

Schlussbericht

Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. (IPHT)

Vorhaben: **Validierung eines PCR basierten Lab-on-a-Chip-Systems für die Diagnose von Phytophthora-Arten (PhytoChip-Validierung)**

Förderkennzeichen: 28-1-54.082-10

Beteiligte Partner: Analytik Jena AG (AJ, Koordinator)
Julius-Kühn-Institut (JKI) für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst
Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. (IPHT)

Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2011 – 30.09.2014

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Im Fokus der Forschungsaufgaben des Leibniz-Instituts für Photonische Technologien (IPHT) Jena stand die Erforschung und Entwicklung einer chipbasierten Technologieplattform für die vor-Ort-Analyse von Pflanzenpathogenen der Gattung *Phytophthora*. Zielführend wurde im Projekt die Erfassung der gesamten Prozesskette, beginnend mit der Probenaufarbeitung bis hin zum spezifischen Nachweis erforscht. Aufbauend auf den bereits bestehenden Erfahrungen der Projektpartner wurden die einzelnen Module der Probenahme, DNA-Isolation, Vervielfältigung und Detektion gezielt aufeinander abgestimmt und in ein Gesamtkonzept für die vor-Ort-Analyse integriert.

Bei dem aktuellen Projekt handelt es sich um ein Nachfolgeprojekt des Vorhabens „Nanobiotechnologische Detektion von *Phytophthora*-Arten mittels elektronisch auslesbarer DNA-Biochips“ (BLE-Förderkennzeichen 28-1-42.027-06), in dessen Rahmen bereits ein Labormuster für ein PCR basiertes Lab-on-a-Chip(LoC)-System entwickelt wurde.

Im aktuellen Projekt lagen die Schwerpunkte von Seiten des IPHTs (1) in der Prüfung der DNA mittels PCR, (2) der Testung alternativer Chipsubstrate sowie der Herstellung neuer Chips mit entsprechenden Sonden, (3) der Erarbeitung von Protokollen für die PCR und Hybridisierung im Labormuster, (4) der Testung von Spezifität und Sensitivität der Sonden auf den Chips sowohl mit *Phytophthora*-Kulturmaterial als auch künstlich infiziertem Pflanzenmaterial, (5) der Adaption der Chip-Technologie sowie (6) der Validierung des erarbeiteten (End-) Systems hinsichtlich Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das IPHT erforscht und entwickelt innovative optische Lösungen für verschiedenste Applikationen in den Bereichen Gesundheit, Umwelt, Sicherheit, Produktion und Energie. Die im Projekt involvierte Arbeitsgruppe *Jenaer Biochip Initiative* (JBCI), eine bis 2010 vom BMBF geförderte InnoProfile-Nachwuchsgruppe ist nach Ablauf der Förderung als gemeinsame eigenständige Arbeitsgruppe am IPHT in die Forschungsabteilung „Spektroskopie/Bildgebung“ und dem IPC der FSU Jena integriert worden. Die Voraussetzung zur Durchführung des vorliegenden Verbundvorhabens stellte die von der *Jenaer BioChip Initiative* entwickelte chipbasierte Technologieplattform dar, die bereits für verschiedene Applikationen zur Identifizierung pathogener Keime eingesetzt wurde. Das Prinzip des chipbasierten elektrisch und optisch auslesbaren Nachweissystems beruht dabei auf der Immobilisierung von Fänger-molekülen auf einem planaren Chipsubstrat mit

Elektroden spaltstrukturen. An diese Sonden können komplementäre Zielmoleküle binden und anschließend über ein Enzym eine Silberabscheidung generiert werden, wodurch die biomolekulare Interaktion sowohl elektrisch als auch optisch auswertbar ist.

Weiterhin verfügt das IPHT über eine breit aufgestellte technologische Infrastruktur, die in das Projekt eingebracht wurde. Insbesondere die umfangreichen Kompetenzen und Erfahrungen auf dem Gebiet der Mikrosystemtechnik, Mikroanalytik und Fluidmanagement zur Umsetzung, Entwicklung und Erforschung bioanalytischer Laborprozesse in miniaturisierte chipbasierte Module konnten in das Forschungsvorhaben einfließen.

3. *Planung und Ablauf des Vorhabens*

Im Rahmen des Verbundvorhabens PhytoChip-Validierung wurden sowohl wissenschaftliche als auch technische Fragestellungen aus dem Bereich der Grundlagenforschung und der angewandten Forschung bearbeitet. Der Fokus der Forschungsarbeiten des IPHT lag dabei insbesondere auf den im Folgenden kurz dargestellten Aufgaben:

- Prüfung der vom JKI zur Verfügung gestellten DNA in der PCR (Kulturisolate und künstlich infiziertes Pflanzenmaterial)
- Testung unterschiedlicher Chipsubstrate, Modifikationen des Chip-Layouts, Herstellung neuer Chips mit den entsprechenden Sonden
- Erarbeitung von Protokollen für verschiedene PCR-Module (Thermocycler, Kartusche)
- Erarbeitung eines optimalen Protokolls für die Hybridisierung, Enzymbindung und Silberabscheidung
- Testung der Spezifität und Sensitivität der Fängersonden im LoC-Labormuster mit PCR-Produkten verschiedener Kulturisolate
- Testung der Spezifität und Sensitivität der Fängersonden im LoC-Labormuster mit PCR-Produkten aus infiziertem Pflanzenmaterial
- Validierung des auf der Grundlage des Labormusters von der Analytik Jena AG zur Verfügung gestellten (vorläufigen) Endgerätes

4. *Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde*

Eine der wichtigsten phytopathogenen Mikroorganismen an Gehölzen in der Baumschule, in der freien Landschaft und in Waldgebieten sind die Arten aus der Gattung *Phytophthora*. In dieser Gattung wurden bereits mehrere Arten EU-weit geregelt und unter Quarantäne gestellt (http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/alert_list.htm). Die artspezifische Diagnose von *Phytophthora*-Arten erfolgt zurzeit hauptsächlich mit PCR-Methoden (konventionell und real time PCR) (Kox et al. 2007; Minerdi et al. 2008; Montenegro et al.

2008; Nevoigt, Oszako, and Nowakowska 2010; Schena, Hughes, and Cooke 2006). Diese Diagnosetechniken sind schnell, und empfindlich, benötigen jedoch speziell ausgerüstete Labore und Fachpersonal. Für die Pflanzenproduzenten ergeben sich dadurch oft lange Wartezeiten, was wirtschaftlich oft unrentabel ist.

Neue Analysetechniken, die einen vor Ort Einsatz ermöglichen stellen Biochips (z.B. DNA-Mikroarrays) dar. Zur Detektion und Identifikation von Schadorganismen sind bereits unterschiedliche Konzepte in der kürzeren Vergangenheit beschrieben worden. Sie wurden bisher vor allem für die Diagnose in der Humanmedizin entwickelt (Bavykin et al. 2008; Bier et al. 2008; Jain 2002; Judelson et al. 2009; Judelson et al. 2008; Khodakov et al. 2008; Lievens et al. 2006; Mikhailovich et al. 2008; Schlink 2010; von Nickisch-Roseneck et al. 2008; Yoo et al. 2009).

In Rahmen des Vorgängerprojektes PhytoChip (BLE, Förderkennzeichen: 28-1-42.027-06) wurde die prinzipielle Machbarkeit eines PCR-basiertes Lab-on-a-Chip-System erforscht (Julich et al. 2011). Um dieses Labormuster jedoch für die vor-Ort-Diagnostik einzusetzen, sind noch umfangreiche Forschungs- und Validierungsarbeiten notwendig, die vor allem den gesamten Analyseprozess von der Probenvorbereitung bis zur Detektion abdecken. Darüber hinaus sind Testungen zur Spezifität und Sensitivität mit *in vitro* Material und verschiedenen pflanzlichen Geweben notwendig.

a) Bekannte Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

Für die Entwicklung der Nachweisttechnologien wurden bereits eine Vielzahl interdisziplinärer Forschungen am IPHT durchgeführt, die sich unter anderem mit der Untersuchung kostengünstiger Chipsubstrate (Glaschips mit Siebdruckelektroden (Schüler, Asmus, et al. 2009), Polymere, Polymerfolien (Péter et al. 2009)), chemisch und biologischer Oberflächenmodifizierungen (Schüler, Nykytenko, et al. 2009), alternativen Markierungsverfahren und der Miniaturisierung und Automatisierung des Analysenprozesses (Schüler et al. 2009; Seise et al. 2011) beschäftigten. Darüber hinaus ist das IPHT Inhaber des deutschen (DE 19860547) und des internationalen Patentes (WO 00739325) für einen Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse und dessen Verwendung. Diese Patente bilden die Grundlage des entwickelten Chipsystems.

Die gewonnenen umfangreichen Kenntnisse und Erfahrungen aus vorangegangenen Projekten wie Phyto Chip (BLE-FKZ:28.1.42.027 06) und ATLAS (VDI-FKZ:13N9519) flossen in die zu bearbeitenden Arbeitsaufgaben ein.

b) Verwendete Fachliteratur/ benutzte Informations- und Dokumentationsdienste

Im Folgenden ist eine Auswahl der verwendeten Fachliteratur dargestellt.

- Bavykin, S. G., V. M. Mikhailovich, V. M. Zakharyev, Y. P. Lysov, J. J. Kelly, O. S. Alferov, I. M. Gavin, A. V. Kukhtin, J. Jackman, D. A. Stahl, D. Chandler, and A. D. Mirzabekov. 2008. *Chemico-Biological Interactions* 171 (2):212-235.
- Bier, F. E., M. von Nickisch-Rosenegk, E. Ehrentreich-Forster, E. Reiss, J. Henkel, R. Strehlow, and D. Andresen. 2008. *Biosensing for the 21st Century* 109:433-453.
- Boissinot K, Huletsky A, Peytavi R, Turcotte S, Veillette V, Boissinot M, Picard FJ, Martel EA, Bergeron MG. 2007. *Clin Chem* 53(11):2020–2023.
- Brasier C, Webber J. 2010. *Nature* 466(7308):824–825.
- O'Brien PA, Williams N, Hardy GES. 2009. *Crit Rev Microbiol* 35(3):169–181.
- Brinker A, Schulze H, Bachmann T, Moeller R .2010. *Biosens Bioelectron* 26(2):898–902.
- de Cock, Awam, and C. A. Levesque. 2004. *Studies in Mycology* (50):481-487.
- Jain, Kewal K. 2002. *Trends in Biotechnology* 20 (5):184-185.
- Judelson, H. S., R. D. Narayan, A. M. V. Ah-Fong, and K. S. Kim. 2009. *Molecular Genetics and Genomics* 281 (2):193-206.
- Judelson, H. S., A. M. V. Ah-Fong, G. Aux, A. O. Avrova, C. Bruce, C. Calkir, L. da Cunha, L. Grenville-Briggs, M. Latijnhouwers, W. Ligterink, H. J. G. Meijer, S. Roberts, C. S. Thurber, S. C. Whisson, P. R. J. Birch, F. Govers, S. Kamoun, P. van West, and J. Windass. 2008. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (4):433-447.
- Julich S, Riedel M, Kielpinski M, Urban M, Kretschmer R, Wagner S, Fritzsche W, Henkel T, Moller R, Werres S. 2011. *Biosens Bioelectron* 26(10):4070–4075.
- Khodakov, D. A., N. V. Zakharova, D. A. Gryadunov, F. P. Filatov, A. S. Zasedatelev, and V. M. Mikhailovich. 2008. *Biotechniques* 44 (2):241-+.
- Kox, L. F. F., I. R. van Brouwershaven, B. T. L. H. van de Vossenbergh, H. E. van den Beld, P. J. M. Bonants, and J. de Gruyter. 2007. *Phytopathology* 97 (9):1119-1129.
- Lazcka O, Del Campo FJ, Munoz FX. 2007. *Biosens Bioelectron* 22(7):1205–1217.
- Lévesque, André C., and Arthur W. A. M. De Cock. 2004. *Mycological Research* 108 (12):1363-1383.
- Lievens, B., L. Claes, A. C. R. C. Vanachter, B. P. A. Cammue, and B. P. H. J. Thomma. 2006. *Fems Microbiology Letters* 255 (1):129-139.
- Marimuthu C, Tang T-H, Tominaga J, Tan S-C, Gopinath SCB. 2012. *Analyst* 137(6):1307–1315.
- Martin FN, Abed ZG, Baldi Y, Ivors K. 2012. *Plant Dis* 96(8):1080–1103.
- Mikhailovich, V., D. Gryadunov, A. Kolchinsky, A. A. Makarov, and A. Zasedatelev. 2008. *Bioessays* 30 (7):673-682.

- Minerdi, D., M. Moretti, Y. Li, L. Gaggero, A. Garibaldi, and M. L. Gullino. 2008. *European Journal Of Plant Pathology* 122 (2):227-237.
- Montenegro, D., O. Aguin, C. Pintos, M. J. Sainz, and J. P. Mansilla. 2008. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6 (1):78-84.
- Nevoigt, F., T. Oszako, and J. A. Nowakowska. 2010. *Sylwan* 154 (7):450-455.
- Pierce KE, Sanchez JA, Rice JE, Wangh LJ. 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24):8609–8614.
- Peytavi R, Tang LY, Raymond FR, Boissinot K, Bissonnette L, Boissinot M, Picard FJ, Huletsky A, Ouellette M, Bergeron MG. 2005. *Biotechniques* 39(1):89–96.
- Peter M, Schuler T, Furthner F, Rensing PA, Heck van GT, Schoo HFM, Möller R, Fritzsche W, Breemen van AJJM, Meinders ER. 2009. *Langmuir* 25 (9): 5384–5390.
- Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE, Wangh LJ. 2009. (vol 101, pg 1933, 2004). *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6):2083.
- Seise B, Brinker A, Kretschmer R, SchwarzM, Rudolph B, Kaulfuss T, Urban M, Henkel T, Popp J, Moeller R. 2011. *Eng Life Sci* 11(2):148–156.
- Schueler T, Asmus T, FritzscheW, Moeller R. 2009. *Biosens Bioelectron* 24(7):2077–2084.
- Schueler T, Kretschmer R, Jessing S, Urban M, FritzscheW, Moeller R, Popp J. 2009. *Biosens Bioelectron* 25(1):15–21. doi:10.1016/j.bios.2009.05.040
- Schueler T, Nykytenko A, Csaki A, Moeller R, FritzscheW, Popp J. 2009. *Anal Bioanal Chem* 395(4):1097–1105.
- Schena, L., K. J. D. Hughes, and D. E. L. Cooke. 2006. *Molecular Plant Pathology* 7 (5):365-379.
- Schlink, K. 2010. *Functional & Integrative Genomics* 10 (2):253-264.
- von Nickisch-Rosenegk, M., X. Marschan, D. Andresen, and F. F. Bier. 2008. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (5):1671-1678.
- Webber, J. F., M. Mullett, and C. M. Braisier. 2010. *New Disease Reports* 22:19.
- Wilson R. 2011. *Nucleic Acid Ther* 21(6):437–440. doi:10.1089/nat.2011.0322
- Yoo, S. M., J. H. Choi, S. Y. Lee, and N. C. Yoo. 2009. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (7):635-646.

Verwendete Informations- und Dokumentationsdienste:

Bezeichnung	URL
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Web of Science	http://apps.isiknowledge.com/
Science Direct	http://www.sciencedirect.com/
Elektronische Zeitschriftenbibliothek	http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit den beiden Kooperationspartnern Julius Kühn-Institut (JKI), Braunschweig und der Analytik Jena AG (AJ), Jena durchgeführt. Das JKI stellte die DNA aus Kulturoisolen und künstlich infiziertem Pflanzenmaterial zur Verfügung (DNA-Extraktion und Probenaufarbeitung). Darüber hinaus wurden die spezifischen Primer und Sonden in Zusammenarbeit mit dem JKI erforscht. Gemeinsam mit der Analytik Jena AG wurden Konzepte zur Miniaturisierung und Automatisierung erarbeitet und technisch umgesetzt.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Im Fokus der Forschungsaufgaben des Leibniz-Instituts für Photonische Technologien (IPHT) Jena stand die Entwicklung und Validierung einer chipbasierten Technologieplattform für die vor-Ort-Analyse von pflanzlichen Schadorganismen, insbesondere verschiedener *Phytophthora*-Arten. Zielführend wurde im Projekt die Erfassung der gesamten Prozesskette (Abb. 1) erforscht. Aufbauend auf den bereits bestehenden Erfahrungen der Projektpartner wurden die einzelnen Module der Probenahme, DNA-Isolierung, Amplifikation und Detektion gezielt angepasst und in ein Gesamtkonzept integriert. Im Folgenden sind die wesentlichen erzielten Ergebnisse der Arbeiten des IPHT dargestellt.

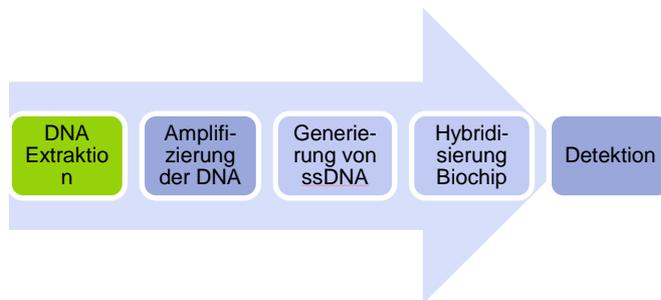


Abbildung 1: Prozesskette für die Vor-Ort-Analyse von *Phytophthora* spp.

Arbeitspaket 1 – Entwicklung spezifischer Gensonden

Die Auswahl und Entwicklung spezifischer Gensonden zum sequenzspezifischen Nachweis verschiedener *Phytophthora*-Arten erfolgte am JKI in Braunschweig nach der EPPO Alert bzw. A2 Liste. Zusätzlich zu den laut EPPO geregelten Arten wurden *P. cinnamomi*, *P. cambivora* und *P. austrocedrae* in die Untersuchungen einbezogen.

Nach umfassender Betrachtung verschiedener möglicher Zielregionen zur Unterscheidung der *Phytophthora*-Arten wurde das GTP-Bindungsprotein *YPT1* als Zielregion für die Etablierung des sequenzspezifischen chipbasierten Nachweissystems festgelegt. Darauf aufbauend hat das JKI den Partnern universale Primer-Sequenzen sowie Fängersonden bereitgestellt.

Ausgewählte *Phytophthora*-Arten:

P. rubi, *P. lateralis*, *P. ramorum*, *P. pinifolia*, *P. fragariae*, *P. kernoviae*, *P. cinnamomi*, *P. cambivora*, *P. austrocedrae*

Prüfung der DNA in der PCR

Die vom JKI sowohl aus Kulturoisolationen als auch aus künstlich infiziertem Pflanzenmaterial isolierte DNA verschiedener *Phytophthora*-Arten wurde dem IPHT zur Erforschung und Optimierung der Nachweismethoden zur Verfügung gestellt. Die Durchführung des chipbasierten DNA-Nachweises erfordert eine vorherige Vervielfältigung der isolierten Erreger-DNA mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Daher wurden am IPHT umfassende Arbeiten zur Optimierung der PCR durchgeführt. Nach umfangreichen Untersuchungen stellte sich eine asymmetrische Form der PCR, die LATE-PCR (Linear-After-The-Exponential-PCR) zur Vervielfältigung der Erreger-DNA als effiziente Methode heraus. Dabei wird neben der Vervielfältigung ausreichender DNA-Mengen gleichzeitig einzelsträngige DNA generiert, welche für eine anschließende Hybridisierung auf dem Biochip essentiell ist. Mit Hilfe der etablierten LATE-PCR konnte zuverlässig und aus kleinsten Erregermengen eine nachweisbare Konzentration an DNA erhalten werden. Die erfolgreiche Amplifikation der DNA wurde zunächst mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. In Abb. 2 ist exemplarisch ein Gelbild der neun zu untersuchenden Arten dargestellt. Darauf sind deutlich die für eine asymmetrische PCR charakteristischen Doppelbanden für die doppel (450bp) - und einzelsträngige (450nt) DNA zu erkennen.

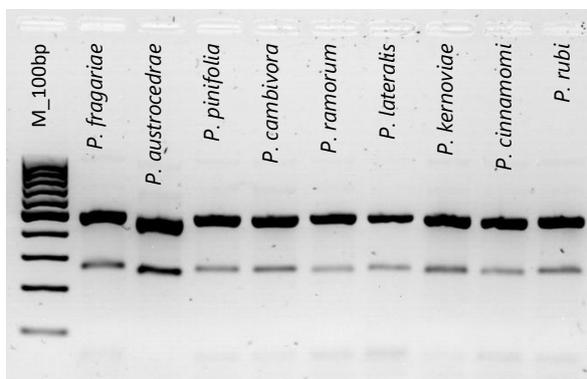


Abbildung 2: Geldokumentation der erhaltenen DNA-Amplifikate untersuchter *Phytophthora* spp.

Arbeitspaket 2 – Chip Design/Herstellung

PCR-Modul:

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde parallel zu der am IPHT bereits im Vorgängerprojekt entwickelten chipbasierten PCR-Plattform in Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG ein Kartuschensystem erfolgreich etabliert. Eine Amplifizierung der DNA unterschiedlicher *Phytophthora*-Arten aus Kulturoisolationen konnte erfolgreich mit Hilfe der Gelelektrophorese (Abb. 3) nachgewiesen werden.

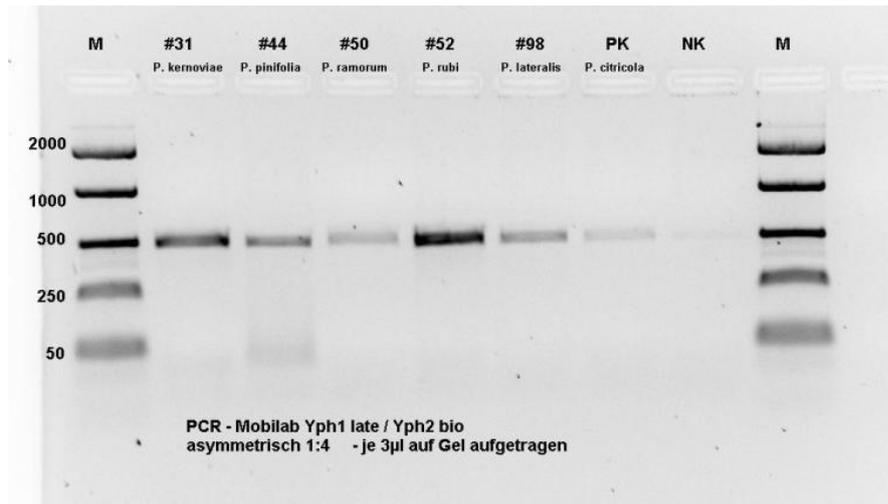


Abbildung 3: Gelbild zur Vervielfältigung der Zielarten in der von der AJ entwickelten PCR-Kartusche

Zur erfolgreichen Durchführung der unter Arbeitspaket 1 dargestellten asymmetrischen PCR für den vor Ort Einsatz, musste diese jedoch erheblich verkürzt werden. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Hot Start *Taq*-Polymerasen in der PCR getestet. Verschiedene Parameter, unter anderem die DNA-Konzentration, die Primer-Konzentration, das Primer-Verhältnis sowie die Elongationszeit wurden variiert. Schließlich konnte die innuTaq HOT-A DNA Polymerase der Analytik Jena AG erfolgreich für die Anwendung im Kartuschensystem adaptiert werden. In Abb. 4 ist exemplarisch die erfolgreiche Durchführung der PCR aus isoliertem Pflanzenmaterial im Vergleich Kartusche und konventionelles Gerät (Thermocycler) dargestellt.

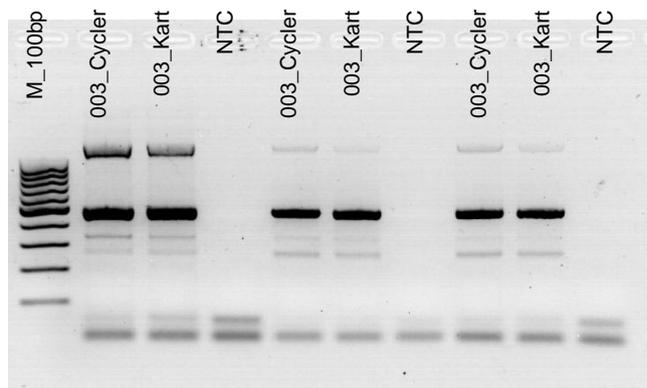


Abbildung 4: Geldokumentation der vervielfältigten PCR-Produkte im Cycler und parallel in der Kartusche

Die Ergebnisse der PCR in dem vor-Ort anwendbarem Modul (PCR-Kartusche) sind vergleichbar mit denen im konventionellen Cycler und belegen die Eignung der modularen Plattform zur Integration in das portable Lab-on-a-Chip-System. Das am IPHT optimierte Protokoll für eine schnelle und effiziente PCR wurde den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

Darüber hinaus wurden am IPHT der Einsatz und das Potential isothermaler Amplifikationsmethoden, wie die Helikase-abhängige Amplifikation (HDA) erfolgreich untersucht. In Zusammenarbeit mit dem JKI wurden für drei ausgewählte *Phytophthora*-Arten (*P. ramorum*, *P. lateralis*, *P. kernoviae*) spezielle Primer designt. Des Weiteren wurde ein vereinfachtes Chipmodul zur Durchführung der isothermalen Amplifikation in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Thomas Henkel erforscht.

Hybridisierungs-Chip:

Ein wesentlicher Schwerpunkt der Arbeiten am IPHT lag auf der Erforschung einer sequenzspezifischen Nachweismethode der DNA. Umfangreiche Untersuchungen erfolgten hierbei zunächst auf den am IPHT bereits etablierten funktionalisierten Glaschips mit aufgedruckten Goldelektroden (*affinity chips with electrical detection (ACED)*, Fa. Heraeus). Auf diesen 12,7 mm × 12,7 mm großen Glaschips stehen 42 Messplätze für die verschiedenen Fängersonden zur Verfügung. Die Oberfläche der Glaschips wurde am IPHT zur Anbindung der entsprechenden Gensonden spezifisch funktionalisiert. Das Aufbringen der Fängersonden wurde unter Verwendung des Nano Plotter 2.1 der Firma GeSIM realisiert. Die Konzentration der Fängersonden auf der Chipoberfläche wurde nach umfangreichen Testreihen auf 20 µM festgelegt. Das finale Chip-Design mit den ausgewählten Gensonden ist in Abb. 5 dargestellt. Eine Erhöhung der Feldtauglichkeit wurde durch Aufbringen entsprechender Kontrollmechanismen auf dem Chip eingeführt, um die einzelnen Prozessschritte im Nachgang überprüfen zu können und gegebenenfalls auftretende Fehler zu identifizieren. Hierzu wurden neben den Fängersonden für jede zu untersuchende Zielart, eine *Phytophthora*-Gattungskontrolle sowie eine PCR-Kontrolle mit einer pflanzenspezifischen Sonde immobilisiert. Das entsprechende Design der Sonden erfolgte am JKI und wurde dem IPHT zur Verfügung gestellt.

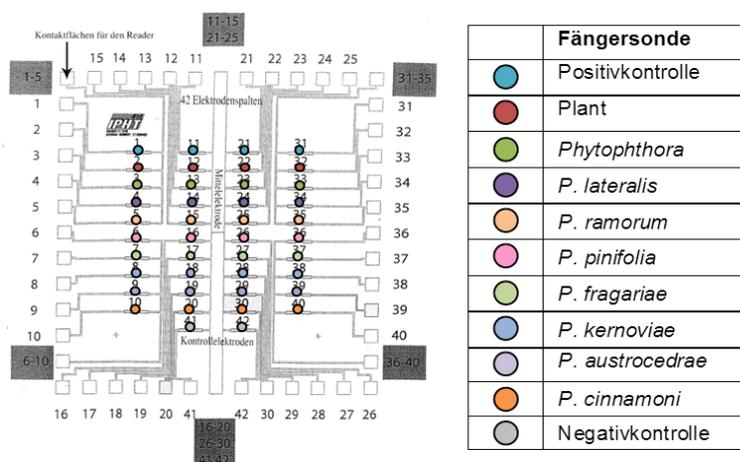


Abbildung 5: Finales Chip-Design mit entsprechenden Gensonden

Zur besseren Darstellung der einzelnen Prozessschritte für eine chipbasierte Analyse sind diese in Abb. 6 in Form eines Ablaufschemas dargestellt. Die Prozessschritte 1-5 umfassen dabei die chemische Funktionalisierung der Oberfläche mit anschließender Immobilisierung der spezifischen Sonden. Die Analyse des Probenmaterials erfolgt in den Arbeitsschritten 6-9.



Abbildung 6: Ablaufschema der einzelnen Prozessschritte zur DNA-Chip-Analyse

Ein wesentlicher Schwerpunkt der Arbeiten am IPHT lag auf der Optimierung der on-chip-Hybridisierung, Enzymanbindung und Silberabscheidung für eine schnelle, einfache und wenig störanfällige Anwendung vor Ort.

Zunächst wurde eine geeignete Hybridisierungstemperatur, bei der alle zu untersuchenden *Phytophthora*-Arten gleich gut detektiert werden können, experimentell mit 58 °C bestimmt.

Weiterhin wurden umfangreiche Untersuchungen zur Generierung einzelsträngiger DNA durchgeführt. Für eine erfolgreiche Hybridisierung der Proben mit den Fängersonden auf dem Chip ist es notwendig, gezielt einzelsträngige DNA aus den doppelsträngigen PCR-Produkten herzustellen. Neben klassischen Verfahren (Hitzenaturierung bei 95 °C) wurden alternative Ansätze (λ -Exonuklease Verdau, Einsatz von Natronlauge, asymmetrische PCR, LATE-PCR) getestet. Mittels aller untersuchter Methoden (asymmetrische PCR, LATE-PCR, λ -Exonuklease Verdau und NaOH-Denaturierung am Magnetpartikel) konnte erfolgreich einzelsträngige, biotinylierte DNA generiert und auf dem Chip hybridisiert werden. Die erzielten Ergebnisse zur Erzeugung einzelsträngiger DNA sowie dem anschließenden chipbasierten Nachweis sind in Abb. 7 exemplarisch für *P. kernoviae* dargestellt. In umfangreichen Untersuchungen konnte am IPHT der chipbasierte DNA-Nachweis sequenzspezifisch für alle ausgewählten Erreger durchgeführt werden.

Die favorisierten Methoden, welche möglichst einfach und wenig störanfällig für die Anwendung des Systems direkt vor Ort sind, sind die asymmetrische und LATE-PCR. Diese

ermöglichen, dass der zur Analyse notwendige DNA-Strang bereits während der PCR durch einen Überschuss eines Primers bevorzugt vervielfältigt wird. Diese Ergebnisse wurden zudem in einer Publikation veröffentlicht (Schwenkbier *et al.*, 2014, *Microchimica Acta*).

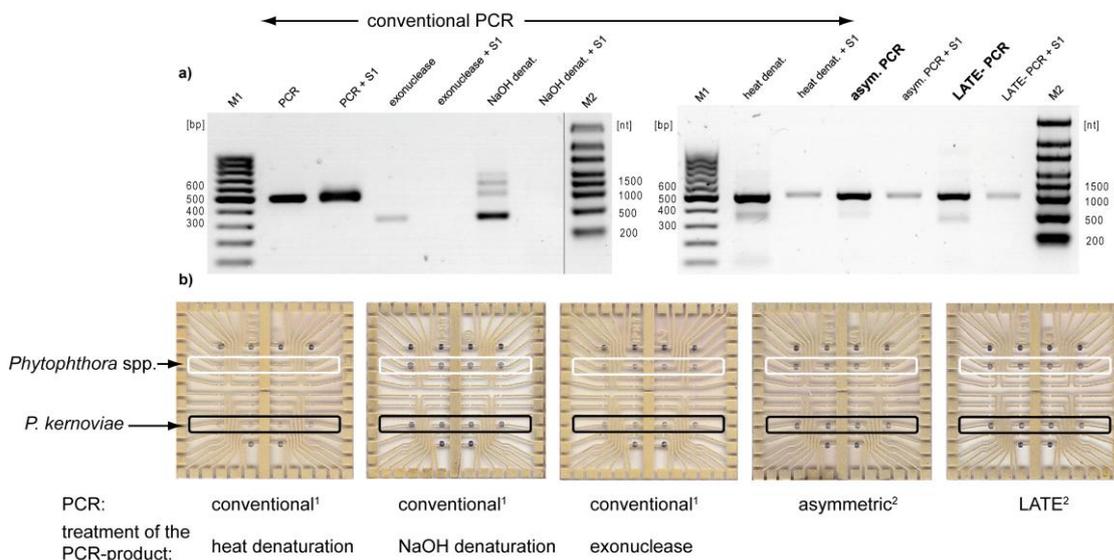


Abbildung 7: Prüfung der generierten einzelsträngigen DNA auf einem Agarosegel und Veranschaulichung der Hybridisierungseffizienz auf den Biochips (Schwenkbier *et al.*, 2014, *Microchimica Acta*)

Am IPHT wurde darauf aufbauend ein Standardprotokoll für die PCR sowie die darauffolgende Chiphybridisierung erarbeitet/optimiert und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

Neben den Untersuchungen auf den Glaschips wurden in enger Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG alternative Materialien, wie z.B. Polycarbonat (PC), Polypropylen (PP) und Leiterplattenmaterialien als Substrat für die Hybridisierungschips getestet.

Erfolgsversprechend stellte sich dabei heraus, dass durch den Einsatz von Polymerchips die zeitaufwendigen Prozessschritte 1-3 der Analysemesskette (Abb. 6) zur Funktionalisierung der Chipoberfläche entfallen können. Weiterhin wird nach umfangreichen Hybridisierungsversuchen PP neben den bereits etablierten Glaschips als alternatives Substrat favorisiert.

Fluidikkomponente:

Ein weiterer wesentlicher Schwerpunkt für die erfolgreiche Einbettung des Chipmoduls in das Gesamtsystem ist die Reduzierung der notwendigen Analyseschritte. Im Fokus der Forschungsarbeiten am IPHT stand hierbei insbesondere die zeitliche Optimierung des Protokolls für die Hybridisierung, Enzymanbindung und Silberabscheidung.

Im Einzelnen wurden folgende Prozessschritte betrachtet:

1. verkürzten Inkubationszeiten
2. Enzym gelöst in BSA → kein zusätzlicher Blockschrift notwendig
3. neue Waschlösungen - PBST als Waschpuffer nach der Hybridisierung → weniger Reagenzien notwendig
4. Kombination aller Optimierungen

Im Ergebnis konnte die tatsächliche Analysezeit auf 28 min reduziert werden.

Die optimierte, mikrofluidische Durchflusskammer, sowie die Pumpe, ein Heizgerät und die entsprechende Software wurden allen Partnern zur Verfügung gestellt und in regelmäßigen Abständen überprüft, um eine vergleichbare Funktionalität zu gewährleisten.

Herstellung neuer Chips mit entsprechenden Gensonden:

Als mögliche Alternative zu den Glaschips mit aufgedruckten Goldelektroden (ACED-Chips, Fa. Heraeus) wurden verschiedene Polymermaterialien, wie z.B. Polycarbonat und Polypropylen sowie Leiterplattenmaterialien untersucht. In Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG wurden entsprechende Chiplayouts entworfen und die entsprechenden Elektrodenstrukturen auf die Chipmaterialien aufgebracht, die eine optische und elektrische Auslese ermöglichen. In umfangreichen Untersuchungen wurden die Materialien am IPHT hinsichtlich ihrer Eignung für die chipbasierte Analyse auf Sensitivität und Spezifität geprüft. Die Chips mit den immobilisierten Gensonden wurden den Projektpartnern während der gesamten Projektlaufzeit entsprechend zur Verfügung gestellt. Zuvor wurde die Qualität der gespotteten Chips, v.a. die korrekte Spotposition, optisch kontrolliert.

Arbeitspaket 3 – Testung der Spezifität und Sensitivität mit *in vitro* Material

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurden am IPHT in Zusammenarbeit mit dem JKI umfassende Studien zur Spezifität der Sonden und Sensitivität des Systems durchgeführt. Hierzu wurden 34 weitere Arten der Gattung *Phytophthora*, sowie *Phytophthora sindhum*, *Pythium aphanidermatum* und *Pythium ultimum* getestet. Die entsprechende DNA wurde vom JKI in Braunschweig zur Verfügung gestellt. In umfangreichen Testreihen wurden am IPHT für alle Erreger eine LATE-PCR durchgeführt und die erhaltenen PCR-Produkte anschließend auf den Biochips analysiert. Erfolgreich konnte dabei das Ergebnis erhalten werden, dass keine unspezifischen oder falsch positiven Ergebnisse auf den Chips nachgewiesen werden. Die Prozesskontrollen, Positivkontrolle (=bestätigt Funktionalität von Enzymanbindung und Silberabscheidung) und das spezifische Signal für die Gattungssonde waren bei allen 40 untersuchten *Phytophthora*-Arten sichtbar. In Abb. 8 sind exemplarisch

die Ergebnisse für *P. cinnamomi* und *P. citrophthora*. Die chipbasierte Analyse konnte erfolgreich und spezifisch für alle Arten durchgeführt werden.

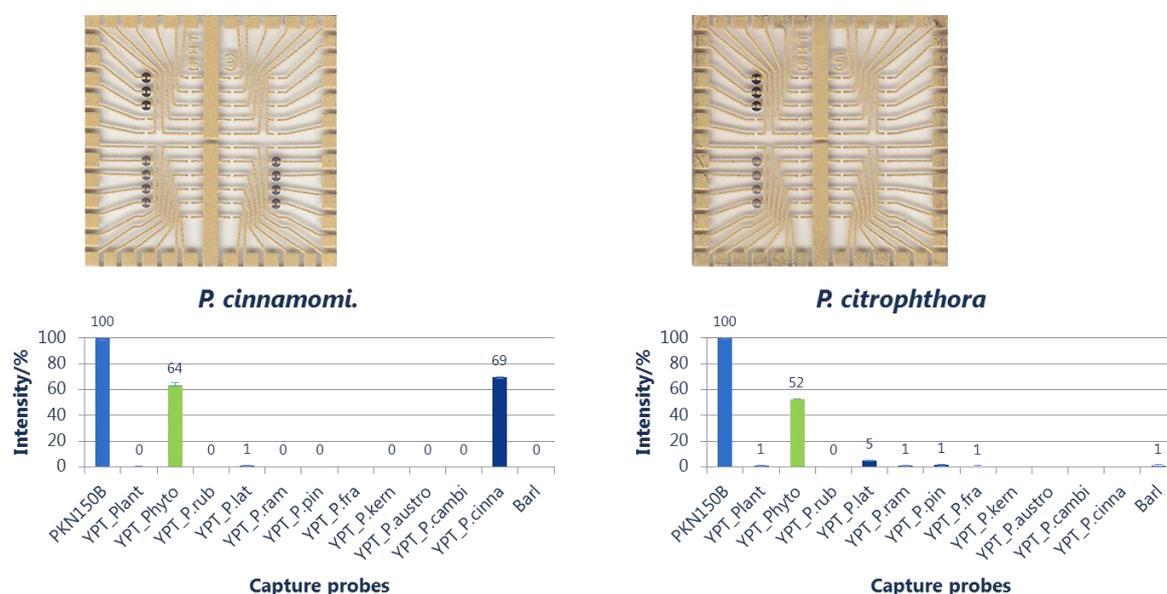


Abbildung 8: Chipbasierter Nachweis von *P. cinnamomi* und *P. citrophthora* und die entsprechende Grauwertanalyse

Bezüglich der Sensitivität ist ein sicherer Nachweis der Zielarten bis zu einer DNA Konzentration von $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ möglich. Es hat sich jedoch im Laufe der Untersuchungen gezeigt, dass die Nachweisgrenzen je nach Art variieren, so dass sich für einige Arten (*P. lateralis*, *P. cinnamomi*, *P. austrocedrae*) auch bei einer Konzentration von $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ noch Signale detektieren lassen. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse zur Spezifität ist in König et al. 2015 *Plant Pathology* veröffentlicht.

Arbeitspaket 4 – Testung der Spezifität und Sensitivität mit pflanzlichen Material

Dem IPHT wurde vom JKI DNA von *P. ramorum* und *P. kernoviae*, isoliert aus künstlich mit diesen Arten infiziertem pflanzlichem Material (Blatt, Pflanzenart: *Rhododendron* spp.), zur Verfügung gestellt. Die chipbasierte Analyse konnte unter Verwendung der LATE-PCR erfolgreich für diese beiden Arten durchgeführt werden. Anhand der vorliegenden Grauwertanalyse (Abb. 9) konnte die hohe Spezifität der erforschten Chip-Plattform für infiziertes Pflanzenmaterial ebenfalls erfolgreich untersucht werden. Die sehr geringen Hintergrundsignale zeigen die hohe Qualität der erforschten Plattform.

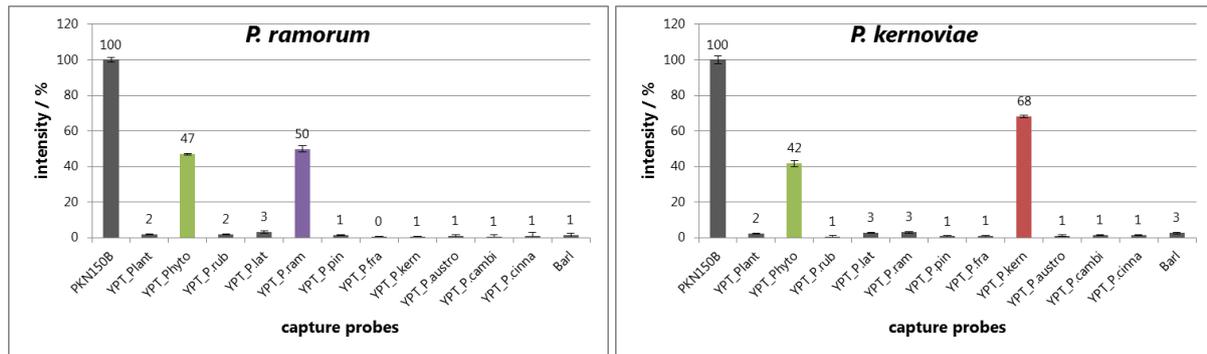


Abbildung 9: Grauwertanalyse des chipbasierten Nachweises von *P. ramorum* und *P. kernoviae* isoliert aus künstlich mit diesen Arten infiziertem pflanzlichem Material

Arbeitspaket 5 – Probenaufarbeitung und Kitchemie

Das JKI hat in Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG zahlreiche Probenaufarbeitungsstrategien zur erfolgreichen DNA-Isolation erforscht. Diese sind im Einzelnen den entsprechenden Berichten der Partner zu entnehmen. Die erfolgreiche Testung der Spezifität und Sensitivität der aufgearbeiteten Proben mit Hilfe der etablierten chipbasierten Plattform konnte am IPHT durchgeführt werden. Die erzielten Ergebnisse zur Testung von *in-vitro* Material sind in Arbeitspaket 3 sowie von pflanzlichem Material in Arbeitspaket 4 gezeigt.

Arbeitspaket 6 – Miniaturisierung und Automatisierung

Erarbeitung/ Bewertung von Konzepten zur Miniaturisierung:

In enger Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG wurde an der Konzeption und Umsetzung des Gesamtsystems gearbeitet. Zur Integration der elektrischen Auslese wurde ein kommerziell verfügbarer Standard-Sockel mit 44 Pins, der sich durch Stabilität und einfache Handhabung auszeichnet ausgewählt und in ein mikrofluidisches Durchflusssystem integriert. Darauf aufbauend wurden entsprechende Anpassungen der Chipgröße und des Chiplayouts sowie des Fluidiksystems vorgenommen und die elektrische Ausleseeinheit entwickelt.

Technische Umsetzung der Konzeption:

Der gesamte chipbasierte Assay ist in diesem Standard-Sockel des Herstellers Yamaichi (Teile Nummer IC51-0444-400) realisiert worden. Umfangreiche Tests zum fluidischen Handling sowie zur Realisierung des Assays wurden erfolgreich durchgeführt. Im Einzelnen wurden im Rahmen der Arbeiten am IPHT folgende technische Details umgesetzt: Das Chip-Layout wurde so gestaltet, dass die 44 elektrischen Kontakte an den Außenseiten des Chips passend liegen. Es wurden zunächst drei unterschiedliche Layouts generiert, um unterschiedliche elektrische Messverfahren zu testen. Allen gemein ist die Verwendung

zweier gegenüberliegender Pins als Masse. Dies ermöglicht im automatisierten Betrieb einen Test, ob ein Chip eingelegt ist, welcher Typ von Chip verwendet wird (Unterschiede in den elektrischen Widerständen) und ob die elektrischen Kontakte hergestellt sind. Basierend auf den Erfahrungen des IPHT wurde im Yamaichi-Sockel eine fluidische Kammer integriert, wobei darauf geachtet wurde, mögliche Kontaminationen von Probe zu Probe zu vermeiden. Für den Aufbau des fluidischen Systems wurden daher Polymerdichtungen auf Basis von Polydimethylsiloxan (PDMS) mit Kanal- und Halbkanalstrukturen realisiert. Diese kostengünstig herstellbaren Strukturen können nach jeder durchgeführten Analyse durch neue ersetzt werden, wodurch eine Verschleppung von Probenmaterial verhindert wird. Weiterhin wurde ein Gerät zur elektrischen Auslese (Widerstandsmessung, Gleichstrom) auf Basis vorhandener Erfahrungen erstellt und erfolgreich getestet.

Testung und Überarbeitung der ersten Musterlösung:

Im Rahmen des Vorhabens wurden unterschiedliche Chipmaterialien (z.B. Glas, PC, PP, Leiterplattenmaterialien), vor allem zur Optimierung der elektrischen Auslese untersucht. Nach umfassenden Testreihen stellte sich heraus, dass PC nur nach entsprechender Vorbehandlung wie Tempern und/oder Plasmabehandeln brauchbare Ergebnisse hinsichtlich der elektrischen Auslese liefert. Außerdem war keine hinreichende Reproduzierbarkeit der Resultate von Chip zu Chip gegeben. Vielversprechend erschien Polypropylen (PP), welches in Vorversuchen beständig gute Ergebnisse erzielte. Zusätzlich wurden Versuche mit Leiterplatten (FR4 und chemisch vergoldeten Leiterbahnen) durchgeführt.

Des Weiteren wurde die mikrofluidische Kammer getestet, um einen einfachen und robusten Assay-Ablauf zu gewährleisten. Zur eigenen Herstellung der Dichtelemente aus PDMS wurde eine entsprechende Gußform erstellt, welche an der Chip-Seite einen Mäander-Kanal besitzt, durch den die Flüssigkeiten über die Gaps mittels einer externen Pumpe befördert werden können. Die Zuleitung der Flüssigkeiten erfolgt über die Rückseite der PDMS-Dichtungen. Die Herausforderung bestand darin, dass durch den begrenzten Anpressdruck des Sockel-Deckels gleichzeitig die elektrischen Kontakte hergestellt werden und die Mikrofluidik abgedichtet wird. Hier wurden 200 µm hohe Dichtlippen eingeführt, die den Kanal-Bereich separat abdichten. Dadurch konnte der zur Dichtung notwendige Anpressdruck reduziert und eine Verformung des gesamten PDMS-Blocks vermieden werden. Weiterhin ist durch die Flexibilität des PDMS eine einfache Adaption an unterschiedliche Chipmaterialien gegeben.

Im Hinblick auf die Optimierung der elektrischen Auslese wurde festgestellt, dass während der Bildung der Silbernanopartikel, bei einer zu hohen Messspannung von $>0,8$ V, eine autokatalytische unspezifische Silberabscheidung stattfindet. Ferner konnte gezeigt werden, dass zu hohe Messströme (>1 mA) und zu hohe Messspannungen ($> 1V$) eine Veränderung

der Silbernanopartikel verursachen. Diese Erkenntnisse wurden im aktuellen Gesamtsystem, welches in Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG entstand, berücksichtigt. Im Ergebnis ist sowohl eine optische als auch elektrische Endpunktdetektion nach erfolgreicher chipbasierter Analyse möglich.

Arbeitspaket 7 – Gerätevalidierung des Mustersystems

Die jeweilig erarbeiteten Module zur Probenaufbereitung, DNA-Isolation, Amplifikation (PCR-Kartusche) sowie chipbasierten Analyse wurden erfolgreich in Zusammenarbeit aller Partner optimiert. Im speziellen wurde von seitens des IPHT allen Partner ein entsprechender Aufbau zur Durchführung der chipbasierten Analyse zur Verfügung gestellt. In Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG wurde dieser in den Gesamtaufbau integriert (Abb. 10). Weiterhin wurden die optimierten Standardprotokolle der einzelnen Prozessschritte in unabhängigen Experimenten sowohl an Kulturoisolation als auch an künstlich infiziertem Pflanzenmaterial von allen Partnern erfolgreich getestet.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass im Rahmen des Verbundvorhabens PhytoValidierung ein modular aufgebautes Mustersystem zum Nachweis verschiedener Phytophthora-Arten erfolgreich etabliert und an künstlich infiziertem Pflanzenmaterial untersucht werden konnte.

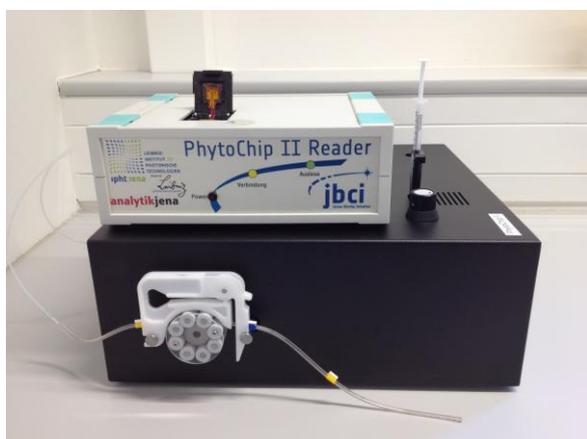


Abbildung 10: Gesamtaufbau des Nachweissystems – Amplifikation und chipbasierter Nachweis

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Aufstellung der einzelnen Positionen ist dem zahlenmäßigen Nachweis zu entnehmen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Eine erfolgreiche Bearbeitung der bestehenden Arbeitsaufgaben war nur durch die abgestimmte Zusammenarbeit und Beteiligung aller Projektpartner und ihre jeweils

eingebrachten Expertisen möglich. Im speziellen konnte das IPHT seine Erfahrungen und Expertisen im Bereich der Amplifikation und chipbasierten DNA-Analyse sowie auf dem Gebiet des fluidischen Managements erfolgsversprechend einbringen und weiter ausbauen. Im Ergebnis steht eine chipbasierte Technologieplattform zur spezifischen Analyse von *Phytophthora*-Arten zur Verfügung. Darüber hinaus konnten neue Erkenntnisse auf dem Gebiet isothermaler Amplifikationsmethoden gesammelt und vielversprechend eingebracht werden. Nur durch die Nutzung der vorhandenen Infrastruktur und der geförderten Personal- und Verbrauchsmittel war es möglich die Arbeitsziele in diesem Umfang und dieser Weise umzusetzen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Rahmen des Verbundvorhabens wurde an einer funktionsfähigen Lab-on-a-Chip-Plattform zum DNA-basierten Nachweis von verschiedenen *Phytophthora*-Arten geforscht. Eine wesentliche Herausforderung bestand dabei in der Erfüllung der Anforderungen für den mobilen Einsatz und zum anderen die Spezifität und Sensitivität etablierter Labormethoden zu erreichen. Derartige Systeme für den mobilen Einsatz, welche eine schnelle Aussage über mögliche Kontaminationen des Pflanzenmaterials erlauben, sind bisher am Markt nicht etabliert.

In einem interdisziplinären Team aus Wissenschaft und Industrie konnte erfolgreich die gesamte Prozesskette von der Probenaufbereitung bis zum Ergebnis in einem modular aufgebauten Gesamtsystem erarbeitet und technologisch umgesetzt werden. Dies war nur durch die enge Zusammenarbeit von möglichen Endanwendern (JKI, Braunschweig) und Gerätehersteller bzw. Systemintegratoren (Analytik Jena AG) möglich, da sowohl die Anforderungen der Anwender als auch produktionstechnische Aspekte direkt in die Forschungsarbeiten eingeflossen sind. Im Ergebnis ist eine erfolgreich etablierte Analyse-Plattform zum Nachweis verschiedener *Phytophthora*-Arten entstanden, welche hinsichtlich der Nachweisspezifität und –sensitivität umfassend optimiert wurde.

Durch die am IPHT erzielten Ergebnisse und gewonnenen Erfahrungen konnte die Fachkompetenz insbesondere im Bereich der chipbasierten und miniaturisierten Bioanalytik maßgeblich ausgebaut werden. Die dabei im Teilvorhaben erzielten Ergebnisse wurden vor allem auf nationalen und internationalen Konferenzen, als Vorträge und Poster präsentiert sowie in referierten Fachzeitschriften veröffentlicht. Des Weiteren fließen die gewonnenen Erkenntnisse in die Lehre und Ausbildung von Fachkräften ein. Dazu werden z.B. Forschungspraktika für Studierende angeboten, in denen sie selbstständig in einem vorgegebenen Zeitraum eine wissenschaftliche Fragestellung bearbeiten. Darüber hinaus

werden die gewonnenen Erfahrungen zum Einwerben neuer Forschungsvorhaben herangezogen, wodurch das IPHT, insbesondere die Arbeitsgruppe JBCI sowie die gesamte Region als Forschungsstandort für innovative Lösungen zum Nachweis von Biomolekülen nachhaltig gestärkt und regional sowie überregional ausgebaut werden wird.

5. *Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen*

Die Erforschung einer dezentralen Analytik für den Nachweis von Phytopathogenen ist im stetigen Wachstum. So konnte z.B. während der Durchführung des Projektvorhabens ein System der Firma OptiGene, das **Gene® II**, welches die isothermale Amplifizierung (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) zur Vervielfältigung und anschließenden Detektion der DNA nutzt, im Markt etabliert werden. Nachteilig ist jedoch, dass mit diesem System nur der spezifische Nachweis einer einzigen Art erbracht werden kann. Darüber hinaus sind zahlreiche Forschungsarbeiten zum parallelen Nachweis einer Vielzahl von *Phytophthora*-Arten oder anderer Pilze veröffentlicht wurden. Beispielhaft seien hier die Arbeitsgruppen um André Lévesque (Agriculture and Agri-Food Canada) sowie um Peter Bonants (Plant Research International, Wageningen, Niederlande) genannt.

6. *Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des FE-Ergebnisses nach Nr. 6*

a) Posterpräsentationen

König, S., Wagner, S., Werres, S., Schwenkbier, L., Weber, K., Kirsch, K., Hentschel, M., Weber, J.: Validierung eines PCR basierten Lab-on-a-Chip-Systems für die Diagnose von *Phytophthora*-Arten. 2012, BLE Innovationstage, 2012, Berlin

Schwenkbier, L., Weber, K., König, S., Werres, S., Weber, J., Popp, J.: Lab-on-a-chip system for on-site diagnosis of selected *Phytophthora* species. 2013, Lab-on-a-Chip European Congress 2013, Barcelona

Schwenkbier, L., Weber, K., König, S., Werres, S., Weber, J., Popp, J.: Lab-on-a-Chip System für die Vor-Ort-Analyse ausgewählter *Phytophthora*-Arten. 2013, 8. Deutsches Biosensor Symposium 2013, Berlin

Schwenkbier, L., Pollok, S., Weber, K., König, S., Werres, S., Popp, J.: Isothermal helicase-dependent amplification and chip-based detection system for on-site diagnosis of selected *Phytophthora* species. 2014, Lab-on-a-Chip European Congress 2014, Berlin

Schwenkbier, L., Pollok, S., Weber, K., König, S., Werres, S., Weber, Cialla-May, D., J., Popp, J.: Isothermale Amplifizierung und chipbasierte Detektion ausgewählter *Phytophthora* Arten, Heiligenstädter Kolloquium 2014, Heilbad Heiligenstadt

b) Vortragspräsentationen

Popp, J.: Innovative Bio- und Chemochips für eine Hochleistungsanalytik, Vortragsforum MEDICA VISION 2011, Düsseldorf

Weber, K., Cialla-May, D., Popp, J.: Innovative Bio- und Chemochips für eine Hochleistungsanalytik, Heiligenstädter Kolloquium 2012, Heilbad Heiligenstadt

Weber, K., Cialla-May, D., Popp, J.: Chipbasierte Diagnostik für den Vor-Ort-Nachweis von Tier- und Pflanzenpathogenen, 9. Deutsches Biosensor Symposium 2015, München

c) Publikationen in peer-reviewed journals

Schwenkbier, L.*, König, S.*, Wagner, S., Pollok, S., Weber, J., Hentschel, M., Kirsch, K., Popp, J., Werres, S., Weber, K.: On-site detection of *Phytophthora* spp. – single-stranded target DNA as limiting factor to improve on-chip hybridization. 2014. **Microchimica Acta**, 181: 1669-1679.

Schwenkbier, L., Pollok, S., König, S., Urban, M., Werres, S., Cialla-May, D., Weber, K., Popp, J.: Towards on-site testing of *Phytophthora* species. 2015. **Analytical Methods**, 7 (1): 211-217.

König, S.*, Schwenkbier, L.*, Riedel, M., Wagner, S., Pollok, S., Popp, J., Weber, K., Werres, S.: Potential of *Ypt1* and ITS gene regions for the detection of *Phytophthora* species in a lab-on-a-chip DNA hybridization array. 2015. **Plant Pathology**, DOI: 10.1111/ppa.12357.

*Autoren trugen zu gleichen Teilen an der Erstellung des Manuskripts bei

d) Qualifizierungsarbeiten

Schwenkbier, Lydia (Dissertation)

Arbeitstitel: Dezentrale Diagnoseverfahren zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten

FSU Jena, in Arbeit

III. Kurzfassung

Ziel des Verbundvorhabens PhytoChip-Validierung ist die Entwicklung und Erprobung eines geeigneten Lab-on-a-Chip Systems zum parallelen, spezifischen Nachweis von neun *Phytophthora*-Arten. Im Fokus der Forschungsaufgaben des IPHT Jena stand dabei die Erforschung einer chipbasierten Detektionsplattform. Insbesondere konnten erfolgreiche Ergebnisse (1) in der Prüfung der DNA mittels PCR, (2) der Testung alternativer Chipsubstrate sowie der Herstellung neuer Chips mit entsprechenden Sonden, (3) der Erarbeitung von Protokollen für die PCR und Hybridisierung im Labormuster, (4) der Testung von Spezifität und Sensitivität der Sonden auf den Chips sowohl mit *Phytophthora*-Kulturmaterial als auch künstlich infiziertem Pflanzenmaterial, (5) der Adaption der Chip-Technologie sowie (6) der Validierung des erarbeiteten (End-)Systems hinsichtlich Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit erreicht werden.

Die im Teilvorhaben des IPHT erzielten Ergebnisse wurden auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentiert sowie in referierten Fachzeitschriften veröffentlicht. Des Weiteren fließen die gewonnenen Erkenntnisse in die Lehre und Ausbildung von Fachkräften ein. Darüber hinaus werden die gewonnenen Erfahrungen zum Einwerben neuer Forschungsvorhaben herangezogen, wodurch das IPHT sowie die gesamte Region als Forschungsstandort für innovative Lösungen zum Nachweis von Biomolekülen nachhaltig gestärkt und regional sowie überregional ausgebaut werden soll.