

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

In vitro Selektion von DNA-Molekülen für Schimmelpilz-Biosensoren

Holger Kirsten, Regina Stoltenburg, Beate Strehlitz

Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Umweltbiotechnologisches Zentrum, Permoserstr.

15, D-04318 Leipzig

Tel. 0341-235-2935

strehl@san.ufz.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 307

Poster

Schimmelpilze in Innenräumen können bei den Bewohnern verschiedene Gesundheitsprobleme auslösen, wie beispielsweise Mykosen, Mykotoxikosen und Allergien [1]. Standardmethoden für die Quantifizierung und Identifizierung der Pilze sind oft zeitaufwändig und nur durch qualifiziertes Personal durchführbar. Deshalb entwickeln wir unter Nutzung des SELEX-Verfahrens ssDNA – Aptamere für die Sporen von *Aspergillus*- und *Penicillium*- Stämmen, die in Biosensoren für die Detektion von Schimmelpilzen in Innenräumen eingesetzt werden sollen. Beide Stämme gehören zu den häufig in Innenräumen auftretenden Schimmelpilzen, von denen bekannt ist, daß sie verschiedene Mykotoxine freisetzen [2].

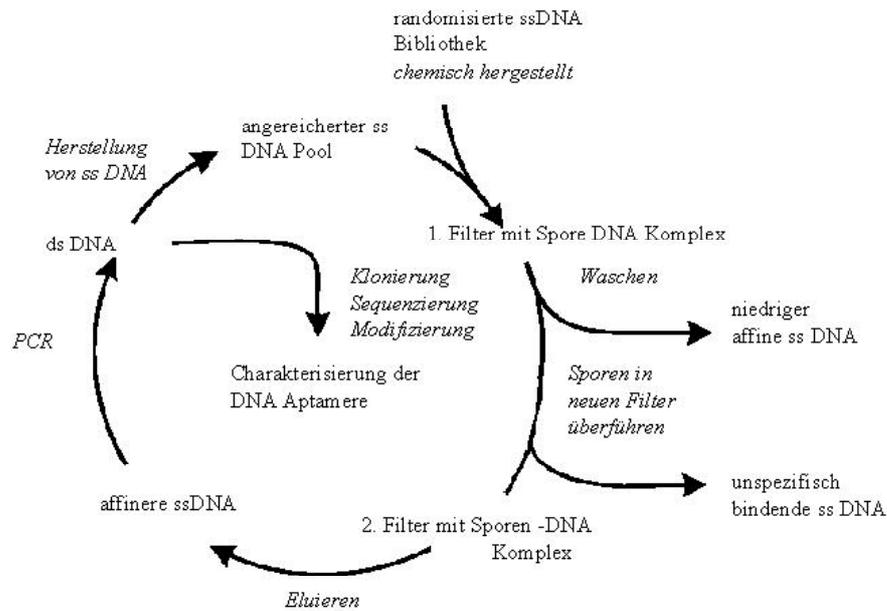


Abb. 1: SELEX-Prozess zur Gewinnung von Aptameren für Pilzsporen

Die Gewinnung von Aptameren erfolgt unter Verwendung einer evolutionären Methode, dem SELEX-Verfahren (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**xponential **E**nrichment) [Abb. 1]. Dabei werden in einem Bindungsschritt aus einem Pool verschiedenster einzelsträngiger DNA-Moleküle (ss DNA) zunächst diejenigen gewonnen, die aufgrund ihrer individuellen Struktur bevorzugt an das Zielmolekül binden. Nach ihrer Ablösung von den Zielmolekülen (intakte Sporen) werden sie mittels PCR vervielfältigt. Dabei entstehen Doppelstränge, von denen die für die Bindungsreaktion an die Zielmoleküle überflüssigen Gegenstränge abgetrennt werden müssen. Dies geschieht über die Spaltung einer Ribose-Bindung im Gegenstrang, die durch modifizierter Primer eingeführt wurde [3]. In dem auf diese Weise entstandenen Pool sind nun besser bindende ssDNA Moleküle angereichert, die für die Bindungsreaktion der nächsten Selektionsrunde zur Verfügung stehen. Dieser Prozess wird so lange wiederholt, bis keine weitere Verbesserung der Affinität erfolgt.

Die Affinität der auf diesem Wege hergestellten Aptamere wird unter Verwendung verschiedener Methoden getestet. Dazu gehören ein Standard-Filter-Bindungs-Test, eine fluoreszenzmikroskopische Methode, die Messung der Fluoreszenzdepolarisation und die Anwendung der Resonant Mirror Spektroskopie.

Literatur

- [1] Reiss, J. (1998). In: Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- [2] Larson, T.O. und Frisvad, J.C. (1994). In: Health implications of fungi in indoor environments. Air quality monographs, Vol. 2, Eds.: R.A. Samson et al. Elsevier Science B.V. Amsterdam, Netherlands, 251-279.
- [3] Hausch, F. und Jäschke, A. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 35.