obwohl SPR-Biosensoren bisher hauptsächlich zur Analyse von Proteinen oder Peptiden, insbesondere pharmazeutisch aktiven Substanzen, Rezeptoren und Antikörpern eingesetzt wurden, gibt es ein zunehmendes Interesse, diese Technologie auch zum labelfreien Nachweis von pathogenen Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien und Pilze, einzusetzen (Skottrupp et al., 2008; Sharma & Mutharasan, 2013). Literaturberichte über eine Anwendung der SPR-Methode zur Analyse von Pflanzenviren sind noch selten. Die folgenden Viren wurden bisher in SPR-Analysen einbezogen: *Apple stem pitting virus* (ASPV) (Lautner et al., 2010), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) (Zakri et al., 2010), *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Boltovests, 2002), *Cowpea mosaic virus* (CpMV) (Dubs et al., 1992) und *Lettuce mosaic virus* (LMV) (Candresse et al., 2007). Während bei einem auf Aptameren-basierenden SPR-Chip zur Detektion des ASPV eine starke Interaktion der selektierten Aptamere mit Pflanzenproteinen den Virusnachweis stark limitierten, wurde beim ToLCNDV mit SPR lediglich die Interaktion rekombinanter Antikörper mit exprimierten Virusproteinen analysiert. Gereinigte Viruspräparate des TMV dienten als Modell, um die Immobilisation der Sensoroberfläche mit IgG zu optimieren (Boltovests, 2002). In neueren Untersuchungen kam die SPR-Technologie zum Einsatz, um beim TMV den Effekt von Virusinhibitoren zu quantifizieren (Boltovests et al., 2013).

Relativ häufig wird in der Literatur über den Einsatz der SPM-Methode zur Messung der Interaktion von monoklonalen Antikörpern mit Pflanzenviren, wie z.B. CpMV, LMV und TMV (Dubs et al.; Candresse et al., 2007; Saunal & Van Regenmortel) mit dem Ziel berichtet, spezifische Virusepitope besser zu charakterisieren. Dagegen sind Berichte zum Einsatz dieser Technologie zum direkten und spezifischen Nachweis von Viren in Pflanzenmaterial kaum zu finden. Boltovests et al. (2004) berichteten über einen SPR-Nachweis in der Grünalge *Bracteacoccus minor*, die experimentell mit TMV inokulierte wurde, wobei mittels einer Kalibrations-Kurve eine Nachweisgrenze von ca. 5 µg Virus/ml berechnet wurde. Neuere Berichte aus dieser Arbeitsgruppe ergaben eine relativ gute Übereinstimmung für die Detektion des TMV in Tabakpflanzen mittels SPR und eines ELISA-Systems, das Meerrettich-Peroxidase als Markerenzym verwendet, ohne dass jedoch Konzentrationsangaben für den Virusnachweis gemacht werden (Boltovests et al., 2013b). Die Autoren diskutieren die theoretischen Grenzen der SPR-Methode, die bei größeren biologischen Objekten in der begrenzten Eindringtiefe der exponentiell abklingenden evaneszenten Wellen in einem dielektrischen Medium bestimmt wird. Die Größe der Komplexe zwischen Rezeptor auf der Oberfläche und dem Analyten sollte daher 40-50 nm nicht wesentlich überschreiten (Boltovests et al., 2013a und b). Für die meisten Pflanzenviren, einschließlich der gestreckten bzw. fadenförmigen scheint dies zuzutreffen, wenn diese parallel zur Oberfläche gebunden werden.

Das Lab-on-a-Chip System ist grundsätzlich in der Lage, Kartoffelviren schnell und spezifisch in Pflanzensaft nachzuweisen. Allerdings bleibt es in der Empfindlichkeit bislang etwa um den Faktor 100 hinter der des DAS-ELISA zurück. Trotzdem hat dieses System einige Vorteile zu bieten, allen voran seine Schnelligkeit, die vorteilhaft für Fragestellungen genutzt werden kann, bei denen sich die Konzentration des Analyten sicher im Messbereich der Methode befindet. Die Versuche zur weiteren Absenkung der Nachweisgrenze durch Verstärkung des Messsignals mittels Nanogoldkonjugaten haben gezeigt, dass hier noch methodische Fortschritte möglich sind. Eine verbesserte Immobilisierung der Fängerantikörper in Kombination mit der Verhinderung jeglicher unspezifischer Bindung durch optimale Blockierung der verbleibenden freien Bindungsstellen auf dem SPR-Chip könnte dieser Technologie neue Chancen im Hinblick auf den schnellen und labelfreien Nachweis von Pflanzenpathogenen erschließen. Dass dies grundsätzlich realistisch erscheint, zeigten kürzlich publizierte Ergebnisse von Gutierrez-Aguirre et al. (2014), die über die

Optimierung eines SPR-Sensor Chips zum Nachweis des PVY mit monoklonalen Antikörpern berichteten. Die Nachweisgrenze war mit 0,3 µg/ml jedoch immer noch ca. 10-fach geringer als beim ELISA, die bei 0,02 µg/ml lag.

Referenzen

- Boltovets PM, Boyko VR, Kostikov IY, Dyachenko NS, Snopok BA, Shirshov YM (2002): Simple method for plant virus detection: effect of antibody immobilization technique. *J. Virol. Methods* **105**: 141-146.
- Boltovets PM, Polischuk OM, Kovalenko OG, Snopok BA (2013a): A simple SPR-based method for the quantification of the effect of potential virus inhibitors. *Analyst*: **138**: 480-486.
- Boltovets PM, Snopok BA, Boyko (2013b): Surface capturing of virion-antibody complexes: Kinetic study. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **44**: No. 2/3, 112-118.
- Boltovets PM, Snopok BA, Boyko VR, Shevchenko TP, Dyachenko NS, Shirshov YM. (2004): Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies. *J. Virol. Methods* **121**: 101-106.
- Candresse T, Lot H, German-Retana S, Krause-Sakate R, Thomas J, Souche S, Delaunay T, Lanneau M, Le Gall O (2007): Analysis of the serological variability of lettuce mosaic virus using monoclonal antibodies and surface Plasmon resonance technology. *J. Gen. Virol.* **88**: 2605-2610.
- Clark MF & Adams AN (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J gen Virol.* **34**: 475-483.
- Dubs MC, Altschuh D, Van Regenmortel MHV (1992): Interaction between viruses and monoclonal antibodies studied by surface-plasmon resonance. *Immunol. Lett.* **31**: 59-64.
- Gutierrez-Aguirre I, Hodnik V, Glais L, Rupar M, Jacquot E, Anderluh G., Ravnikar M (2014): Surface plasmon resonance for monitoring the interaction of Potato virus Y with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **447**: 74-81.
- Hampton R, Ball E, De Boer S (Eds.) 1990: *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens*. APS Press, St. Paul. MN., USA, 389 pp.
- Lautner G, Balogh Z, Bardoczy V, Meszaros T, Gyurcsanyi RE (2010): Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging. *Analyst* **135**: 918-926.
- Richter J, Proll E, Rabenstein F, Stanarius A (1994): Serological detection of members of the *Potyviridae* with polyclonal antisera. *J. Phytopathol.* **142**: 11-18.
- Saunal H, Van Regenmortel MH (1995): Kinetic and functional mapping of viral epitopes using biosensor technology. *Virology* **213**: 462-471.
- Schasfoort RBM & Tudos AJ (2008): *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, RSC Pub, London, 2008. 401 pp. <http://pubs.rsc.org/en/Content/eBook/978-0-85404-267-8#!divbookcontent>
- Shankaran DR & Miura N (2007): Trends in interfacial design for surface plasmon resonance based immunoassays. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **40**: 7187-7200.
- Shankaran DR, Gobi KV, Miura N (2007): Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B* **121**: 158-177.
- Skottrup PD, Nicolaisen M, Justesen AF (2008): Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors, *Biosens. Bioelectron.* **24**: 339-348.
- Zakri AM, Ziegler A, Torrance L, Fischer R, Commandeur U (2010): Generation and characterization of a scFv against recombinant coat protein of the geminivirus tomato leaf curl New Delhi virus. *Arch. Virol.* **155**: 335-342.

3 Veröffentlichungen

Tagungsbeiträge:

Sabine Nutz, Frank Rabenstein und Thomas Kühne „Entwicklung einer immunologischen Nachweismethode für Kartoffelviren mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz“ 58. Deutsche Pflanzenschutztagung 10. bis 14. 11. 2012, Technische Universität Braunschweig, Deutschland

Nutz S., Rabenstein F., Kühne T. „Development of a rapid immuno-based method for simultaneous detection of potato viruses with SPR (Surface Plasmon Resonance)“, 4. Nachwuchswissenschaftlerforum 29.11.-01.12.2011, Julius Kühn-Institut, Quedlinburg, Deutschland

Sabine Nutz, Frank Rabenstein und Thomas Kühne „Ein immunologischer Nachweis für Kartoffelvirus X (PVX) mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz“, 44. Tagung des Arbeitskreises Virologie der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, 08.-09-03.2012, Julius Kühn-Institut, Quedlinburg, Deutschland

Sabine Nutz, Frank Rabenstein und Thomas Kühne „Möglichkeiten und Grenzen eines immunologischen Nachweises von Kartoffelviren mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie“, 8. Deutsches BioSensor Symposium 10.-13.03.2013 an der TH Wildau, Deutschland

Tröger, V.; Strehlitz, B.; Stoltenburg, R.; Schmieder, S.; Sonntag, F.: Charakterisierung von Protein A-spezifischen DNA-Aptameren mittels SPR. In: 11. Dresdner Sensor Symposium, 2013, ISBN: 978-3-9813484-5-3, DOI: 10.5162/11dss2013/A12

Tröger, V.; Malik, S.; Sonntag, F.; Schmieder, S.: Generation of ready-to-use SPR chips using automated nano-spotting. In: Biomed Tech 2012; 57 (Suppl. 1), DOI: 10.1515/bmt-2012-4251.

Henseleit, A.; Schmieder, S.; Sonntag, F.; Klotzbach, U.; Marx, U.; Hofmann, S.; Boschke, E.: SPR-basierte Immunosensoren - Universelles Immobilisierungsprotokoll von Antikörpern zur spezifischen Antigen-Detektion. In: Dresdner Beiträge Sensortechnik (2011), ISBN: 978-3-942710-53-4.

Henseleit, A.; Schmieder, S., Bley, T., Sonntag, F.; Schilling, N.; Quenzel, P.; Danz, N.; Klotzbach, U.; Boschke, E.: A compact and rapid aptasensor platform based on surface plasmon resonance. In: Eng. Life Sci. 2011, 11, 573–579, DOI: 10.1002/elsc.201100036

Danz, N.; Kick, A.; Sonntag, F.; Schmieder, S.; Höfer, B.; Klotzbach, U.; Mertig, M.: Surface plasmon resonance platform technology for multi parameter analyses on polymer chips. In: Eng. Life Sci. 2011, 11, 566–572, DOI: 10.1002/elsc.201000192

Eine Veröffentlichung von weiteren Teilergebnissen in wissenschaftlichen Fachjournalen ist geplant.

4 Angaben über gewerbliche Schutzrechte

Im Rahmen des Vorhabens wurden von den Projektpartnern keine Schutzrechte angemeldet oder erworben.

5 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts

Für den Nachweis von Pflanzenviren (Projektteil JKI) konnte mit der SPR-Plattform die Empfindlichkeit des DAS-ELISA als aktueller Standardmethode in der Praxis nicht erreicht werden. Damit haben sich bei dieser Pathogenklasse noch keine Transfermöglichkeiten ergeben.

Im Rahmen der vom Projektpartner IPK durchgeführten Arbeiten ließ sich anhand der erzielten Ergebnisse belegen, dass die Infektion der Kohlpflanzen mit *X. campestris* sowohl per ELISA-Assay als auch per SPR-Plattform erfolgreich nachweisbar ist. Unter optimierten Bedingungen

lassen sich mit dem SPR-Messsystem jedoch sensitivere Nachweisgrenzen erreichen, was die bevorzugte Eignung dieses Systems als On-Chip-Nachweis von phytopathogenen Bakterien belegt. Auf Basis dieser Ergebnisse wird angestrebt, in Zusammenarbeit mit der Wirtschaft (Rijk Zwaan Marne GmbH) das SPR-Messsystem zum Nachweis bakterieninfizierter Pflanzen als praxistaugliches System zu etablieren. Dazu ist geplant, noch in diesem Jahr einen Förderantrag (favorisiert wird ZIM-Förderantrag) einzureichen.

Im Rahmen der vom IWS durchgeführten Arbeiten konnte eine geschlossene Prozesskette zum Herstellen sowie automatisierten Messen und Regenerieren von SPR-Chips mit immobilisierten Antikörpern entwickelt und erfolgreich etabliert werden. Durch Austausch der immobilisierten Antikörper können schnell und einfach neue Applikationen adressiert werden.

Auf Basis dieser Ergebnisse wird angestrebt, in Zusammenarbeit mit der Wirtschaft (TissUse GmbH, ProBioGen AG, quo data GmbH) das SPR-Messsystem zum Nachweis spezifischer Marker im Zellkulturüberstand von Säugerzellkulturen sowie in humanen Serumproben als praxistaugliches System zu etablieren. Dazu sollen weitere Förderanträge gestellt werden.

6 Förderhinweis

Das IGF-Vorhaben 16816 BR der Forschungsvereinigung „Forschungsgesellschaft für Messtechnik, Sensorik und Medizintechnik e.V. Dresden (fms)“ wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.