INDUSTRIELLE GEMEINSCHAFTSFORSCHUNG

Schlussbericht vom 27.05.2024

zu IGF-Vorhaben Nr. 21961 N

Thema

Schnelltest für virale Barrierewirkung von OP-Textilien durch Tandem-DNAzym Hyperamplifikation

Berichtszeitraum

01.01.2022 – 29.02.2024

Forschungsvereinigung

Forschungskuratorium Textil e. V. (FKT)

Forschungseinrichtung

wfk - Cleaning Technology Institute e.V.

Gefördert durch:

Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

Thema **1**

Berichtszeitraum **1**

Forschungsvereinigung **1**

Forschungseinrichtung **1**

0 Kurzfassung der Ergebnisse **5**

1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung **6**

2 Stand der Forschung und Entwicklung **8**

2.1 Prüfanforderungen an OP-Textilien und Schutzkleidung 8

2.2 Testung der viralen Barriere 8

2.3 Gold-Nanopartikel als Surrogatpartikel und kolorimetrischer Indikator 9

2.4 Rolling Circle Amplification 10

2.5 DNA-Sekundärstruktur: Hairpinstrukturen 11

2.6 DNAzyme 11

3 Zielsetzung und prinzipieller Lösungsweg **13**

4 Experimenteller Teil **14**

4.1 Materialien 14

4.1.1 Chemikalien 14

4.1.2 Verbrauchsmaterialien 15

4.1.3 Geräte 15

4.1.4 Puffer, Lösungen und Kulturmedien 16

4.1.5 Oligonukleotide 18

4.1.6 Enzyme 21

4.2 Methoden 22

4.2.1 Spektroskopische Untersuchungen 22

4.2.1.1 Plattenlesegerät 22

4.2.1.2 Mikrovolumenspektralphotometer 22

4.2.2 Kopplung der DNA an GNP 22

4.2.2.1 Freeze-Thawing 22
4.2.2.2 Salt Aging 23
4.2.2.3 Stabilität in Gegenwart von Polykation und Salzlösungen 25
4.2.3 Molekularbiologische Reaktionen 25
4.2.3.1 Ligation 25
4.2.3.2 RCA 26
4.2.4 Gelelektrophorese 26
5 Ergebnisse und Diskussion 27
5.1 Auswahl geeigneter Polyelektrolyte 27
5.2 Auswahl des DNAzyms DNAse B 33
5.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die DNAse B 35
5.4 Einfluss des Reaktionsmediums (Salzkonzentration) auf die GNP 38
5.5 Design der DNA-Hairpins 42
5.6 Einfluss des Polyelektrolyts auf die Struktur der DNA in Lösung 43
5.7 Einfluss des Reaktionsmediums auf die Löslichkeit des Polyelektrolyts 47
5.8 Immobilisierung der DNA auf GNP durch Thiol-Gold-Bindung 50
5.8.1 Salt-Aging vs. Freeze-Thawing 51
5.8.2 Zugänglichkeit der auf GNP gebundenen DNA für andere DNA 55
5.8.3 Immobilisierung der Substrat-DNA auf GNP 56
5.9 Entwicklung des DNAzyms „DNAse A“ 57
5.10 Entwicklung des Tandem-DNAzyms 59
5.11 Entwicklung der zirkulären Matrizen-DNA 62
5.11.1 Design und Entwicklung der Sequenz 62
5.11.2 Ligation des Matrizenstranges 64
5.11.3 Etablierung der Rolling Circle Amplification (RCA) 66
5.12 Entwicklung der Messapparatur 69
5.13 Gegenüberstellung von Zielen und erreichten Ergebnissen 73
5.13.1 Verwendung der Zuwendung 73
5.13.2 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 73

6 Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft 75

6.1 Durchgeführte spezifische Transfermaßnahmen während der Laufzeit des Vorhabens 75

6.2 Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach Abschluss des Vorhabens 75

7 Zusammenfassende Diskussion und Folgerungen für die Praxis 77

8 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihr innovativer Beitrag und ihre industriellen Anwendungsmöglichkeiten 84

9 Danksagung 85

10 Literaturverzeichnis 86

0 Kurzfassung der Ergebnisse

Die Aufbereitung von OP-Textilien stellt für textile Dienstleistungsbetreibe ein wichtiges und stark ausbaufähiges Marktsegment dar. Es ist davon auszugehen, dass die für OP-Textilien durchzuführenden Prüfungen zukünftig um eine Prüfung der Barrierewirkung gegenüber der Penetration von Viren ergänzt werden: EN 13795 soll zukünftig durch ISO 20384 ersetzt werden, die eine Prüfung der viralen Barriereeigenschaften entsprechend ASTM F1671 enthalten wird. Die Verfügbarkeit eines normäquivalenten Schnelltests mit hohem Stichprobenumfang würde eine Reduktion der Anzahl der an externe Prüflabore zu vergebenden normativen Prüfungen erlauben. Hierdurch können die Prüfkosten gesenkt und gleichzeitig die Qualitätssicherung verbessert werden.

Ziel des Forschungsvorhabens war ein Schnelltest zur Prüfung der viralen Barrierewirkung von OP-Textilien und Schutzkleidung auf Basis einer speziell zu designenden, zirkulären Matrizen-DNA, die es ermöglicht, einzelne penetrierte Surrogatpartikel für Prüfviren mittels einer selbstständig ablaufenden Hyperamplifikation von Tandem-DNAzymen nachzuweisen.

Entsprechend der Größe der Prüfviren wurden Gold Nanopartikel (GNP) als Surrogatpartikel eingesetzt und mit Initiator-DNA funktionalisiert. Diese Initiator-DNA löste eine Rolling Circle Amplification (RCA) aus, wodurch die in einer entwickelten zirkulären Matrizen-DNA codierten Tandem-DNAzym-Einheiten produziert wurden. Pro Matrizen-Molekül lassen sich ca. 1000 Einheiten generieren. Diese Tandem-DNAzyme bestanden aus einem DNAzym A, dessen Aufgabe es war, die Tandem-DNAzym-Einheiten aus der generierten repetitiven Sequenz herauszuschneiden. Daher wurde das DNAzym A so entwickelt, dass es die eigene Sequenz spaltet. Die Hydrolyseaktivität des DNAzym A konnte erfolgreich nachgewiesen werden.

Die RCA unter Verwendung von Polymerase und die DNAzym vermittelte Hydrolyse von DNA machten unterschiedliche Pufferzusammensetzungen notwendig, waren jedoch nicht miteinander kompatibel. Hierdurch ließ sich keine gleichzeitige RCA-vermittelte Amplifikation unter sofortiger Freisetzung der Tandem-DNAzym-Einheiten realisieren. Eine exponentielle Hyperamplifikation erscheint jedoch zukünftig durch Entwicklung alternativer Puffersysteme oder Einsatz alternativer katalytischer Systeme umsetzbar, so dass eine hohe Zahl von Tandem-DNAzym-Einheiten mit dem enthaltenen DNAzym B synthetisiert werden kann.

Das DNAzym B wurde so designt, dass es die sogenannte Substrat-DNA schneidet. Diese wurde auf Indikator-GNP gebunden, so dass diese Indikator-GNP in Dispersion stabilisiert wurden und damit ihre typische rote Farbe aufwiesen. Indikator-GNP ohne DNA agglomerierten unter den Reaktionsbedingungen, was zu dem signalgebenden Farbumschlag nach blau führte. Für die Messungen der Penetration der Surrogatpartikel durch die OP-Textilien wurde eine Apparatur (Funktionsmuster) entwickelt, die das Prüftextil aufnahm.

Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde teilweise erreicht.

1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Operationstextilien (OP-Textilien) umfassen sowohl Chirurgenmäntel als auch z.B. textile Abdecksysteme, welche in unmittelbarer Nähe des OP-Feldes verwendet werden. Aufgrund der Anwendung („intented use“) handelt es sich um Medizinprodukte, die bezüglich der Inverkehrbringung der Medical Device Regulation (Verordnung (EU) 2017/745, MDR) [1] und bezüglich des Gebrauchs dem Medizinprodukterecht-Durchführungsgesetz (MPDG) [2] und der Medizinprodukte-Betreiberverordnung (MPBetreibV) [3] genügen müssen. OP-Textilien sind als Einweg-Produkte oder Mehrweg-Produkte verfügbar. Der Marktanteil für Mehrweg-OP-Textilien liegt bei etwa 15 %, der Anteil für Einweg-OP-Textilien bei etwa 85 % [4]. Aufgrund der Systemrelevanz des Gesundheitswesens und der für die Aufrechterhaltung der medizinischen Versorgung notwendigen Medizinprodukte ist davon auszugehen, dass Mehrweg-Produkten zukünftig ein größerer Stellenwert zukommt: Mehrwegprodukte unterliegen durch ihre vielfache Anwendbarkeit und Aufbereitbarkeit weniger stark dem Einfluss globaler Lieferketten, da für die jeweilige Anwendung nicht jeweils neue Medizinprodukte beschafft werden müssen, sondern lediglich die anforderungsgerechte Aufbereitung durch den Betreiber sicher gestellt werden muss. Die anforderungsgerechte Aufbereitung von Mehrweg-OP-Textilien stellt für die ca. 2.300 vorwiegend kleinen und mittelständischen textilen Dienstleistungsbetriebe (Jahresumsatz ca. 3,4 Mrd. €) ein wichtiges und stark ausbaufähiges Marktsegment dar [5]. Um sich gegenüber den Anbietern von ökologisch nachteiligen Einwegsystemen durchsetzen zu können, müssen die textilen Dienstleister jedoch ihre Wettbewerbsfähigkeit stärken. Im Rahmen der praxisüblichen Leasing-Versorgung sind die textilen Dienstleister i.d.R. die Betreiber der OP-Textilien. Daher ist durch sie sicherzustellen, dass die aufbereiteten OP-Textilien den Anforderungen an OP-Textilien gemäß EN 13795 [6] jederzeit entsprechen und somit gebrauchstauglich sind. Da die Chargengrößen bei Mehrwegprodukten statistisch bedingt wesentlich kleiner sind als bei Einwegprodukten, resultiert für Mehrwegprodukte im Vergleich zu Einwegprodukten ein größerer Stichprobenumfang. Um die Wettbewerbssituation der textilen Dienstleistungsbetriebe zu verbessern, ist es wichtig, die hohen, im Rahmen der Qualitätssicherung anfallenden Prüfkosten zu reduzieren. Im Hinblick auf den geforderten Infektionsschutz sind die Prüfungen der Barrierewirkung von OP-Textilien gegenüber Infektionserregern von höchster Bedeutung. Entsprechend EN 13795 werden hierzu bislang die Keimpenetration im nassen Zustand („wet penetration“) nach ISO 22610 [7] sowie die Keimpenetration im trockenen Zustand („dry penetration“) nach ISO 22612 [8] bewertet. Aufgrund aktueller Entwicklungen im Bereich der Normung ist jedoch zukünftig mit zusätzlichen Prüfanforderungen zu rechnen: EN 13795 soll zukünftig durch ISO 20384 ersetzt werden, die gegenwärtig (Stand April 2024) noch vom Normungskomitee ISO/TC 94/SC 13 bearbeitet wird.

ISO 20384 wird Prüfanforderungen für OP-Textilien enthalten, die über die Anforderungen der EN 13795 hinausgehen. Insbesondere wird eine Prüfung der Barriereeigenschaften von OP-Textilien gegen die Penetration flüssigkeitsgetragener Viren gefordert. Nach Veröffentlichung von ISO 20384 müssen OP-Textilien einer solchen Prüfung unterzogen werden. Die Prüfung der Barriereeigenschaften gegenüber der Penetration von flüssigkeitsgetragenen Viren erfolgt entsprechend der im Geltungsbereich USA verwendeten Methode ASTM F1671 [9]. Aufgrund des Einsatzes von Prüfviren kann diese Prüfung nur von spezialisierten externen mikrobiologischen Laboren durchgeführt werden. Die Prüfung erfordert einen Zeitaufwand von mindestens 2 Tagen. Durch die notwendige Vergabe der Prüfung an spezialisierte externe Labore entstehen hohe Kosten. Zudem ist die Durchführung der Prüfung zerstörend, da Prüfstücke aus den OP-Textilien entnommen werden müssen. Hieraus resultieren zusätzliche Aufwendungen für den Auftraggeber zum Ersatz der zerstörten OP-Textilien. Aus diesen Gründen besteht die dringende Notwendigkeit, alternative Prüfmethoden zu entwickeln: Ziel des Forschungsvorhabens war ein einfach durchführbarer, nicht zerstörender Schnelltest zur Kontrolle der viralen Barriere-Eigenschaften von OP-Textilien, der es ermöglicht, innerbetriebliche Kontrollen eigenständig durchzuführen. Die Verwendung eines normäquivalenten Schnelltests mit hohem Stichprobenumfang ermöglicht eine Reduktion der Anzahl der an externe Prüflabore vergebenen normativen Prüfungen. Dadurch können die Prüfkosten gesenkt und gleichzeitig die Qualitätssicherung verbessert werden. Neben den für die Aufbereitung der OP-Textilien verantwortlichen textilen Dienstleistern profitieren auch die Hersteller der OP-Textilien sowie die Hersteller der jeweiligen verwendeten Textilmaterialien von den Forschungsergebnissen, da sie zukünftig ebenfalls die viralen Barriereeigenschaften ihrer jeweiligen Produkte kostengünstig innerbetrieblich überprüfen können. Der angestrebte Schnelltest lässt sich nach entsprechenden Vergleichsuntersuchungen auch auf die Prüfung der viralen Barriere-Eigenschaften von Schutzkleidung („Personal Protective Equipment“, PPE) übertragen, welche bislang entsprechend ISO 16604 [10] geprüft wird.

2 Stand der Forschung und Entwicklung

2.1 Prüfanforderungen an OP-Textilien und Schutzkleidung

Die Prüfanforderungen für OP-Textilien sind in EN 13795 [6] zusammengefasst. Sie umfassen mehrere normative Prüfungen zu Reißfestigkeit [11], Berstfestigkeit [12], Reinheit bezüglich partikulärer Material und Partikelfreisetzung [13], mikrobieller Reinheit [14], Widerstand gegen Flüssigkeitspenetration [15] sowie Prüfungen zu Barriereeigenschaften gegen Infektionserreger im trockenen (ISO 22612) [8] und im nassen Zustand (ISO 22610) [7]. Insbesondere die Prüfungen der Barrierewirkung gegenüber der Penetration von Infektionserregern sind aufwendig, da durch den Einsatz von Prüfmikroorganismen beide Prüfungen nur in mikrobiologischen Laboren durchgeführt werden können. Beide Prüfungen sind bedingt durch die Vergabe an externe Labore mit hohen Prüfkosten verbunden.

Aufgrund der globalen Harmonisierung der Märkte wird gegenwärtig auf Initiative des Normungsgremiums ISO TC 94/SC 13 das Normungsvorhaben ISO/WD 20384 bearbeitet, bei dem zusätzlich zu den bestehenden Anforderungen aus EN 13795 [6] eine Testung der viralen Barriereeigenschaften gemäß ASTM F1671 [9] bzw. AAMI PB 70 [16] vorgesehen ist.

Eine Testung der viralen Barriereeigenschaften erfolgt in Europa bereits bei Schutzkleidung gegen Infektionserreger. Schutzkleidung ist als persönliche Schutzausrüstung („Personal Protective Equipment“, PPE) klassifiziert. Die Anforderungen an PPE ergeben sich aus EN 14126 [17] und umfassen neben anderen Prüfungen auch die Bestimmung der Widerstandsfähigkeit gegen die Penetration von mit Prüfviren kontaminierten Flüssigkeiten unter hydrostatischem Druck entsprechend ISO 16604 [10]. Die Prüfung nach ISO 16604 ähnelt methodisch sehr stark der Prüfung nach ASTM F1671.

2.2 Testung der viralen Barriere

Die Testung der viralen Barrierewirkung nach ASTM F1671 [9] sowie ISO 16604 [10] erfolgt mittels des Virus Phi-X 174. Dieses Virus ist ein Bakteriophage, der lediglich spezielle Stämme der Bakterienart *Escherichia coli* (*E. coli*) infizieren kann. Das Virus besitzt ein ikosaedrisches Kapsid (Proteinhülle), welches die beste Annäherung parakristalliner Strukturen an die Kugelform darstellt [18]. Mit einem Durchmesser von 27 nm stellt Phi-X 174 eines der kleinsten bekannten Viren dar. Die Penetration von Infektionserregern durch OP-Textilien wird insbesondere durch die Form und die Größe bzw. den hydrodynamischen Durchmesser der Viruspartikel bestimmt [9, 19, 20], während die elektrostatische Wechselwirkung zu Oberflächen aufgrund der geringen Größe eine untergeordnete Rolle spielt bzw. durch die Zusammensetzung der Virensuspension aufgehoben werden kann [21]. Aufgrund mit Hepatitis C- (HCV)-Viren vergleichbarer Größe und Form wird Phi-X 174 als generelles Testvirus für blutübertragene humanpathogene Viren (z.B. Hepatitis B- (HBV), HI- (HIV)-,

Ebola-, Zika-Viren [9, 10]) eingesetzt. Die Testung der viralen Barriereeigenschaften erfolgt unter Anwendung der normativ beschriebenen Prüfapparatur, sodass auf der einen Seite des Textils ein definierter abgeschlossener Raum von 60 cm^3 zur Verfügung steht, der mit der Phi-X 174-haltigen Prüfsuspension gefüllt wird. Die Prüfsuspension muss mindestens $1x10^8$ PFU/ml („plaque forming units“, entspricht kulturell nachweisbaren Viruspartikeln) enthalten. Die Prüfung nach ASTM F1671 sieht eine Prüfdauer von 60 min vor; dabei wird auf die Prüfsuspension ein Druck von 13,8±1,38 KPa für 1 min angelegt. Wird auf der der Prüfsuspension abgewandten Seite visuell ein Flüssigkeitsdurchtritt detektiert, gilt die Prüfung als nicht bestanden. Wird kein Flüssigkeitsdurchtritt festgestellt, wird diese Textilseite mit 5 ml einer Spüllösung für 1 min inkubiert, um eventuell durchgetretene Viren zu suspendieren. Die Spüllösung wird mit einem das Wirtsbakterium *E. coli* enthaltenden Agar vermischt, wodurch einzelne penetrierte Viren nach 6-18 h durch die Bildung klarer Höfe („plaques“) detektierbar sind. Für einen bestandenen Test dürfen in 0,5 ml der Spüllösung keine Viren detektierbar sein. Die für Schutzkleidung angewandte Prüfmethode nach ISO 16604 wendet einen gleichartigen Prüfaufbau jedoch unter Anwendung unterschiedlicher Drücke (1,75; 3,5; 7; 14 und 20 KPa) an, was nach ISO 14126 eine Unterteilung der Barriereeigenschaften in die Klassen 1 (0 KPa) bis 6 (20 KPa) ermöglicht. Da die Testung nach ASTM F1671 und ISO 16604 auf einem klassischen kulturellen Verfahren beruht, kann sie nur von spezialisierten mikrobiologischen Laboren durchgeführt werden.

2.3 Gold-Nanopartikel als Surrogatpartikel und kolorimetrischer Indikator

Goldnanopartikel (GNP) weisen Durchmesser von 1-400 nm auf [22-27] und sind kommerziell erhältlich. Aufgrund der definierten, bei der Herstellung technisch gut kontrollierbaren Durchmesser von GNP sind diese als partikuläre Surrogatmaterialien für Viruspartikel mit ihren spezifischen Durchmessern geeignet. Darüber hinaus lassen sich GNP aufgrund ihrer spezifischen optischen Eigenschaften als kolorimetrische Indikatorplattform in der Grundlagenforschung und Diagnostik [26-28] einsetzen. Der hierbei genutzte Effekt beruht auf den Oberflächen-Plasmonenresonanz-Eigenschaften nanoskaliger partikulärer Systeme. Abhängig von ihrer räumlichen Nähe zueinander zeigen GNP unterschiedliche optische Eigenschaften. Dispergierte GNP besitzen eine rote Farbe, bei Annäherung der GNP auf Abstände unterhalb ihres Durchmessers, z.B. durch Aggregation, tritt eine blaue Farbe auf [29, 30]. Unmodifizierte GNP neigen aufgrund starker Van-der-Waals-Kräfte zur Aggregation, eine stabile Dispergierung kann jedoch durch Adsorption von Ladungsträgern an der GNP-Oberfläche in Lösungen mit geringem Salzgehalt erreicht werden. Hierzu kann auch DNA eingesetzt werden, welche als Einzelstrang oder Doppelstrang auf der Oberfläche der GNP adsorbiert und durch die negativen Ladungen des DNA-Phosphatrückgrades eine Aggregation der GNP verhindert [27, 31-33].

Durch den Einsatz spezieller kationischer Polyelektrolyte wie z.B. Poly[(9,9-di(3,3′-N,N′-trimethylammonium)-propyl-fluorenyl-2,7-diyl)-alt-co-(1,4-phenylen)]-diiodid (PFP) lässt sich eine Aggregation von solchen GNP herbeiführen, die einzelsträngige DNA auf der Oberfläche gebunden haben, nicht jedoch von GNP, auf deren Oberfläche doppelsträngige DNA adsorbiert ist [34, 35]. Solche kationischen Polyelektrolyte sind langkettige Polymere mit positiver elektrischer Nettoladung [35, 36], die durch elektrostatische Wechselwirkungen an einzelsträngige DNA binden [35, 37, 38] und zu einer Ablösung der DNA von der Oberfläche von Goldnanopartikeln führen. Zur Stabilisierung des Dispersionszustands von $6x10^{11}$ GNP/ml in Anwesenheit des kationischen Polyelektrolyten Poly[(9,9-bis(6′-N,N,N-trimethylammonium)hexyl)fluoren-alt-1,4-phenylen]bro-mid)] sind hierbei $6x10^{8}$ DNA-Doppelstränge/ml mit einer Länge von je 34 Basenpaaren ausreichend. Wird die Konzentration doppelsträngiger DNA z.B. durch hydrolytische Spaltung und Freisetzung von DNA-Einzelsträngen unterschritten, setzt eine Polyelektrolyt-vermittelte Aggregation von GNP ein, die zu einem Farbumschlag der Lösung führt [38 – 40].

2.4 Rolling Circle Amplification

Die Rolling Circle Amplification (RCA) ist eine häufig eingesetzte Methode zur isothermalen Synthese großer Mengen einzelsträngiger DNA basierend auf der Sequenzinformation einer komplementären zirkulären Matrizen-DNA [41, 42]. Durch Hybridisierung eines kurzen DNA-Einzelstrangs (Initiator-DNA) an einen komplementären Bereich der zirkulären Matrizen-DNA entsteht ein partiell doppelsträngiger Abschnitt, dessen freies Ende als Startpunkt für eine Polymerase dient. Die Polymerase bindet an den partiell doppelsträngigen Bereich unabhängig von dessen Sequenz und verlängert die hybridisierte Initiator-DNA, ausgehend von der freien Hydroxylgruppe (3‘-Ende), kontinuierlich um die komplementäre Sequenz der Matrizen-DNA [43]. Nachdem die gesamte komplementäre Sequenz der zirkulären Matrizen-DNA einmal amplifiziert wurde, beginnt die Polymerase, die zirkuläre Matrize unter Verdrängung des bereits synthetisierten komplementären Strangs erneut abzulesen, ohne dafür einen weiteren Startpunkt zu benötigen. Es resultiert ein synthetisierter langer DNA-Einzelstrang mit hunderten repetitiven Kopien der komplementären Matrizen-Sequenz [41]. Eine geeignete Polymerase für RCA-Reaktionen ist Phi29, die mit einer Rate von ca. 2.280 Nukleotiden pro Minute bis zu 70.000 Nukleotide lange DNA-Einzelstränge aus einer einzigen Matrizen-DNA synthetisieren kann [43, 44]. Die zur Initiation der RCA benötigte einzelsträngige Initiator-DNA kann funktionalisiert mit Thiol-Gruppen bezogen werden und mittels dieser einfach auf Goldoberflächen, z.B. Goldnanopartikeln (GNP), gebunden werden [45 – 47]. Hierdurch lassen sich RCA-Reaktionen auf Partikeln initiieren [48, 49]. Mittels RCA amplifizierte DNA-Abschnitte können an speziellen Erkennungssequenzen durch Zugabe spezieller proteinbasierter Endonukleasen gespalten und freigesetzt werden [50]. Diese freigesetzten RCA-

Produkte können nach Hybridisierung an komplementäre Bereiche freier zirkulärer Matrizen-DNA als Initiatoren weiterer RCA-Reaktionen dienen [51]. Gemäß den Ergebnissen universitärer Grundlagenforschung können durch RCA auch große Mengen katalytisch aktiver DNAzyme synthetisiert werden, die sich autokatalytisch selbst aus dem synthetisierten DNA-Einzelstrang (RCA-Produkt) freisetzen, um so fortlaufend DNA-Fragmente definierter Größe zu generieren [52]. Somit lassen sich prinzipiell auch aus RCA-Produkten selbst freisetzende Tandem-DNAzyme für die Generierung eines Farbsignals unter Einsatz von Goldnanopartikeln generieren.

2.5 DNA-Sekundärstruktur: Hairpinstrukturen

Durch partielle intramolekulare Hybridisierung eines DNA-Einzelstranges an komplementäre Sequenzabschnitte entstehen DNA-Hairpins, die sowohl einen doppelsträngigen Stamm-Bereich als auch einen einzelsträngigen Schleifen-Bereich aufweisen. Die Sequenz von DNA-Hairpins kann so designt werden, dass die intramolekulare Schmelztemperatur des Stamm-Bereichs um bis zu 20 °C (entspricht 7,8 kcal/mol) erhöht ist im Vergleich zu zwei getrennten DNA-Molekülen mit identischem Hybridisierungsbereich ohne Schleife [53]. Durch nukleolytische Spaltung derartiger DNA-Hairpins im Schleifen-Bereich wird die Hairpin-Konformation gelöst, und aufgrund der erniedrigten Schmelztemperatur werden zwei komplementäre DNA-Einzelstränge freigesetzt [54, 55]. Die Spaltung solcher DNA-Hairpins lässt sich sensitiv und sehr einfach unter Einsatz von Goldnanopartikeln als kolorimetrische Indikatorplattform nachweisen.

2.6 DNAzyme

DNAzyme sind einzelsträngige DNA-Moleküle, die aus etwa 40-50 Nukleotiden mit spezieller Sequenz bestehen [56-61]. Durch intramolekulare Hybridisierungen [58-64] und Wechselwirkungen mit Cofaktoren (z.B. 1- oder 2-wertigen Kationen, Hemin) nehmen sie eine spezifische dreidimensionale Konformation ein, welche eine katalytische Aktivität aufweist [59-63, 65, 66]. Es sind DNAzyme mit Peroxidase-Aktivität und andere mit Endonuklease (DNase)-Aktivität bekannt [56], welche die hydrolytische Spaltung innerhalb eines DNA-Moleküls katalysieren [67]. DNAzym-basierte DNasen verfügen über ein zentrales katalytisch aktives Zentrum, das aus einem etwa 15 Nukleotide langen, schleifenförmigen Bereich besteht, in dem kationische Metall-Cofaktoren (z.B. Na^{+}, Mg^{2+}, Tb^{3+}) gebunden sind [56, 64, 65, 66, 68]. Flankierend verfügen sie über zwei Substraterkennungssequenzen; diese weisen eine komplementäre Sequenz zu dem als Substrat dienenden DNA-Einzelstrang auf. Durch Hybridisierung wird das katalytisch aktive Zentrum an den DNA-Substratstrang angenähert, was in der Spaltung des DNA-Substratstrangs resultiert [60, 61, 65, 66]. Die Sequenz einer DNase und der jeweiligen Substrat-DNA können zudem auf demselben DNA-Strang liegen, wodurch eine Selbstspaltung des DNA-Einzelstrangs katalysiert werden kann [69].

In Publikationen der universitären Grundlagenforschung ist die Kopplung zweier DNAzyme beschrieben, um einen zirkulären Substratstrang an zwei verschiedenen Stellen zu schneiden und so möglichst effizient eine Amplifikation zu verhindern [70]. Die typischen Umsatzraten von DNAzym-basierten DNasen liegen bei ca. 1 min^{-1} [63]; bei bestimmten DNasen kann die Umsatzrate durch Gegenwart von kationischen Polyelektrolyten bis zu 50-fach erhöht werden [71]. Auf Basis dieser Erkenntnisse lassen sich DNasen auch einsetzen, um DNA-Hairpins auf der Oberfläche von Goldnanopartikeln zu spalten, wodurch ein Farbsignal generiert werden kann.

3 Zielsetzung und prinzipieller Lösungsweg

Ziel des Forschungsvorhabens war ein einfach anwendbarer Schnelltest zur Prüfung der viralen Barrierewirkung von OP-Textilien und Schutzkleidung auf Basis einer speziell zu designenden, zirkulären Matrizen-DNA, die es ermöglicht, einzelne penetrierte Surrogatpartikel für Prüfviren mittels einer selbstständig ablaufenden Hyperamplifikation von Tandem-DNAzymen nachzuweisen: Das Prüfvirus Phi-X 174 lässt sich durch gleich große und mit Initiator-DNA funktionalisierte Goldnanopartikel (Surrogat-GNP) substituieren. Einzelne durch das Textil penetrierte Surrogat-GNP binden an zirkuläre Matrizen-DNA und initiieren Rolling Circle Amplifikationen (RCA), bei denen die Sequenzinformation der zirkulären Matrizen-DNA fortlaufend in ein langes komplementäres einzelsträngiges DNA-Molekül umgesetzt wird, welches aus zahlreichen repetitiven Tandem-DNAzym-Einheiten aufgebaut ist. Die einzelnen Tandem-DNAzym-Einheiten können sich aufgrund der in ihnen enthaltenen „DNase A“ selbst freisetzen und an weitere zirkuläre Matrizen-DNA binden, wodurch neue RCA-Reaktionen initiiert werden, was zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Tandem-DNAzyme (Hyperamplifikation) führt. Eine im Tandem-DNAzym enthaltene „DNase B“ katalysiert die Spaltungen von DNA-Hairpins auf der Oberfläche von dispergierten Goldnanopartikeln (Indikator-GNP); dies führt zur Bildung einzelsträngiger DNA-Moleküle, die von Polyelektrolyten gebunden und somit von der Oberfläche der Indikator-GNP entfernt werden. Die resultierende Aggregation der Indikator-GNP führt aufgrund des Oberflächen-Plasmonenresonanz-Effekts zu einer Farbänderung der Detektionslösung von rot zu blau, die mit dem bloßen Auge wahrnehmbar ist. Darüber hinaus lässt sich durch eine einfache technische Umgestaltung der normativen Prüfapparatur ein Funktionsmuster entwickeln, das eine zerstörungsfreie Prüfung von OP-Textilien erlaubt.

Der Lösungsweg umfasste folgende Arbeitsschritte:

- Entwicklung von DNA-Hairpins
- Entwicklung einer „DNase B“
- Entwicklung eines Tandem-DNAzyms ohne Initiator-Sequenz
- Entwicklung der zirkulären Matrizen-DNA
- Entwicklung von Surrogat-GNP
- Entwicklung der Tandem-DNAzym Hyperamplifikation
- Untersuchung der Methodenäquivalenz und der Lagerstabilität
- Zerstörungsfreie Prüfapparatur und Praxisuntersuchung
- Dokumentation und Berichterstattung

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien

Tabelle 4.1.1.1: Liste der eingesetzten Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth
Natriumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Zinkchlorid	Merck
Mercaptohexanol	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Tris (2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich
Tween-20	Roth
Tween-80	Roth
Brij 35	Roth
GelRed	Biotium
SYBR Green	Invitrogen
SYBR Gold	Invitrogen
O'GeneRuler Ultra Low Range DNA-Leiter	Thermo Scientific
dNTP Mix	Thermo Fisher
10x TBE-Puffer	Thermo Scientific
NaOH	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
DMSO	Roth
Gold-Nano-Partikel, GNP, 20 nm, Tensid-stabilisiert, Typ A	Sigma-Aldrich
Gold-Nano-Partikel, GNP, 30 nm, Tensid-stabilisiert, Typ B	Sigma-Aldrich
Gold-Nano-Partikel, GNP, 20 nm, Citrat-stabilisiert, Typ C	Plasmachem
HPLC-Wasser	Roth

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.1.2.1: Liste der eingesetzten Verbrauchsmaterialien

Material	Spezifikation	Bezugsquelle
Novex TBE Gels	15 %	Invitrogen
Microspin G-25-Säulen		Cytiva
Silikon Kautschuk	Typ 2, mittelhart	TFC Troll Factory Store

Für Test- und Forschungszwecke wurden 12 unterschiedliche OP-Textilmaterialien der Produktkategorie „standard performance“ oder „high performance“ entpsrechend ISO 22610 von folgenden Firmen zur Verfügung gestellt:

- Klopman GmbH, Ratingen
- Fabricpartner GmbH, Mönchengladbach
- Transtextil GmbH, Freilassing
- Rotecno AG, Stabio, CH

Darüber hinaus wurden unterschiedliche OP-Textilien mit einer unterschiedlichen Anzahl vorausgegangener Aufbereitungen (neu, 26 Aufbereitungszyklen, 86 Aufbereitungszyklen) von textilen Dienstleistern zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Geräte

Tabelle 4.1.3.1: Liste der eingesetzten Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Model A 210P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Elektrophorese Netzgerät	PS 304 XL (230V)	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Galileo Horizontal Systems Mini S #80-0911	Galileo bioscience
Fluorospektrometer	F-2500	Hitachi Ltd., Japan
Tecan Plattenlesegerät	infinite 200Pro	Tecan
NanoDrop	One	Thermo Fisher

Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Horizontaler Schüttler	Innova2000 platform shaker	New Brunswick Scientific
Magnetrührer mit Heizfunktion	RH basic	IKA
Mikrozentrifuge	Heraeus Pico17	Thermo Scientific
Netzgerät	BT-305	Basetech
pH-Meter	pH 100	VWR
UV-Tisch	UVP Transilluminator UVP M-20V, benchtop UV variable	UVP
Waage (Feinwaage)	ABJ 320-4NM	KERN & SOHN GmbH
Zentrifuge	5804 R	Eppendorf
Zentrifuge	5804 R	Eppendorf
Zentrifuge	Galaxy 16 DH	VWR

4.1.4 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Tabelle 4.1.4.1: Liste der eingesetzten Puffer und Lösungen.

Reaktionspuffer	
Substanz	
HEPES	50 mM
NaCl	100 mM
$MgCl_2$	40 mM
$ZnCl_2$	4 mM
pH 7,5	
TBE Puffer	
Substanz	
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
pH 8,0	
TE Puffer	
Substanz	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0	

Polymerasepuffer	
Substanz	
Tris	50 mM
$(NH4)_2SO_4$	10 mM
$MgCl_2$	10 mM
DTT	4 mM
pH 7,5	
Ligasepuffer	
Substanz	
Tris	50 mM
$MgCl_2$	10 mM
ATP	1 mM
DTT	10 mM
pH 7,5	
SSCT-Puffer	
Substanz	
NaCl	150 mM
Trinatriumcitrat	15 mM
Tween-20	0,1 %
pH 7,0	
PBS	
Substanz	
NaCl	137 mM
Na_2HPO_4	10 mM
KCl	2,7 mM
KH_2PO_4	2 mM
pH 7,5	

4.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 4.1.5.1: Liste der eingesetzten Oligonukleotide. Sämtliche Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

AVB-Nr.	Sequenz	Modifikation
#1	GAAAGATTCATCAGTTGAGATTTAGGAATACCACATTCTAT-CATTGCAGACCAAGTAACG-TAGTTGAGCTGTCACAGAATGTGACGTTGAAGCGTTACCTAATTCGGCACATATACACCATGCTCATAAGCAGTCAAGTATGCT-GAGGAGAGATATCTACGTTAATCATACGAACTAACG	
#2	ACGTTAATCATACGAACTAACGGAACAACATTATTACAGG-TAGAAAGATTCATCAGTTGA-GATTTAGGAATACCACATTCTATCATTGCAGACCAAGTAACGTAGTTGAGCTGTCACAGAATGTGACGTTGAAGCGTTAC-CTAATTCGGCACATATACACCATGCTCATAAGCAGTCAAG	
#3	AGTGTTCCGTGGATGGAGCAATAGTCTCCCGGGTCCGTATG-GATCGGC	
#4	AGTGTTCCGTGGATGCCGGGTCCGTATGGATCGGC	
#5	CCTCTGCCGATCCATACTGCG-GAACACTCCTCTGCCGATCCATACTGCG-GAACACTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACACT	
#6	CCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACACT	
#7	CCGCGCTAGAACATCGCTAGATAAGTGGGTGCGTTT-GCTATAGCTGTCCCTCAAAGTACATGAGACTT	
#8	CCGCGCTAGAACATCGATAGATAAGTGGGAGCCTTT-GCCATAGTTGTCCCTCAAAGTACATGAGACTT	
#9	CCGCGCTAGAACATCGCTAGATAAGTGGGAGCCTTT-GCTATAGCTGTCCCTCAAAGTACATGAGACTT	
#10	AAAGTCTCATGTACTTATATGTTCTAGCGCGGA	
#11 Initiator	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGTTGGACCAGGTTCGAAAT	HS-C3-
#12 Sonde Initiator	ATTTCGAACCTGGTCCAACATG	6FAM-
#13	CATGTACAGCCATAGTTGAGCATTAAGTTGAAGTGGCTG-TACATG	

#14	CATGTACAGCCATAGTTGAGCACTAAGTTGAAGTGGCTG-TACATG	
#15 DNAse A	CATGTACAGCCATAGTTGAGCAAAAAGTTGAAGTGGCTG-TACATG	
#16	CCGATCACATA	
#17	TATGTGATCGG	
#18	ATCCTCCCCGCGCAACCTAAAA	
#19	TTTTAGGTTGCGCGGGGAGGAT	
#20	GAATCCCCTTAATAATGAACAATGAGCCTTTAT	
#21	ATAAAGGCTCATTGTTCATTATTAAGGGGATTC	
#22	AAAGTCTCATGTACTTATATGTTCTAGCGCGGA	3'-6[FAM]
#23	CATGTACAGCCATAGTTGAGCAAAAAGTTGAAGTGGCTG-TACATG	3'-6[FAM]
#24	GTCAGAAAGATAATCTAGTTGAGCTGTCTGCATCACGAGT	
#25	ACTCGTGATGCAGACGTTGAAGGATTATCTTTCTGAC	3'-6[FAM]
#26	CCGCGCTAGAACATCGCTAGATAAGTGG-GAGCCTGCTATAGCTGTCCCTCAAAGTACAT-GAGACTTTTCGTGGGGAGCAGCGGATCTTAATCATGTACAG CCATAGTTGAGCAAAAAGTTGAAGTGGCTGTACATG	
#27	GTCAGAAAGATAATCTAGTTGAGCTGTCTGCATCACGAGTTT-CGTGGGGAGCAGCG-GATCTTAATCATGTACAGCCATAGTTGAGCAAAAAGTTGAAG TGGCTGTACATG	
#28	ACTCTCGAAAGTCTCATGTACTTATATGTTCTAGCGCG-GAAGAGAGG	3'-6[FAM]
#29	ATCTCTCGAAAGTCTCATGTACTTATATGTTCTAGCGCG-GAAGAGAGAG	3'-6[FAM]
#30	ACCTCTCGAAAGTCTCATGTACTTATATGTTCTAGCGCG-GAAGAGAGGG	3'-6[FAM]
#31	ACGCTCTCGAAAGTCTCATGTACTTATATGTTCTAGCGCG-GAAGAGAGCGG	3'-6[FAM]
#32	5'-6FAM- CTGAGCCAGG ATCAAACTCT-3'	3'-6[FAM]
#33	GACGATCTAGTTGAGCTGTCTGCA	
#34	TGCAGACGTTGAAGGATCGTC	3'-6[FAM]

#35	ATGCTGTATGCAGTAACTCGTGATGCAGACGTTGAAG-GATCGTCTTTCTGACTTAGCGACCTGGCTA	3'-6[FAM]
#36	ACTCTCGAAAGTCTCATGTACTTATATG	
#37	TTCTAGCGCGGAAGAGAGG	
#38	ACGCTCTCGAAAGTCTCATGTACTTATATG	
#39	TTCTAGCGCGGAAGAGAGCGG	
#40 DNAse B	GACGATCTAGTTGAGCTATTTGCA	
#41 Substrat DNAse B	TGCAAATGTTGAAGGATCGTC	3'-6[FAM]
#42	ATCTCTCGTGCAAATGTTGAAGGATCGTCAGAGAGAG	
#43	ACTCTCTCGTGCAAATGTTGAAGGATCGTCAGAGAGAGG	
#44	ACGCTCTCGTGCAAATGTTGAAGGATCGTCAGAGAGCGG	
#45 Tandem DNAzym	GACGATCTAGTTGAGCTATTTGCATTCGTGGGGAGCAGCG-GATCTTAATCATG-TACAGCCATAGTTGAGCAAAAAGTTGAAGTGGCTGTACATG	
#46	ATCTCTCGTGCAAATGTTGA	
#47	AGGATCGTCAGAGAGAG	
#48	ACTCTCTCGTGCAAATGTTGA	
#49	AGGATCGTCAGAGAGAGG	
#50	ACGCTCTCGTGCAAATGTTGA	
#51	AGGATCGTCAGAGAGCGG	
#52 Matritzen-DNA	CAACTATGGCTGTACATGCTCTTCTTCTTCTGCAAATAGCT-CAACTAGATCGTCTTATATT-GGTTGCATGTACAGCCACTTCAACTTTTTGCT	5'-Phosohat
#53 Splint I	TAGTTGAGCAAA	
#54 Splint II	CTAGTTTTCTAGTAGTTGAGCAAAGCTGTTTTCAGC	
#55	GAGCAAAAAGTTGAAG	
#56	GCAAAAAGTTGAAG	
#57	TAATCAAGAGCAAAAAGTTGAAG	
#58	TTCATGTTGGACCAGGTTCGAAATTTGCAAATGTTGAAG-GATCGTCACTTTT	3'-C6-SH

Substrat mit Thiol		
#59 Initiator	TTTCTTCTTTCTTCTTTCTTCTTTCTTCTTTCTAGTT-GAGCAAAAAGTTG	5'-C6-SH

4.1.6 Enzyme

Tabelle 4.1.6.1: Liste der eingesetzten Enzyme

Name	Funktion	Bezugsquelle
T4-Ligase	Kovalente Verknüpfung der Matrizen-DNA	NEB
Phi29 Polymerase	RCA, Produktion der Tandem-DNA	NEB
Exonuklease I	Abbau einzelsträngiger DNA nach Ligation	NEB
Exonuklease III	Abbau einzelsträngiger DNA nach Ligation	NEB

4.2 Methoden

4.2.1 Spektroskopische Untersuchungen

4.2.1.1 Plattenlesegerät

Spektroskopische Analysen zur Absorption- und Fluoreszenzbestimmung wurden mit einem Plattenlesegerät Infinite 200 Pro, Fa. Tecan durchgeführt. Absorptionsmessungen erfolgten unter Verwendung einer transparenten 96 Well-Platte (*Thermo Fisher Scientific-Nunclon 96 Flat Transparent*). Fluoreszenzmessungen erfolgten in einer schwarzen Mikrotiterplatte (*Thermo Fisher Scientific-Nunclon 96 Flat Black*) für die Fluoreszenzmessung. Absorptionsspektren von GNP wurden zwischen 400 – 700 nm aufgenommen. Zur quantitativen Analyse von 20 nm großen GNP wurde die Absorption bei 520 nm gemessen.

4.2.1.2 Mikrovolumenspektralphotometer

Spektroskopische Analysen zur Absorptionsmessung von kleinen Volumina sowie zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurden mit einem Nanodrop, Fa. Thermo Scientific, Spektrometer durchgeführt. Ein Probevolumen von 1 µl wurde eingesetzt und die DNA Konzentraten bei 260 nm bestimmt.

4.2.2 Kopplung der DNA an GNP

Für beide Methoden wurden die GNP vor der Kopplung durch Zentrifugation 6x konzentriert, so dass sie als 6 nM Dispersion vorlagen. Die Thiol-funktionalisierte DNA wurde zuvor mit TCEP reduziert, um die Thiol-Gold Kopplung durchführen zu können.

4.2.2.1 Freeze-Thawing

Es wurden 300 µl 6x GNP Dispersion zu 75 µl 15 µM Initiator-DNA + 1 µl NaCl gegeben (Endkonzentration NaCl 2,66 mM Varianten 1, beziehungsweise 5,32 mM Variante 2) und für 48 Stunden bei – 20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die GNP abzentrifugiert und mit TE Puffer gewaschen. Zur Hybridisierung mit der fluoreszenzmarkierten Sonde wurden diese in SSCT Puffer zugegeben (Endkonzentration 1 µM) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die GNP wurden abzentrifugiert und in SSCT Puffer gewaschen. Durch Zugabe von NaOH wurde der pH-Wert auf 11 eingestellt und die Sonden-Oligonukleotide abgetrennt. Die GNP wurden durch Zentrifugation von den Sonden-Oligonukleotiden abgetrennt und deren Fluoreszenz in PBS-Puffer pH

7,86 gemessen. Durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden wurde die Fluoreszenz in die entsprechende Konzentration umgerechnet und damit die Anzahl an DNA-Oligonukleotide pro Goldnanopartikel berechnet.

Die Kopplung der Substrat-Oligonukleotide wurde analog nach Variante 2 durchgeführt. Hier wurde auf die Bestimmung der Dichte der DNA auf der Partikeloberfläche verzichtet.

4.2.2.2 Salt Aging

Es wurden 300 µl 6x GNP Dispersion zu 75 µl 15 µM Initiator-DNA gegeben. Die Salzkonzentration wurde sukzessive erhöht durch Zugabe kleiner Volumina von 1 M NaCl beziehungsweise von 2 M NaCl.

Variante 1:

1. **10 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 25,97 mM
   1 h, RT, geschüttelt, dunkel
2. **10 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 50,63 mM
   1 h, RT, geschüttelt, dunkel
3. **10 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 74,07 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
4. **15 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 107,14 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
5. **15 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 137,93 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
6. **20 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 175,82 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
7. **25 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 218,75 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
8. **30 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 264,71 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
9. **35 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 311,93 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
10. **40 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 358,97 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel
11. **50 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 409,45 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel
12. **60 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 460,43 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel
13. **70 µ**l NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 509,80 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel

14. **85 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 558,82 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel
15. **110 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 609,38 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel
16. **140 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 659,09 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel
17. **190 µl** NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = 709,30 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel
18. **210 µ**l NaCl-Lösung (1 M) NaCl- Konz. = **750,00 mM**
    1 h oder **ÜN**, RT, geschüttelt, dunkel

Variante 2:

1. **20 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = 50,63 mM
   1 h, RT, geschüttelt, dunkel
2. **25 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = 107,14 mM NaCl
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel)
3. **60 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = 218,75 mM NaCl
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel)
4. **65 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = 311,93 mM NaCl
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel)
5. **90 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = 409,45 mM NaCl
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel)
6. **130 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = 509,80 mM NaCl
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel)
7. **195 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = 609,38 mM NaCl
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel)
8. **330 µl** NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = 709,30 mM NaCl
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel)
9. **210 µ**l NaCl Lösung (1 M) NaCl-Konz. = **750,00 mM NaCl**
   1 h oder **ÜN**, RT, geschüttelt, dunkel

Variante 3:

1. **10 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 51,95 mM
   1 h, RT, geschüttelt, dunkel
2. **10 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 101,27 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
3. **25 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 214,29 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
4. **25 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 314,61 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel

5. **25 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 404,26 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
6. **30 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 500,00 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
7. **40 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 611,11 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
8. **40 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 706,90 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
9. **45 µ**l NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 800,00 mM
   30 min, RT, geschüttelt, dunkel
10. **55 µl** NaCl-Lösung (2 M) NaCl-Konz. = 897,06 mM
    30 min, RT, geschüttelt, dunkel
11. **70 µl** NaCl-Lösung (2 M) **NaCl-Konz. = 1000,00 mM**
    1 h oder **ÜN**, RT, geschüttelt, dunkel

Zur Hybridisierung mit der fluoreszenzmarkierten Sonde wurde diese in SSCT Puffer zugegeben (Endkonzentration 1 µM) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die GNP wurden abzentrifugiert und in SSCT Puffer gewaschen. Durch Zugabe von NaOH wurde der pH-Wert auf 11 eingestellt und die Sonden-Oligonukleotide abgetrennt. Die GNP wurden durch Zentrifugation von den Sonden-Oligonukleotiden abgetrennt und deren Fluoreszenz in PBS-Puffer pH 7,86 gemessen. Durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden wurde die Fluoreszenz in die entsprechende Konzentration umgerechnet und damit die Anzahl an DNA-Oligonukleotide pro Goldnanopartikel berechnet.

4.2.2.3 Stabilität in Gegenwart von Polykation und Salzlösungen

Die GNP (1 nM bzw. 5 nM) wurden mit NaCl-Lösungen definierter Konzentration sowie mit Reaktionspuffer gemischt und die Farbe der jeweiligen Dispersion fotografisch dokumentiert. Das Absorptionsspektrum wurde in einem Tecan Plattenlesegerät gemessen.

4.2.3 Molekularbiologische Reaktionen

4.2.3.1 Ligation

Die Ligation der Matrizen-DNA wurde durch die T4-Ligase in dem Ligasepuffer des Herstellers durchgeführt. Es wurden Matrizen-DNA und Splint Oligonukleotid inkubiert und anschließend die verbleibende einzelsträngige DNA durch eine Mischung von Exonuclease I und Exonuclease III abgebaut. Die zyklisierte DNA wurde in einer G25 Spin-Column von dem Ligasepuffer getrennt und in einer Konzentration von 100 µM in Wasser gelöst.

4.2.3.2 RCA

Die RCA an der Matrizen-DNA wurde durch die Phi29-Polymerase im Polymerasepuffer des Herstellers bzw. in Reaktionspuffer durchgeführt. Dazu wurden die Matrizen-DNA und das Initiator-Oligonukleotid bei 25 °C gemischt und für bis zu 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Dem Reaktionspuffer wurden dazu 4 mM TCEP zugegeben.

4.2.4 Gelelektrophorese

PCR-Ansätze wurden gelelektrophoretisch ausgewertet durch das Auftragen von 5 µl Reaktionsansatz zusammen mit 5 µl TBE Urea Probenpuffer (2x) auf ein 15% TBE-Urea Gel. Zuvor wurden die Proben für 10 min bei 95 °C dehybridisiert. Zum Vergleich wurde eine Ultra Low Range DNA-Leiter und eine ssDNA Leiter mit 11, 22 und 33, bzw. 11, 68, 110 und 180 Basen verwendet. Die Einfärbung des Polyacrylamidgels wurde mit SYBR Gold oder Gel-Red gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Zur gelelektrophoretischen Größenseparierung wurde an das Gel eine Spannung von 180 V für 50 bis 75 Minuten angelegt. Anschließend wurden die gefärbten Banden unter UV-Licht fotografiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Auswahl geeigneter Polyelektrolyte

DNA ist aufgrund der Phosphatgruppen selbst ein hoch geladenes Polyanion, das daher sehr gut wasserlöslich ist. In Gegenwart von polykationischen Gegenionen kommt es zu einer starken elektrostatischen Wechselwirkung, die die Ladungen des Phosphatrückgrats der DNA in weiten Teilen neutralisiert. Eine solcher Effekt ist nicht nur auf Moleküle beschränkt, sondern kann auch an den Oberflächen von Partikeln stattfinden. Im Fall der hier eingesetzten GNP trägt deren Oberfläche negativ geladene Citrat-Moleküle (GNP Typ C) oder organische Stabilisatoren (Typ A und B) (genaue Angaben zu dem eingesetzten Tensid sind vom Hersteller nicht verfügbar). Selbst ungeladene Partikel weisen meist ein negatives *zeta*-Potential auf, das für die Stabilität der dispergierten Partikel essentiell ist. Die Stabilität einer GNP-Dispersion in wässrigen Medien wird daher ebenfalls durch Polyelektrolyte beeinflusst. Eine künstlich ausgelöste Agglomeration der GNP bedingt durch die Zugabe von Polyelektrolyten führt zu einer sichtbaren Farbänderung der Dispersion, die als Signal genutzt wird. Dieser Effekt wurde an den GNP evaluiert sowohl optisch mit bloßem Auge als auch spektroskopisch.

Dazu wurden die zwei Polykationen Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDDA) und Poly[(9,9-bis(6′-N,N,N-trimethylammonium)hexyl)fluoren-alt-1,4-phenylen]bromid)] (PFP), s. Abb. 5.1.1, beschafft und deren konzentrationsabhängige Einfluss auf die Agglomeration der GNP ermittelt.

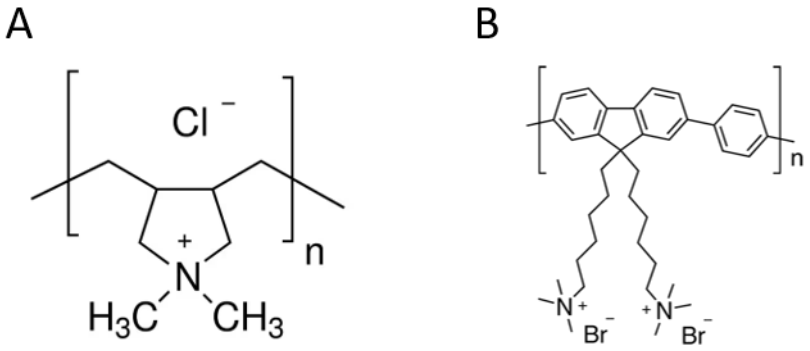


Abbildung 5.1.1: Verwendete Polyelektrolyte, (A) Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDDA), (B) Poly[(9,9-bis(6′-N,N,N-trimethylammonium)hexyl)fluoren-alt-1,4-phenylen]bromid)] (PFP).

Die GNP (Typ A) wurden dazu in wässrigen Lösungen von PDDA mit unterschiedlicher Konzentration dispergiert und die Farbe der Dispersion fotografisch dokumentiert. Abhängig von der Konzentration des PDDA stellten sich dabei unterschiedliche Farben ein: von rosa-rot (reines

Wasser) über lila (ca. 2,5 % w/v PDDA) nach blau (ca. 10 % w/v PDDA). Diese mit bloßem Auge erkennbaren Effekte wurden spektroskopisch analysiert. In reinem Wasser zeigten die GNP den für Gold-Nanopartikel dieser Größe typischen Absorptionspeak bei ca. 520 nm, der die rote Farbe hervorrief. Mit steigender Konzentration an PDDA nahm dieser Peak ab und die Dispersion zeigte eine zunehmende Absorption im längerwelligen Bereich bis über 750 nm. Es kam zur Ausbildung eines neuen breiten Peaks, der sich zu längeren Wellenlängen verschob und für 20 % PDDA bei ca. 680 nm lag. Dadurch wurde die blaue Farbe der Dispersion hervorgerufen, die die fortschreitende Agglomeration der GNP anzeigte, s. Abb. 5.1.2.

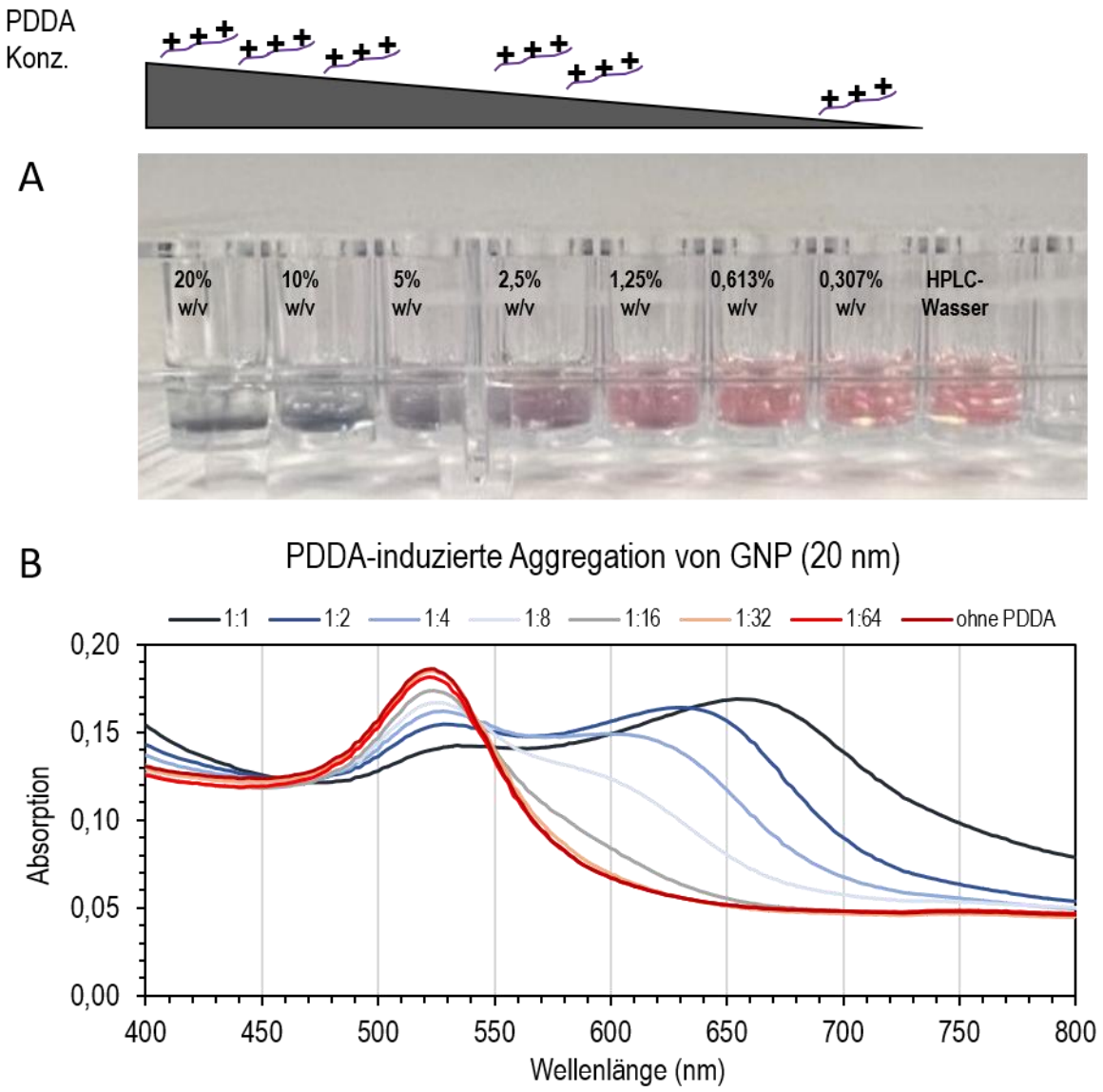


Abbildung 5.1.2: Einfluss der PDDA-Konzentration auf die optischen Eigenschaften wässriger GNP-Dispersionen. Die Farbe der GNP-Dispersion veränderte sich mit steigender PDDA-Konzentration von rosa-rot über lila nach blau (A). Das Absorptionsspektrum zeigte die Abnahme der Absorption bei 520 nm

und eine Verschiebung der Absorption in den langwelligen Bereich mit der Ausbildung eines Peaks bei 680 nm (B). Die eingesetzte Konzentration der GNP betrug ca. 1 nM, die photometrisch bestimmte Extinktion lag bei 0,2 (Meßwellenlänge 520 nm).

Als Polykation ist PDDA in der Lage, an DNA zu binden, was auf einer unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkung beruht. Eine Diskriminierung zwischen der Bindung an ssDNA (single stranded DNA, einzelsträngige DNA) und dsDNA (double stranded DNA, doppelsträngige DNA), wie sie für den Lösungsweg in diesem Projekt notwendig war, ist für dieses Polykation nicht berichtet. Im Gegensatz dazu zeigten Publikationen, dass das Polykation PFP zu einer solchen bevorzugten Bindung an ssDNA im Vergleich zu dsDNA in der Lage war. Daher wurde das Polykation PFP im Folgenden genauer untersucht und seine Wirkung auf die GNP charakterisiert. Die molare Konzentration des PFP wird pro Repeat Unit angegeben, 10 µM entsprachen ca. $6{,}4 \times 10^{-4}$ % (w/v). Bei einer Masse von > 10.000 g/mol (Herstellerangabe) bestand ein PFP-Molekül aus mindestens 15 Repeat Units.

Zur experimentellen Untersuchung des Einflusses von PFP auf die Dispersion von GNP wurden Dispersionen von GNP (Typ A) in unterschiedlicher Konzentration von 0,054 nM bis 5,4 nM hergestellt, um die Sichtbarkeit eines induzierten Farbwechsels mit bloßem Auge untersuchen zu können. Die Konzentration des PFP in diesen Dispersionen wurde ebenfalls variiert im Bereich 1 µM bis 1 mM. Es wurde festgestellt, dass GNP-Konzentrationen oberhalb von 1 nM eine mit dem bloßem Auge erkennbare Farbe und Farbänderung zeigten. Die GNP wiesen in reinem Wasser die typische rote Farbe auf, die mit steigender Konzentration an PFP eine Lila-Färbung annahm. Es wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Dispersion zusätzlich 150 mM NaCl enthielt. Diese Medienzusammensetzung stellte realistischere Bedingungen für nachfolgende Entwicklungsschritte dar, da sowohl enzymkatalysierte Reaktionen, wie auch die in diesem Projekt zu entwickelnden DNAzyme Anforderungen an gelöste Ionen im Reaktionsmedium stellten. Unter diesen Bedingungen zeigte die optische Auswertung, dass sich bei hohen Konzentrationen des PFP (0,1 – 1,0 mM) ein dunkles Sediment am Boden absetzte. Die Intensität der Färbung dieses Sediments korrelierte invers mit der Konzentration der GNP in der Dispersion. Die Farbänderung der Dispersion selbst war dagegen schwächer ausgeprägt als in reinem Wasser. Das zeigte, dass NaCl die Agglomeration beeinflusste und PFP mit GNP so große Agglomerate bildeten, dass diese in der Dispersion ausfielen, s. Abb. 5.1.3.

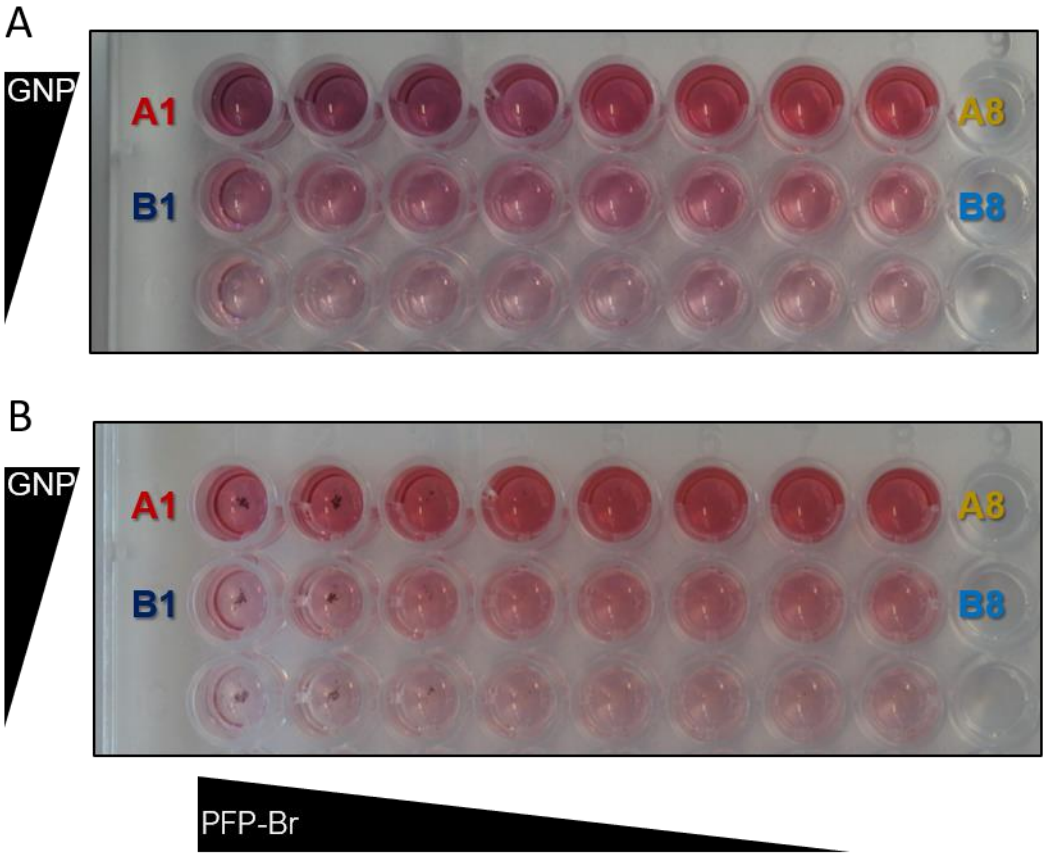


Abbildung 5.1.3: Einfluss der PFP-Konzentration auf die optischen Eigenschaften wässriger GNP-Dispersionen. Die Farbe der GNP-Dispersion in Wasser veränderte sich mit steigender PFP-Konzentration von rot zu lila (A). In 150 mM NaCl-Lösung bildete sich ein mit steigender Konzentration des PFP dunkles Sediment, während die Farbänderung der GNP-Dispersion weniger deutlich war (B). Die eingesetzte Konzentration der GNP betrug ca. 5 nM (Reihen A1) bzw. 1 nM (Reihen B1), Konzentration in Abstufungen von x1: 1 mM bis x8: 1 µM.

Die spektroskopischen Untersuchungen, s. Abb. 5.1.4, untermauerten diese Beobachtungen. Die GNP zeigten in Wasser den typischen Peak bei 520 nm, mit zunehmender PFP-Konzentration stieg die Absorption im längerwelligen Bereich bis ca. 750 nm an. Diese Zunahme war besonders deutlich im Bereich 580 – 650 nm, was die Lilafärbung erklärte. Die Spektren zeigten einen schnellen Anstieg nach der PFP-Zugabe und daraufhin über 24 Stunden geringe Änderungen. Das bedeutet, dass die Bindung sehr schnell erfolgte und die Dispersion danach stabil erhalten blieb. Die Dispersion mit 150 mM NaCl zeigte ein qualitativ ähnliches Verhalten, die Zunahme der Absorption war jedoch geringer als in Wasser. Das erklärte die schwächer ausgeprägte Farbänderung dieser Proben, s. Tab. 5.1.1.

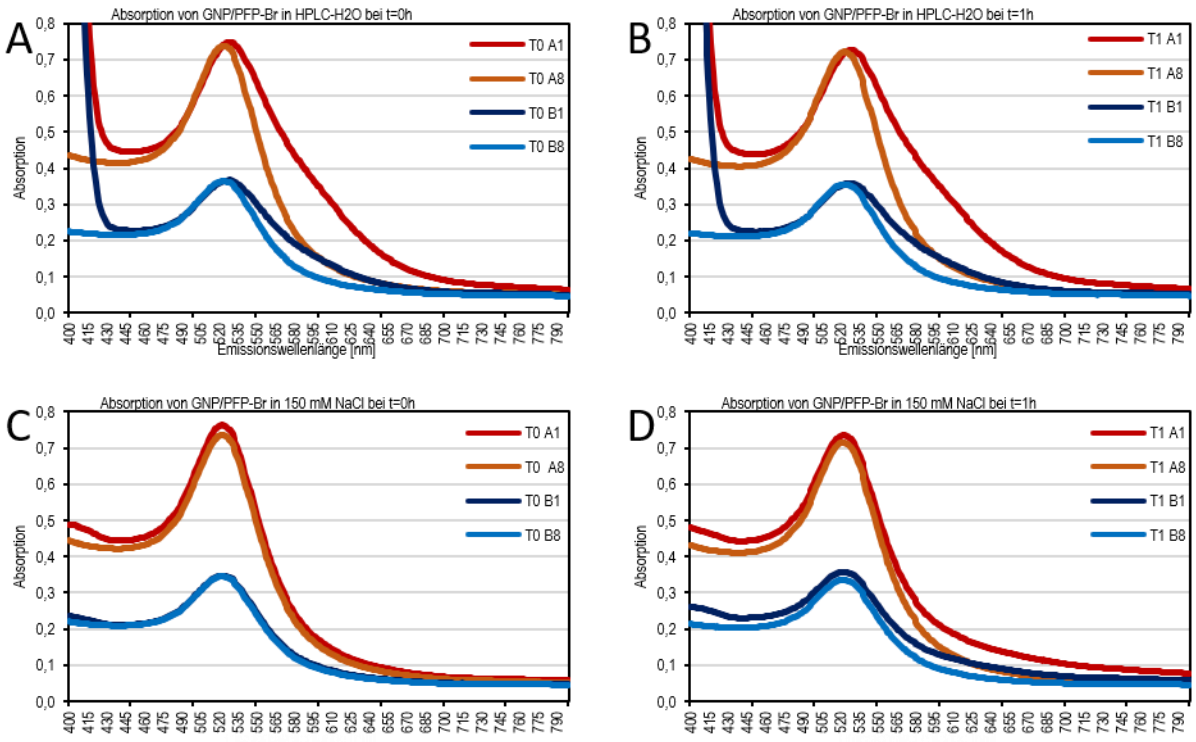


Abbildung 5.1.4: UV-Vis Spektren der GNP nach Zugabe von PFP: Die Spektren der GNP (Typ A) zeigten die typische Extinktion bei 520 nm, nach Zugabe von PFP nahm die Extinktion im Bereich 580 – 750 nm konzentrationsabhängig zu. Dieser Effekt war in Wasser stärker ausgeprägt (A, B) als in 150 mM NaCl (C, D). Die zeitabhängige Entwicklung ist nach 0 (A, C, Probenbezeichnung T0 xx) bzw. 1 Stunde (B, D, Probenbezeichnung T1 xx) dargestellt. A1/A8: PFP-Konzentration 1mM bzw. 1 µM.

Tabelle 5.1.1: UV-Vis Absorption der GNP nach Zugabe von PFP. In Wasser stieg die Absorption bei 610 nm nach PFP-Zugabe stark an und blieb zwischen 1 und 24 Stunden praktisch unverändert. In 150 mM NaCl war der Anstieg der Absorption deutlich geringer. Eingesetzt wurden 5,5 nM GNP und 1 mM PFP.

Absorption 610 nm	GNP-PFP in Wasser	GNP+PFP in 150 mM NaCl
Vor Zugabe	0,13	0,13
Direkt nach Zugabe	0,31	0,15
1 Stunde nach Zugabe	0,32	0,19
24 Stunden nach Zugabe	0,34	0,14

Für die optische Detektion der Farbänderung mit dem Auge ist ein deutlicher Farbwechsel von rot nach blau wünschenswert. Die eingesetzten GNP zeigen einen solchen Farbwechsel mit PFP nur sehr begrenzt. Des Weiteren war für die geplante Immobilisierung der DNA auf diesen GNP

eine Oberflächenfunktionalisierung notwendig, die eine adsorptive Bindung von DNA ermöglichte. Die eingesetzten GNP waren über Tensid-Moleküle in Dispersion stabilisiert, die auf der Oberfläche der GNP nicht-kovalent, aber sehr stark gebunden waren. Eine genaue Angabe zu der verwendeten Substanz machte der Hersteller nicht. Diese Stabilisatoren können durch Thiol-funktionalisierte Moleküle verdrängt werden (s. Abschnitt 5.8), würden aber eine adsorptive Bindung von DNA verhindern (Herstellerangabe). Um eine solche Bindung der Hairpin-Strukturen durchführen zu können, wurde nach einer Recherche verschiedener Anbieter ein anderer Typ GNP beschafft und untersucht. Dabei handelte es sich um GNP, die auf der Oberfläche Citrat-Ionen gebunden hatten. Diese stabilisieren die GNP in Dispersion durch ihre negative Ladung, können aber durch Moleküle wie DNA oder Proteine verdrängt werden (Herstellerangabe).

Für die folgenden Experimente wurden Citrat-stabilisierte GNP (Typ C) beschafft und Untersuchungen analog zu den beschriebenen durchgeführt, s. Abb. 5.1.5. Der Durchmesser der GNP betrug wieder 20 nm, sodass die optischen Eigenschaften (Farbe) der Primärpartikel vergleichbar bleiben zu den zuvor untersuchten. In Wasser suspendiert wiesen die GNP eine rote Farbe auf, die durch die starke Absorption bei 520 nm hervorgerufen wurde. Durch Zugabe von PFP wurde konzentrationsabhängig eine Farbänderung von rot über lila nach blau bewirkt, die insbesondere bei einer Konzentration von 5 nM GNP deutlich mit dem Auge erkennbar war. Der maximale Effekt wurde bei ca. 10 µM PFP erreicht, höhere Konzentrationen führten zu einer weniger intensiven Blaufärbung, es bildete sich eine lilafarbene Suspension. Dieser Effekt wurde durch die gemessenen Absorptionsspektren bestätigt, die eine Zunahme der Absorption bis zu 750 nm zeigten. Das spektrale Maximum lag für 10 µM PFP bei ca. 650 nm, entsprechend der blauen Färbung der Dispersion. Der beschriebene Effekt galt auch für niedrigere Konzentrationen an GNP, wobei für 1 nM GNP der größte Effekt bereits bei 1 µM PFP erreicht wurde und höhere PFP-Konzentrationen wieder schwächere Blautöne und Absorptionen bewirkten. Dieses Verhalten konnte erklärt werden durch die elektrostatische Stabilisierung der Citrat-beschichteten GNP. Das zugesetzte Polykation PFP band elektrostatisch an die Citrat-Ionen und neutralisierte deren Ladung, so dass diese agglomerierten. Wurde mehr PFP gebunden, erhielten die GNP eine positive Nettoladung, was wiederum zu einer Stabilisierung führte. Für kleinere GNP-Konzentrationen erfolgte diese Neutralisation bei niedrigeren PFP-Konzentrationen.

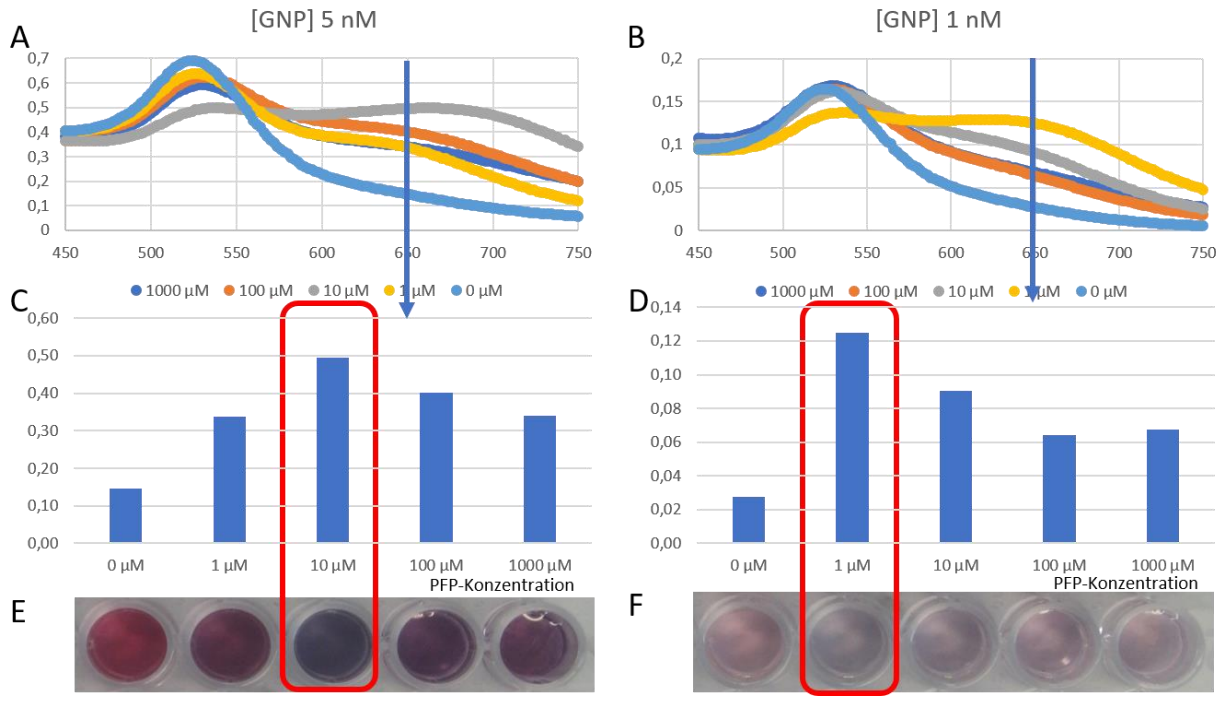


Abbildung 5.1.5: Farbveränderungen und UV-Vis Spektren der GNP nach Zugabe von PFP: Die Spektren der GNP (Typ C) zeigten die typische Extinktion bei 520 nm (A: 5 nM GNP, B: 1 nM GNP), nach Zugabe von PFP nahm die Extinktion konzentrationsabhängig im Bereich 580 – 750 nm zu. Die Konzentration des PFP betrug 0 – 1000 µM. Die Extinktion bei 650 nm als Indikator der Agglomeration der GNP zeigte ein Maximum bei 10 µM PFP (für 5 nM GNP, C, E) bzw. bei 1 µM PFP (für 1 nM GNP, D, F). Die optimale Konzentration des PFP, die zur optisch deutlichsten Agglomeration der GNP führte, stieg mit zunehmender Konzentration an GNP (E, F) an.

5.2 Auswahl des DNAzyms DNAse B

Zur Auswahl eines geeigneten DNAzyms mit DNase-Aktivität wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Die Evaluation und Auswahl der DNAzym-Kandidaten berücksichtigte insbesondere die enzymatische Aktivität und die Größe. Die Aktivität ist das entscheidende Kriterium, um einen hohen Umsatz zu erzielen, das heißt, Substratmoleküle zu spalten und damit die stabilisierenden DNA-Moleküle von den GNP zu entfernen. Die Größe – angegeben in Nukleotiden – ist relevant für die spätere Entwicklung des Matrizen-Stranges, und sollte möglichst klein sein. Das lag darin begründet, dass die Synthese der Tandem-DNAzyme Einheiten mit zunehmender

Größe länger dauert. Das DNAzym I-R3 wies eine hohe Aktivität auf und war mit 40 Nukleotiden relativ klein, so dass diese DNAse für die weiteren Experimente ausgewählt wurde.

I-R3 GTCAGAAAGATAATCTAGTTGAGCTGTCTGCATCACGAGT

Substrat ACTCGTGATGCAGACGTTGAAGGATTATCTTTCTGAC

Hinsichtlich der Substratstruktur sind durch die Spezifität des jeweiligen DNAzyms bestimmte Vorgaben definiert, die die zu spaltenden Sequenz betreffen sowie die Bindung zwischen DNAse und Substrat ermöglichen. Unterschiedliche Sequenzen sind ebenfalls in der Literatur veröffentlicht und ein geeignetes Substrat wurde ausgewählt und kommerziell beschafft, s. Abb. 5.2.1.

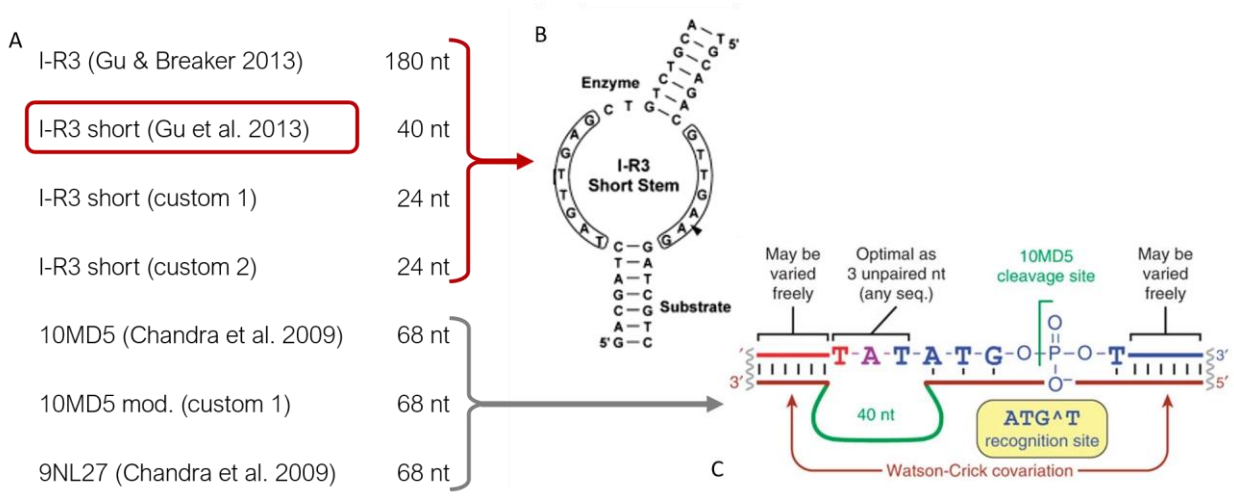


Abbildung 5.2.1: Auswahl des DNAzyms DNAse B: Eine Literaturrecherche zu geeigneten DNAzymen ergab 4 Kandidaten, von denen weitere 3 Modifikationen im Rahmen dieses Projekts entwickelt wurden (A). Diese bilden 2 strukturell verwandte Gruppen (B, C). Die Struktur (B) weist einen katalytischen Bereich auf, in dem die DNA-Sequenzen des DNAzyms und des Substrats einzelsträngig vorliegen. Dieser ist durch zwei Bereiche zur Substratbindung flankiert, die über komplementäre Basenpaare das Substrat in räumliche Nähe und geeignete Position bringen. Die für die katalytische Aktivität notwendigen und damit konservierten Basen sind umrandet, die Spaltung des Substrats erfolgt an der mit einem Pfeil markierten Position. Die Nukleotide, die zur Substratbindung dienen, sind variabler und ermöglichen eine Anpassung. Für die weiteren Untersuchungen wurde das DNAzym I-R3 short als Basis gewählt (rot markiert).

5.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die DNAse B

Sowohl der pH-Wert als auch die Art und Konzentration von Metallionen spielen eine entscheidende Rolle für die korrekte Konformation und Funktionalität der DNAzyme. Insbesondere Metallionen, die als Kofaktoren direkt an der katalytischen Reaktion beteiligt sind, müssen in der geeigneten Konzentration vorhanden sein. Daher wurden verschiedene Metallionen hinsichtlich ihrer Bedeutung für die katalytische Aktivität des DNAzyms untersucht. So wurden NaCl, $MgCl_2$, $ZnCl_2$ in unterschiedlichen Konzentrationen zu sonst konstant gehaltenen Reaktionsmischungen zugesetzt und die Menge an umgesetztem Substrat gemessen, s. Abb. 5.3.1 und Abb. 5.3.2. Dazu wurden Reaktionen für 1, 4 sowie 24 Stunden durchgeführt und am Ende die Menge des noch nicht umgesetzten Substrats bestimmt, s. Abb. 5.3.1. Für Zn^{2+}, das als Kofaktor eine besondere Bedeutung hat, wurde festgestellt, dass bei einer Konzentration von 1 mM nach 1 bzw. 4 Stunden 62-64 % nicht umgesetztes Substrat verblieben, selbst nach 24 Stunden verblieben 54 %. Bei einer Konzentration von 2 mM Zn^{2+} blieben 48 bzw. 20 % zurück, nach 24 Stunden sank dieser Anteil auf 4 %. Wurden 4 mM Zn^{2+} eingesetzt, verblieben 13 bzw. 8 % nicht umgesetzt, nach 24 Stunden war das Substrat vollständig umgesetzt. Basierend auf diesen Daten wurden für die folgenden Reaktionen 4 mM $ZnCl_2$ eingesetzt. Im Fall von Mg^{2+} zeigte sich bei einer Konzentration von 40 mM der höchste Substratumsatz. Für NaCl wurden 100 mM als optimale Konzentration ermittelt. Weitere experimentelle Arbeiten zur Optimierung der Aktivität von DNAase B umfassten die Optimierung des pH-Werts und des DNAzym-Substrat-Verhältnisses, s. Abb. 5.3.3.

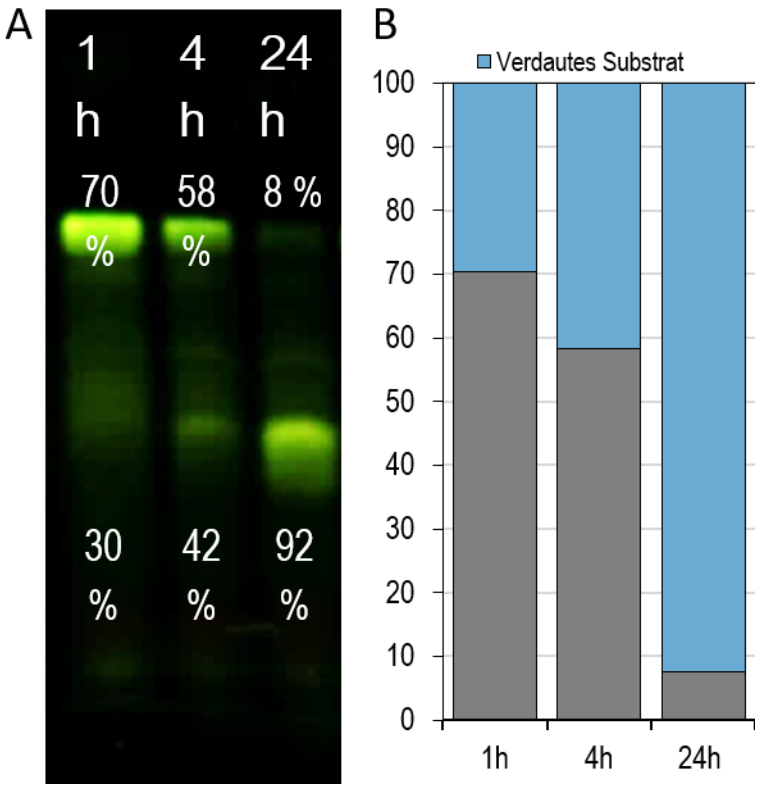


Abbildung 5.3.1: Auswertung des Substratumsatzes: Veranschaulichung der Methode zur Bestimmung des Substratumsatzes. DNAzym und Substrat werde für definierte Zeiten zur Reaktion gebracht (1, 4, 24 h) und danach gelelektrophoretisch analysiert (A). Die DNA wurde dazu mit einem Farbstoff angefärbt, dessen Fluoreszenzintensität von der DNA-Menge abhing. Das ungeschnittene Substrat wies eine größere Länge auf (A, Banden oben) als das geschnittene Produkt (A, Banden unten) und migriert daher im elektrischen Feld langsamer als kurze DNA-Segmente. Die Fluoreszenzintensität der Banden wurde ausgewertet und relativ zur Gesamtintensität der jeweiligen Probe dargestellt (B). Sie entsprach damit den relativen Anteilen des ungeschnittenen und verdauten Substrats (Produkt). In gleicher Weise wurden die Reaktionsbedingungen des DNAzyms getestet und optimiert.

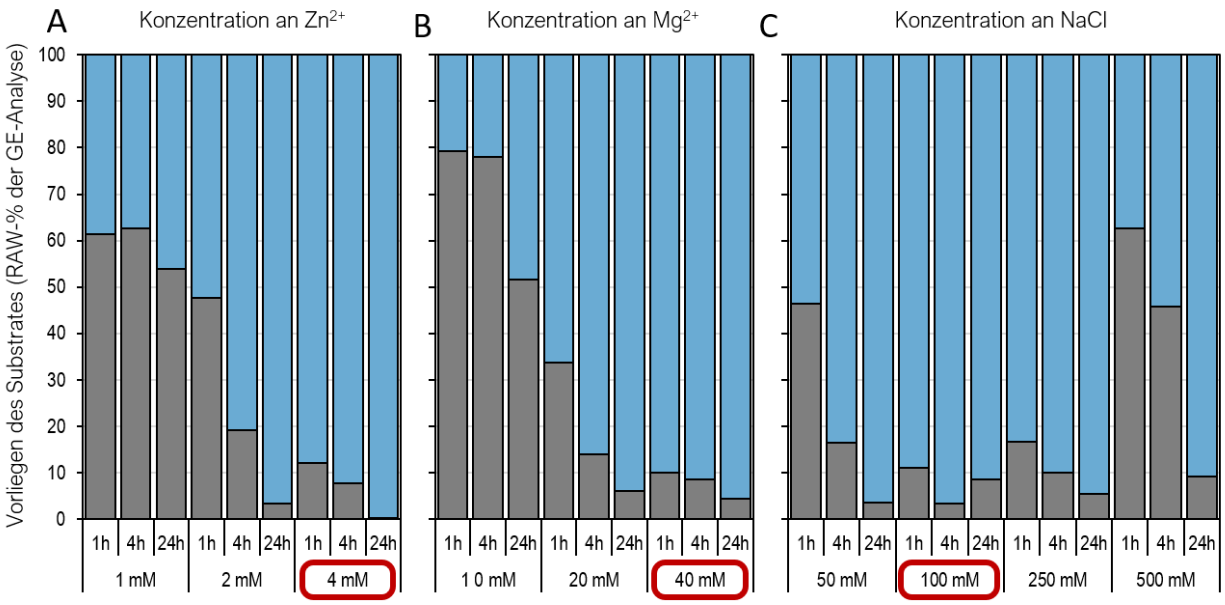


Abbildung 5.3.2: Optimierung der Reaktionsbedingungen der DNAzyms B: Die in Abb. 5.3.1 erläuterte Methode wurde verwendet, um den Substratumsatz des DNAzyms B (I-R3) unter verschiedenen Reaktionsbedingungen zu evaluieren. Dazu wurden die Konzentrationen vom $ZnCl_2$ (A), $MgCl_2$ (B) sowie NaCl (C) variiert und so die Konzentrationen ermittelt, bei denen der Substratumsatz maximal war (rot markiert). Die Ergebnisse ergaben, dass die optimalen Bedingungen 100 mM NaCl, 40 mM $MgCl_2$ sowie 4 mM $ZnCl_2$ waren.

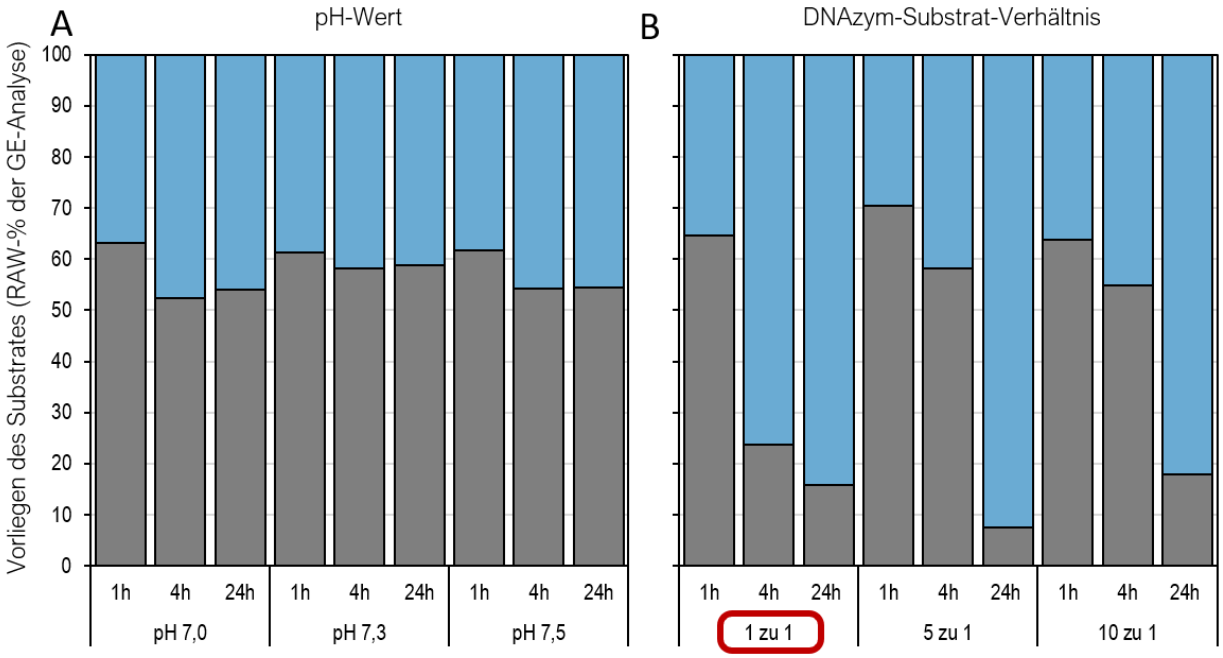


Abbildung 5.3.3: Optimierung pH-Wert und DNAzym-Substrat-Verhältnis: Die in Abb. 5.3.1 erläuterte Methode wurde weiterhin genutzt, um die Auswirkungen des pH-Wertes zu evaluieren. Es wurde festgestellt, dass im Bereich pH 7,0 bis 7,5 keine signifikanten Auswirkungen auf den Substratumsatz vorlagen (A). Weiterhin wurde das Verhältnis DNAzym : Substrat im Bereich 1:1 – 10:1 variiert (B). Auch bei einem höheren Anteil an DNAzym wurde der Substratumsatz nicht erhöht. Das zeigte, dass bereits bei einem 1:1 Verhältnis das Substrat vollständig von DNAzym-Molekülen gebunden wurde und keine freien Substratmoleküle im Medium vorlagen, die bei einer höheren DNAzym-Konzentration zusätzlich bzw. schneller umgesetzt würden. Für eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist ein 1:1 Verhältnis ausreichend (rot markiert).

5.4 Einfluss des Reaktionsmediums (Salzkonzentration) auf die GNP

Für das DNAzym I-R3 wurde festgestellt, dass sowohl NaCl als auch $MgCl_2$ in einer signifikanten Konzentration von 100 mM bzw. 40 mM notwendig waren, um die enzymatische Aktivität zu gewährleisten. Zinkionen sind für die enzymatische Aktivität essentiell aber ihre benötigte Konzentration in Höhe von 4 mM war relativ gering. Insbesondere für elektrostatisch stabilisierte Nanopartikel spielen die gelösten Ionen eine wichtige Rolle für die Stabilisierung der Dispersion, da sie die auf der Oberfläche lokalisierten Ladungen abschirmen [72]. Für die durch Citrat stabilisierten GNP (Typ C) traf das zu, daher wurde deren Dispersion mit NaCl versetzt und untersucht, unter welchen Bedingungen die GNP agglomerierten. Die Proben wurden sowohl visuell abgemustert als auch spektroskopisch analysiert, s. Abb. 5.4.1. Wie zuvor dargelegt wiesen einzeln dispergierte GNP eine Absorption bei ca. 530 nm auf, welche mit zunehmender Agglomeration abnahm.

Ab 90 mM NaCl kam es direkt nach Zugabe zu einer Abnahme der Absorption. Auch visuell war erkennbar, dass die Dispersion klar wurde bzw. die rötliche Farbe abnahm. Für NaCl Konzentrationen bis 70 mM zeigten sich unmittelbar nach NaCl-Zugabe keine Veränderungen, nach 120 min Inkubation waren GNP in 25 mM NaCl stabil dispergiert, für 50 mM NaCl kam es zu einer Abnahme der Absorption, die auch visuell erkennbar war. Höhere NaCl Konzentrationen führten jeweils zu einer so deutlichen Abnahme der Absorption, dass die Dispersion praktisch farblos wurde. Das zeigte, dass die GNP unter diesen Bedingungen stark agglomerierten und sedimentierten, s. auch Abb. 5.4.2.

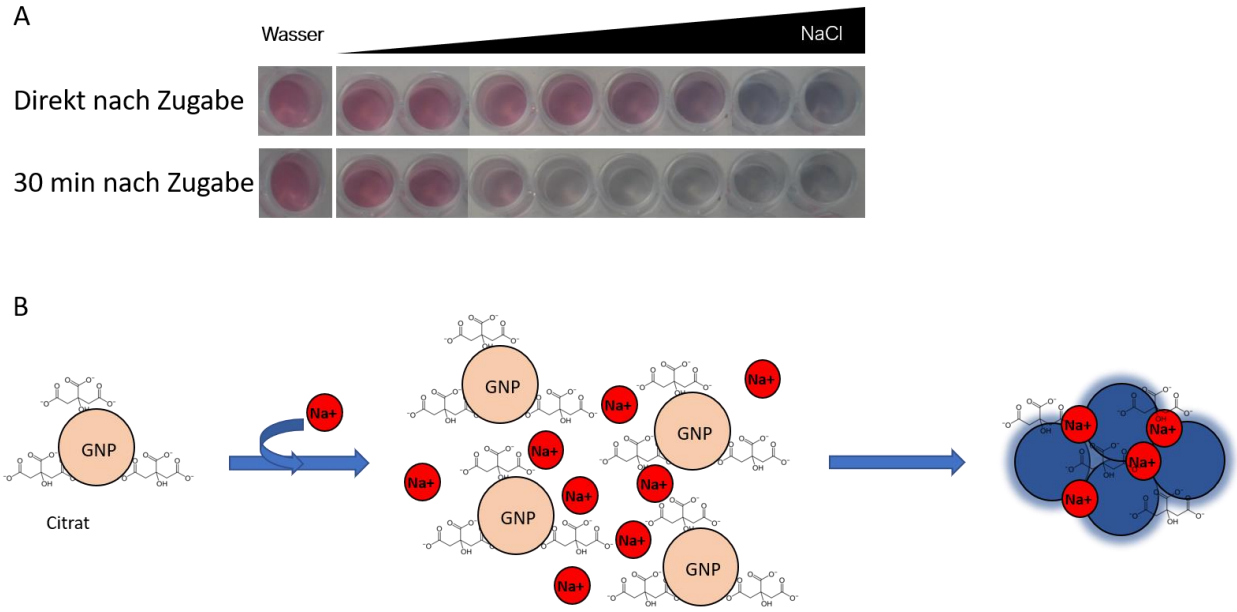


Abbildung 5.4.1: Einfluss von gelösten Salzen auf die Stabilität der GNP-Dispersion: Die mit Citrat funktionalisierten GNP (Typ C) waren insbesondere durch deren negative Ladung elektrostatisch in Dispersion stabilisiert. Gelöste Kationen konzentrierten sich in der direkten Umgebung dieser GNP und reduzierten so die elektrostatische Abstoßung zwischen einzelnen GNP. Das führte abhängig von der Konzentration der Gegenionen (hier Natrium) zur Agglomeration der GNP (A). Schematische Darstellung (B).

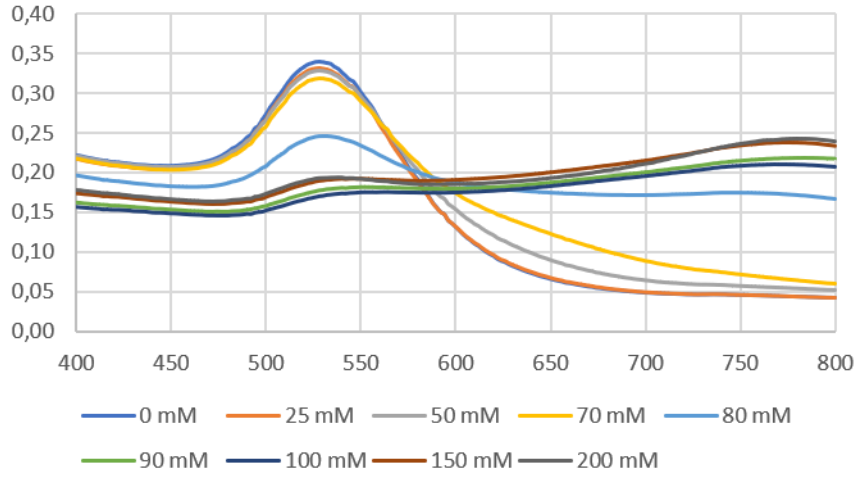


Abbildung 5.4.2: Extinktionsspektren der GNP abhängig von der NaCl-Konzentration. Die Dispersionen der GNP (Typ C) wiesen abhängig von der NaCl-Konzentration eine Abnahme der Extinktion bei 530 nm und eine Zunahme im Bereich 600 – 800 nm auf. Dieser Effekt trat ab 80 mM NaCl verstärkt auf und zeigte die zunehmende Agglomeration der GNP an. Die Konzentration der GNP betrug 1 nM.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Citrat-Ionen die GNP bis ca. 50 mM NaCl stabilisieren konnten, bei höheren Salzkonzentrationen kam es graduell zu einer Agglomeration. Beim geplanten Lösungsweg sollten die GNP durch zusätzlich gebundene DNA Moleküle in Dispersion stabilisiert werden, welche durch ihre hohe Ladungsdichte eine stärkere Wirkung haben können als es für die Citrat-Ionen der Fall war. Das wurde experimentell untersucht und bestätigt: dazu wurden die GNP (1 nM) mit DNA (110 nM) in 10 mM NaCl bei pH 7,5 für 15 min inkubiert, s. Abb. 5.4.3. Zum Vergleich wurden 2 DNA-Proben eingesetzt: a) ein Hairpin sowie b) die entsprechende gespaltene einzelsträngige DNA:

a) Hairpin ACGCTCTCGTGCAAATGTTGAAGGATCGTCAGAGAGCGG

b) ssDNA ACGCTCTCGTGCAAATGTTGA

Bei 70 mM NaCl waren alle GNP direkt nach Salzzugabe stabil dispergiert, unabhängig von den auf der Oberfläche gebundenen Stabilisatoren. Verglich man aber die Dispersionen nach 90 min Inkubation in NaCl-Lösung miteinander, so wurde deutlich, dass die mit DNA funktionalisierten GNP eine deutlich höhere Stabilität aufwiesen als die mit Citrat funktionalisierten GNP. Dabei zeigten die mit ssDNA stabilisierten GNP die höchste Absorption.

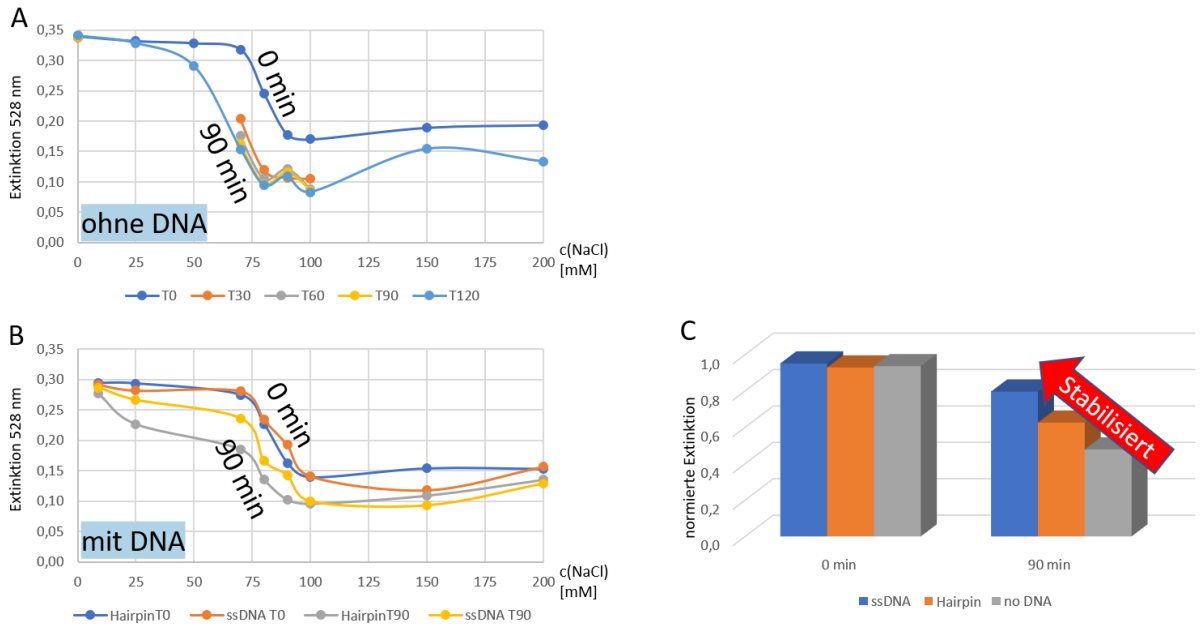


Abbildung 5.4.3: Stabilisierung der GNP durch DNA. Die Stabilität der mit Citrat (A) oder DNA (B) stabilisierten GNP (Typ C) wurde getestet in Abhängigkeit von verschiedenen NaCl-Konzentrationen (25 – 200 mM). Dazu wurde die Extinktion der GNP bei 528 nm gemessen direkt nach Zugabe der NaCl-Lösung sowie nach 30, 60, 90 sowie 120 Minuten. Die Citrat-stabilisierten GNP (A) zeigen direkt nach Zugabe (T0) eine gleichbleibend hohe Extinktion von ca. 0,33 bis 70 mM NaCl, was eine stabile Dispersion der GNP belegte. Ab 80 mM NaCl nahm die Extinktion auf 0,17 ab und blieb weitgehend konstant bei höheren NaCl-Konzentrationen, was eine Agglomeration anzeigte. Mit zunehmender Inkubationszeit trat die Agglomeration auch bei niedrigeren NaCl-Konzentrationen auf, was die übrigen Messdaten verdeutlichten (A). Die mit DNA funktionalisierten GNP zeigten qualitativ ein ähnliches Verhalten (B), allerdings waren diese GNP besser stabilisiert und wiesen bei gleichen NaCl-Konzentrationen noch höhere Extinktionswerte auf. Die beschriebene Abnahme der Extinktion fand bei höheren NaCl-Konzentrationen statt, so dass die Kurven nach rechts verschoben waren (B). Während direkt nach NaCl-Zugabe die Werte praktisch gleich waren, war bei 70 mM NaCl nach einer Inkubationszeit von 90 min die Extinktion der Citrat-stabilisierten GNP deutlich gesunken, die DNA-stabilisierten GNP wiesen eine höhere Extinktion auf, wobei die besten Werte von den mit ssDNA funktionalisierten GNP erreicht wurden (C).

5.5 Design der DNA-Hairpins

Die GNP sollten durch auf der Oberfläche gebundene DNA-Hairpins stabilisiert werden, die durch die entwickelte DNAse B geschnitten und darauf hin entfernt werden sollten. Für die Entwicklung dieser Hairpins war es essentiell, zuerst die Sequenzen festzulegen, die für das eingesetzte DNAzym spezifisch waren. Diese Sequenzen, die selbst geschnitten werden oder die Substratbindung an das DNAzym gewährleisten, mussten im Loop-Bereich des Hairpins eingebaut werden, so dass sie als einzelsträngige DNA vorlagen. Dafür wurde zuvor folgende Sequenz als geeignet bestimmt:

ACTCGTGATGCAGACGTTGAAGGATTATCTTTCTGAC

Der Stem-Bereich des Hairpins wurde dahin gehend designt, dass die doppelsträngige DNA unter Reaktionsbedingungen (30 °C) als Hairpin gebunden blieb, allerdings nach Hydrolyse der Spaltsequenz im Loop dissoziieren konnte. Dazu wurden *in silico* Untersuchungen durchgeführt und dabei sowohl der Einfluss der Länge des Stem überprüft als auch der GC-Gehalt in dieser Region variiert. Auf diese Weise wurden 5 Oligonukleotide entworfen, deren Stabilität den Bereich von -4,30 kcal/mol bis -6,80 kcal/mol (Bindungsenthalpie ΔG) abdeckten. Abb. 5.5.1.

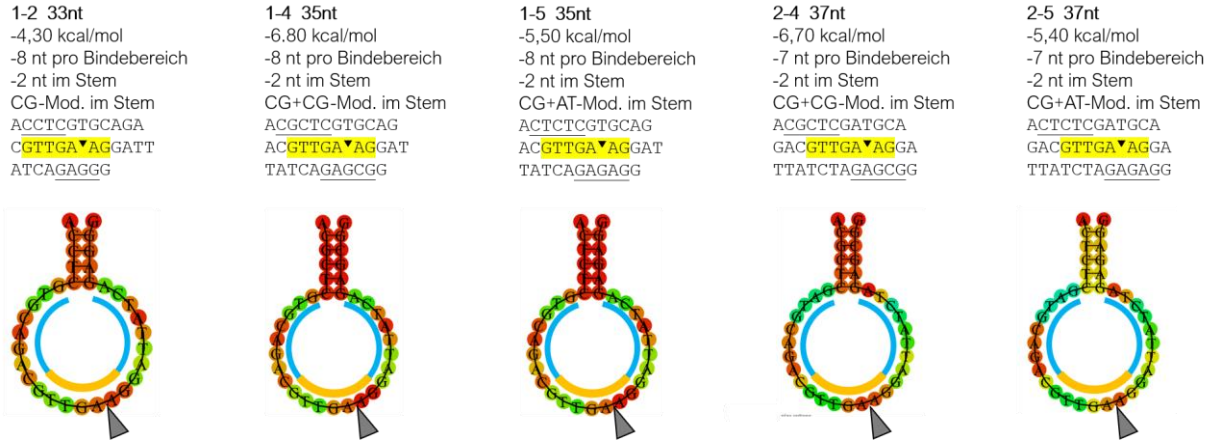


Abbildung 5.5.1 Design der DNA-Hairpins. Die Hairpin-Strukturen wurden mit einer konstanten Sequenz in der Loop-Region designt, die das Substrat des DNAzyms darstellte. Die Spaltstelle ist durch einen Pfeil markiert. Der Stem-Bereich umfasste den doppelsträngigen Bereich, der durch die unterschiedliche Basenzusammensetzung die Stabilität (gemessen in kcal/mol) und damit die Schmelztemperatur der Hairpins bestimmte.

5.6 Einfluss des Polyelektrolyts auf die Struktur der DNA in Lösung

Die komplementären Stränge einer dsDNA werden oberhalb der Schmelztemperatur in Einzelstränge aufgeschmolzen. Die Hairpin-Struktur der DNA bewirkt eine zusätzliche Stabilisierung, da die beiden generierten Einzelstränge in enger räumlicher Nähe verbleiben und rehybridisieren können. Daher können Hairpins im Bereich der Schmelztemperatur zumindest zeitweise als Doppelstrang vorliegen, während 2 Einzelstränge gleicher Basensequenz bereits dauerhaft als ssDNA vorliegen. Das Polykation PFP bindet insbesondere an ssDNA und stabilisiert diese Form der DNA gegenüber der entsprechenden dsDNA Form. Dieser Effekt ist untersucht worden, um zu evaluieren, welche Länge eine komplementäre DNA Sequenz aufweisen muss, damit diese dsDNA auch in Gegenwart von PFP stabil bleibt. Folgende DNA-Moleküle wurden untersucht:

Verwendete DNA-Oligos:

- AVB #20, 33mer, GAATCCCCTTAATAATGAACAATGAGCCTTTAT +
- AVB #21, 33mer, ATAAAGGCTCATTGTTCATTATTAAGGGGATTC, komplementär zu #20, 33 bp
- AVB #44, 39mer, ACGCTCTCGTGCAAATGTTGAAGGATCGTCAGAGAGCGG, Hairpin 7 bp
- AVB #50, 21mer, ACGCTCTCGTGCAAATGTTGA, Schnittprodukt Hairpin #44, 7 bp +
- AVB #51, 18mer, AGGATCGTCAGAGAGCGG, Schnittprodukt Hairpin #44, 7 bp

Als Methode wurde ein Fluoreszenz-basierter Assay verwendet. Der DNA-bindende Farbstoff SYBR Green ist in der Lage, sowohl an ssDNA als auch an dsDNA zu binden. Während der freie Farbstoff in Wasser praktisch keine Fluoreszenz aufweist, steigt seine Fluoreszenzintensität im Komplex mit DNA signifikant an, so dass das gemessene Signal ausschließlich auf DNA-gebundenen Farbstoff zurückgeht. Die emittierte Fluoreszenzwellenlänge ist abhängig von der gebundenen DNA, so dass für ssDNA eine längerwellige Fluoreszenz emittiert wird als für dsDNA. Dieser Effekt wurde hier ausgenutzt, um die Struktur der DNA zu untersuchen und Veränderungen durch die Bindung des PFP zu evaluieren, s. Abb. 5.6.1.

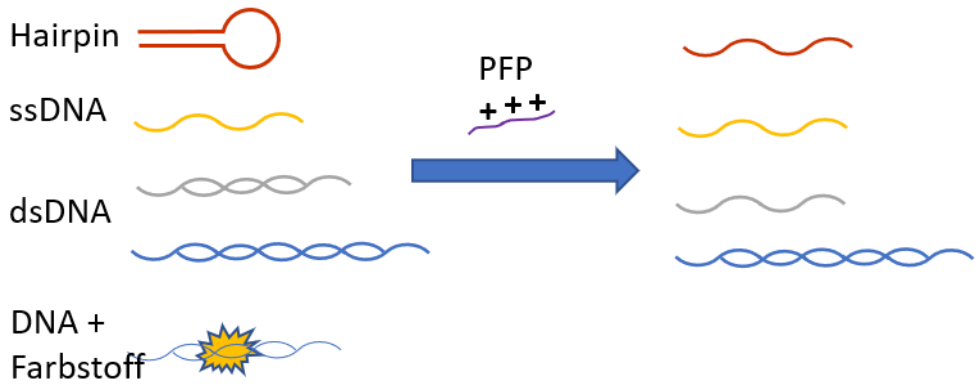


Abbildung 5.6.1: Einfluss des PFP auf die DNA-Struktur. Das Polykation PFP ist in der Lage, DNA zu binden und dabei die Struktur zu beeinflussen. Die in dem Schema veranschaulichte Hypothese sollte experimentell verifiziert werden: PFP band an alle DNA-Moleküle und senkte damit die Fluoreszenzintensität des an der DNA gebundenen Farbstoffs SYBR Green. Kurze dsDNA mit niedriger Bindungsenergie wurde durch die Bindung von PFP in ssDNA aufgeschmolzen (Hairpin, dsDNA grau). Längere dsDNA blieb in doppelsträngiger Form erhalten (dsDNA blau), da die hohe Bindungsenergie nicht aufgebracht werden konnte.

Zur experimentellen Untersuchung wurden jeweils 0,1 µM DNA (bezogen auf Basen bzw. Basenpaare) mit 1 µM SYBR Green in einer wässrigen Lösung mit 5 mM NaCl inkubiert und Fluoreszenzspektren bei einer Anregungswellenläge von 475 nm gemessen, s. Abb. 5.6.2, s. Tab. 5.6.1. Vor Zugabe des PFP zeigten die beiden Proben mit dsDNA (33 bp und 7 bp) einen vergleichsweise hohe Fluoreszenzintensität von ca. 450 AU („arbitrary units“, relative Fluoreszenzeinheiten) während die Hairpin DNA 300 AU und die ssDNA 250 AU aufwiesen. Das ist durch den stärkeren Anstieg der Fluoreszenz von SYBR Green gebunden an dsDNA verglichen mit ssDNA begründet. Die Emissionsmaxima lagen für dsDNA (33 bp) bei 534 nm, für ssDNA bei 537 nm und für den Hairpin bei 549 nm. Nach Zugabe von 50 µM PFP kam es bei allen Proben zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt war am stärksten ausgeprägt bei der kurzen dsDNA (7 bp) sowie der ssDNA. Die Emissionswellenläge der dsDNA mit 33 bp blieb unverändert bei 534 nm, während alle anderen Proben eine deutliche Verschiebung zu längeren Wellenlängen aufwiesen: ssDNA 552 nm, Hairpin 555 nm, dsDNA 558 nm. Das zeigte, dass die mit 33 bp lange und stabile dsDNA als Doppelstrang erhalten blieb, die übrigen DNA-Moleküle stärker mit PFP interagierten und teilweise oder vollständig in ssDNA überführt wurden. Das galt auch für den mit 7 bp und einer Bindungsenthalpie von -11,3 kcal/mol als relativ stabil eingeschätzten Hairpin.

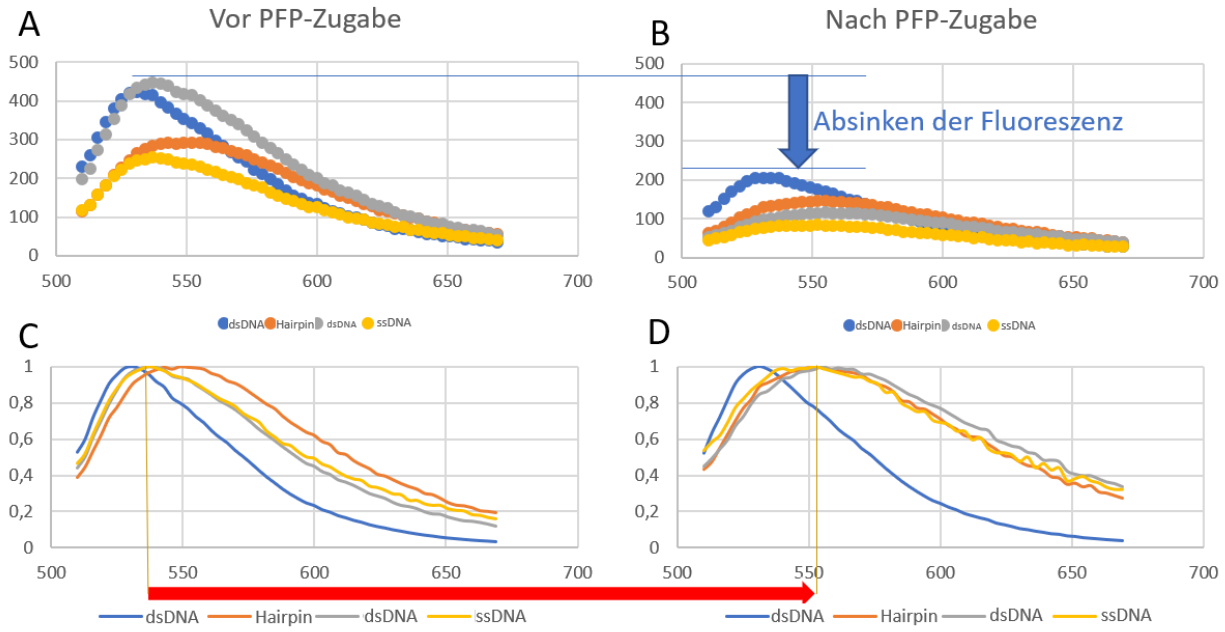


Abbildung 5.6.2: Einfluss von PFP auf die Fluoreszenzintensität der DNA. Die PFP-Zugabe führte zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität der mit SYBR Green gefärbten DNA (A, B). Dies galt für alle 4 untersuchten DNA-Proben und belegte die Wechselwirkung des PFP mit den DNA-Molekülen. Das Maximum der Fluoreszenzintensität von SYBR Green lag abhängig von der Struktur der DNA bei 534 nm (dsDNA) und 549 nm (Haipin). Nach Zugabe des PFP verschob sich dieses Maximum für die drei Proben ssDNA, dsDNA (kurz) sowie den Hairpin zu längeren Wellenlängen, für die dsDNA (lang) blieb das Maximum unverändert (C, D, Spektren normiert). Y-Achse: „arbitrary units“, AU, relative Fluoreszenzeinheiten.

Tabelle 5.6.1: Einfluss von PFP auf die Fluoreszenzintensität der DNA. Die PFP-Zugabe führte zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität der mit SYBR Green gefärbten DNA. Das Ausmaß der Abnahme war abhängig von der Struktur der DNA.

DNA	Fl-Intensität nach PFP Zugabe
dsDNA 33 bp	46 %
Hairpin	49 %
dsDNA 7 bp	26 %
ssDNA 7b	33 %

In einem weiteren Schritt wurde dieses Experiment in gleicher Weise mit 50 mM NaCl im Reaktionsmedium durchgeführt, um den Einfluss einer größeren Konzentration an gelösten Salzen zu untersuchen. Unter diesen Bedingungen wurde festgestellt, dass sowohl die Fluoreszenzintensität durch Zugabe von PFP nicht absank, als auch die Emissionswellenlängen unverändert blieb.

Beides war ein deutlicher Beleg dafür, dass NaCl schon in geringfügig erhöhter Konzentration von 50 mM die zuvor beschriebene Wechselwirkung von PFP und DNA beeinflusste, s. Abb. 5.6.3.

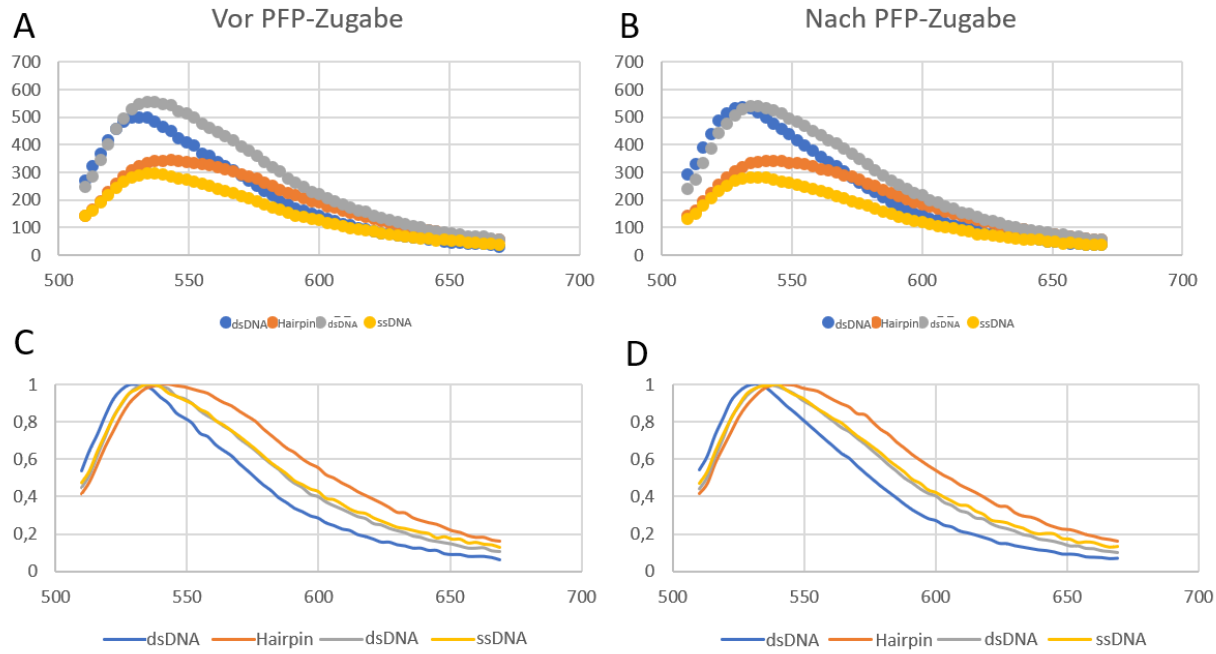


Abbildung 5.6.3: Einfluss von PFP auf die Fluoreszenzintensität der DNA in NaCl-haltigem Medium. In Gegenwart von 50 mM NaCl führte die PFP-Zugabe zu keiner Abnahme der Fluoreszenzintensität der mit SYBR Green gefärbten DNA (A, B). Dies galt für alle 4 untersuchten DNA-Proben und zeigte an, dass die in Wasser auftretende Wechselwirkung unter diesen Bedingungen nicht auftrat. Das Maximum der Fluoreszenzintensität von SYBR Green lag abhängig von der Struktur der DNA bei 534 nm (dsDNA) und 543 nm (Haipin). Nach Zugabe des PFP blieb die in Wasser beobachtete Verschiebung zu längeren Wellenlängen aus (C, D, Spektren normiert). Y-Achse: „arbitrary units“, AU, relative Fluoreszenzeinheiten.

5.7 Einfluss des Reaktionsmediums auf die Löslichkeit des Polyelektrolyts

Die Reaktion von PFP mit DNA wurde durch gelöstes NaCl gestört, daher wurde untersucht, welchen Einfluss Salze wie NaCl auf das eingesetzte Polymer PFP haben. Die drei aromatischen Ringe sowie die zwei aliphatischen C_6-Ketten pro Monomer verleihen dem PFP eine hydrophobe Struktur, die in einer geringen Wasserlöslichkeit resultiert. Daher werden wässrige Lösungen von PFP mit 1 % DMSO oder anderen organischen Lösungsvermittlern versetzt. Aufgrund seiner Molekülstruktur zeigt PFP weiterhin eine optische Absorption im Bereich 350 – 400 nm und eine korrespondierende Fluoreszenz im Bereich 400 – 480 nm. Die hydrophoben Eigenschaften des PFP können zu einer Aggregation des Polymers führen, was die Absorption sowie die Fluoreszenzintensität senkt. Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um die Menge an gelöstem PFP unter den für die Reaktion relevanten Bedingungen zu messen.

Eine Lösung von 50 µM PFP in 5 mM HEPES pH 7,5 wurde hinsichtlich ihrer Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften vermessen. Dabei wurden sowohl die Konzentrationen an NaCl als auch die Konzentration an DMSO systematisch variiert, um die Löslichkeit des PFP zu evaluieren. Es zeigte sich, dass PFP bei 0 mM NaCl eine ausgeprägte Absorption aufwies und eine DMSO-Zugabe hier keine signifikante Steigerung bewirkte. Auch die Fluoreszenzintensität war hoch und wurde durch DMSO-Zugabe erst ab einer Konzentration von 10 % geringfügig gesteigert. Eine NaCl-Konzentration von 5 mM führte bereits zu einer drastischen Abnahme der Absorption, nur die Lösung mit 10 % DMSO zeigte einen kleinen Peak bei 380 – 400 nm. Die Fluoreszenzintensität sank ebenfalls stark ab, hier zeigte sich allerdings, dass die Werte mit der DMSO Konzentration korrelierten. Bei höheren NaCl Konzentrationen von 50 mM sowie bei dem Reaktionspuffer, der für das DNAzym notwendig war, war die Fluoreszenzintensität auf unter 1 % gesunken, eine DMSO Zugabe hatte nur eine geringe Steigerung zur Folge. Diese Ergebnisse zeigten, dass PFP unter den für die Reaktion notwendigen Bedingungen praktisch unlöslich war. Bereits zuvor war experimentell ermittelt worden, dass PFP in Wasser DNA binden und die DNA-Struktur hin zu ssDNA verändern kann, nicht jedoch in 50 mM NaCl. Diese Ergebnisse konnten durch die hier gewonnenen Daten erklärt werden, s. Abb. 5.7.1.

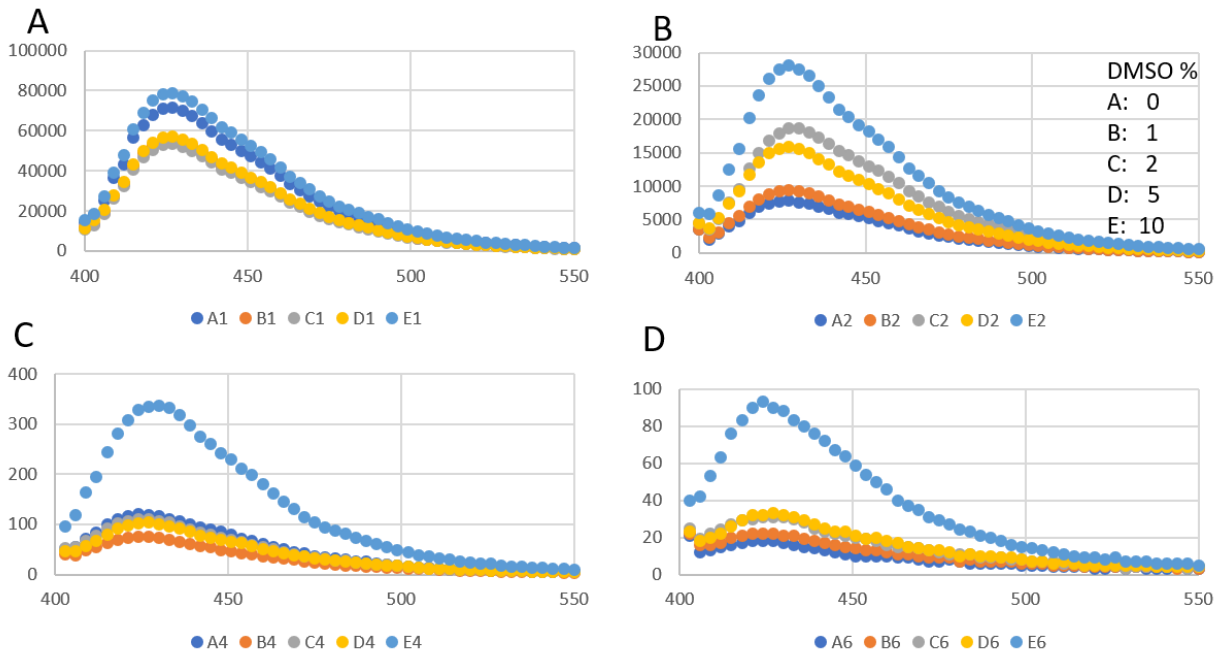
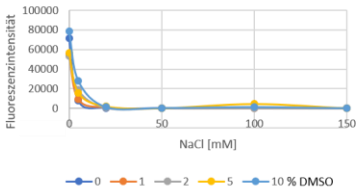


Abbildung 5.7.1: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Fluoreszenz des PFP. Die Fluoreszenz der Lösung von PFP (50 µM) wies ein Maximum bei 427 nm auf. In 5 mM HEPES-Puffer (A) hatte die Konzentration des zugesetzten Lösungsvermittlers DMSO einen relativ geringen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. Mit steigender Konzentration an NaCl sank die Fluoreszenzintensität stark ab (B: 5 mM, C: 50 mM, D: Reaktionspuffer). Der Zusatz von DMSO konnte die Abnahme der Fluoreszenzintensität leicht abmildern, jedoch in keiner der eingesetzten DMSO-Konzentrationen (0 – 10 %) verhindern. Bei einer niedrigen NaCl-Konzentration von 5 mM zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt des DMSO, bei erhöhten NaCl-Konzentrationen hatten nur eine Konzentration von 10 % DMSO einen Effekt. Die Anregungswellenlänge betrug 370 nm. Y-Achse: „arbitrary units“, AU, relative Fluoreszenzeinheiten.

A



B

NaCl	FL-Intensität	Fl-%
0 mM	53250	100
5 mM	9280	17
50 mM	430	0,8
Reaktionspuffer	22	0,04

C

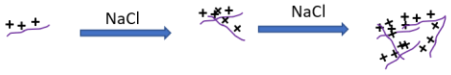


Abbildung 5.7.2: Auswertung des Einflusses der NaCl-Konzentration auf die Fluoreszenz des PFP. PFP zeigte in Wasser eine hohe Fluoreszenzintensität, die mit der Zugabe von 5 mM NaCl bereits deutlich abnahm und bei 50 mM NaCl unter 1 % des Wertes verglichen mit 5 mM HEPES. lag. Die Zugabe von DMSO konnte den Effekt nur geringfügig abmildern (A). Die Werte der Fluoreszenzintensität sind für die Probe mit 1 % DMSO gegeben (B). Die Daten waren bezogen auf das Fluoreszenzmaximum bei 430 nm. Die Ursache für die Abnahme der Fluoreszenz liegt in der verringerten Löslichkeit des Polyelektrolyten PFF mit zunehmender Konzentration an gelösten Ionen (C). Die gebildeten Agglomerate weisen eine verringerte Fluoreszenz auf.

Da DMSO die Löslichkeit von PFP in niedrig konzentrierten Salzlösungen verbessern kann, wurde untersucht, ob höhere DMSO Konzentrationen bis 30 % sowie Detergenzien bis zu der 20-fachen CMC (Critical Micelle Concentration) die Löslichkeit von PFP in ausreichender Weise erhöhen konnten. Es zeigte sich jedoch, dass auch diese Ansätze keine hinreichende Wirkung hatten. Zudem wären in diesen hohen Konzentrationen auch störende Wechselwirkungen mit den übrigen Reaktionen in der Lösung nicht auszuschließen gewesen.

Daher wurde alternativ die Substrat-DNA als lineares Molekül über eine Thiol-Gold-Bindung an die GNP gekoppelt. Auf diese Weise lassen sich die GNP ebenfalls durch die DNA in Dispersion stabilisieren. Die spaltbare Sequenz sollte in diesem DNA-Molekül nahe der Goldoberfläche lokalisiert sein, so dass die Hydrolyse durch das entwickelte DNAzym durchgeführt werden konnte. Das abgespaltene Segment sollte dissoziieren, ohne dass ein Polykation erforderlich wäre und die verbleibenden GNP sollten durch die verbleibenden kurzen DNA-Segmente nicht mehr ausreichend stabilisiert sein. Daher sollte es ebenfalls zur Agglomeration mit einhergehender Farbänderung kommen, s. Abb. 5.7.3.

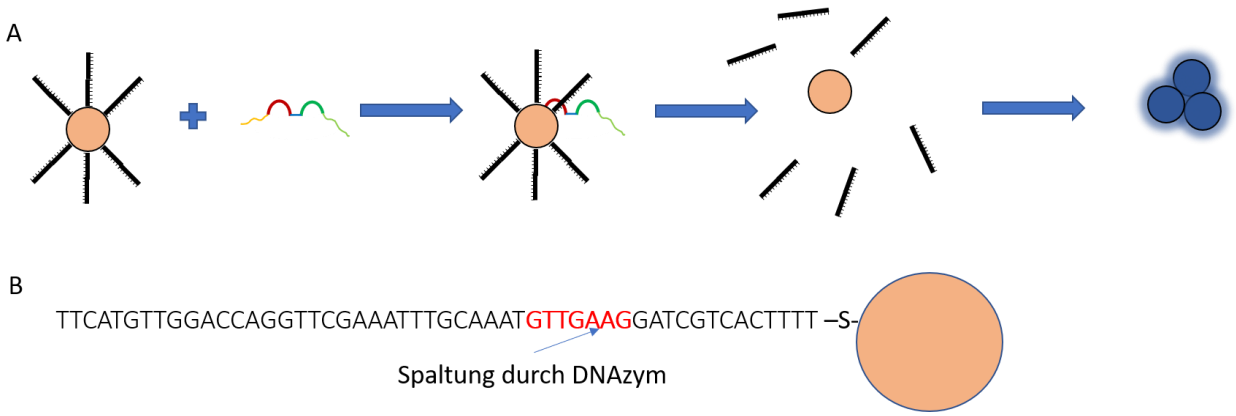


Abbildung 5.7.3: Alternativer Ansatz der Stabilisierung der GNP. Die Indikator-GNP sollten mit Substrat-DNA funktionalisiert werden, die kovalent über Thiole gebunden waren (A). Diese Technik war im Rahmen des vorliegenden Projektes für die Kopplung der Initiator-DNA an Surrogat-GNP entwickelt worden und konnte hier ebenso eingesetzt werden. Die DNA auf der Oberfläche der Indikator-GNP sollte weiterhin eine Spaltstelle für das bereits entwickelte DNAzym besitzen, die nun nahe der Oberfläche des GNP lokalisiert war (A, B). Dadurch sollte nach der Spaltung nur ein kleiner Teil der DNA an dem GNP verbleiben, die zur Stabilisierung der GNP in der Reaktionslösung nicht ausreicht. Die Agglomeration sollte zur Generierung des Farbsignals führen.

5.8 Immobilisierung der DNA auf GNP durch Thiol-Gold-Bindung

Thiol-Gold-Bindungen sind ein etablierter Weg zur Funktionalisierung von Goldoberflächen. Für die Kopplung der Initiator-DNA an die Surrogatpartikel war dieses Verfahren vorgesehen, und es wurde auch zur Kopplung der Substrat-DNA an die Indikatorpartikel eingesetzt. Es standen dabei verschiedene Ansätze zur Verfügung, die eine optimale Dichte und Zugänglichkeit der DNA auf der Partikeloberfläche generieren sollten. Dabei war das Ziel, die zur Hybridisierung mit einem komplementären Gegenstrang notwendigen DNA-Sequenzen nicht auf der Goldoberfläche adsorptiv gebunden zu haben und damit für die Hybridisierung zu blockieren, sondern frei in Lösung zu halten. Dies wurde realisiert durch die hohe Dichte der DNA-Moleküle pro Fläche der Goldpartikel, so dass sie lediglich kovalent über das Thiol gebunden blieben und adsorptiv gebundene Bereiche der DNA von anderen DNA-Molekülen von der Goldoberfläche verdrängt wurden.

Alternativ können zu diesem Zweck auch andere kleine Thiol-funktionalisierte Moleküle verwendet werden wie beispielsweise Mercaptoalkane (Mercaptohexanol, MCH) oder Dithiothreitol (DTT). Dieser Ansatz ist für die Funktionalisierung der Substrat-Partikel untersucht worden. Hier war angestrebt, die Dichte der Substrat-DNA auf der Partikeloberfläche möglichst gering zu

halten und gerade ausreichend, um die GNP in der Reaktionslösung dispergiert zu halten. Für eine schnelle Generierung des Farbumschlags war es notwendig, diese Stabilisierung rasch aufzuheben. Dafür war es vorteilhaft, wenn nur wenig DNA-Moleküle von den DNAzymen geschnitten werden müssen.

5.8.1 Salt-Aging vs. Freeze-Thawing

Zu Entwicklung der Methode zur Kopplung von DNA auf der GNP-Oberfläche war es wichtig, die Anzahl der gebundenen DNA-Moleküle pro Partikel feststellen zu können. Daher wurde zunächst eine DNA-Sequenz definiert, an deren freies Ende ein komplementäres Oligonukleotid hybridisieren konnte, welches einen Fluoreszenzfarbstoff trug. Beide DNA-Moleküle wurden beschafft und für die vergleichenden Untersuchungen der zwei Kopplungsmethoden eingesetzt. Die Untersuchungen wurden mit den 30 nm durchmessenden GNP durchgeführt, die als Surrogatpartikel eingesetzt werden.

Nachfolgend ist die Sequenz der beiden eingesetzten Oligonukleotide angegeben:

5‘-**HS**-C3-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGTTGGACCAGGTTCGAAAT-3

3‘-GTACAACCTGGTCCAAGCTTTA-**6FAM**-5‘

Untersucht wurden das sogenannte Salt-Aging sowie das Freeze-Thawing, s. Abb. 5.8.1.1. Beide Methoden zielen darauf ab, möglichst viele Thiol-funktionalisierte DNA-Moleküle in die räumliche Nähe der Goldpartikel zu bringen, so dass sie über das Thiol eine Bindung zur Goldoberfläche ausbilden können. Unter normalen Bedingungen in Wasser kommt es zu einer Abstoßung zwischen den negativ geladenen DNA-Molekülen und den mit zunehmender DNA-Dichte auf der Oberfläche ebenfalls zunehmend negativ geladenen GNP. Im Falle des Salt-Aging wird diese durch eine langsam graduell gesteigerte Salzkonzentration überwunden. Eine schnelle Steigerung der Salzkonzentration würde die GNP wie bereits gezeigt elektrostatisch destabilisieren und zur Agglomeration bringen. Es galt also, ein Gleichgewicht zwischen ansteigender Salzkonzentration und damit neu gebundenen DNA-Molekülen zu etablieren und dieses Gleichgewicht dann langsam zu immer mehr gebundenen DNA-Molekülen zu verschieben.

Im Fall des Freeze-Thawing wird die lokale Konzentration von DNA und GNP beim Einfrieren stark erhöht. Während des langsamen Einfrierens nimmt der Anteil des Eises zu und die im

Wasser gelösten Moleküle wie auch die GNP konzentrieren sich in den verbleibenden noch flüssigen Bereichen der Lösung. Deren Volumen wird graduell kleiner und so kommen Thiol-funktionalisierte DNA und GNP in einer so hohen Konzentration in Kontakt, die in dem großen Volumen der Lösung kaum herzustellen ist. Der vergleichsweise geringe Anteil an Salzen in der Lösung wird ebenfalls aufkonzentriert und unterstützt den Prozess zusätzlich.

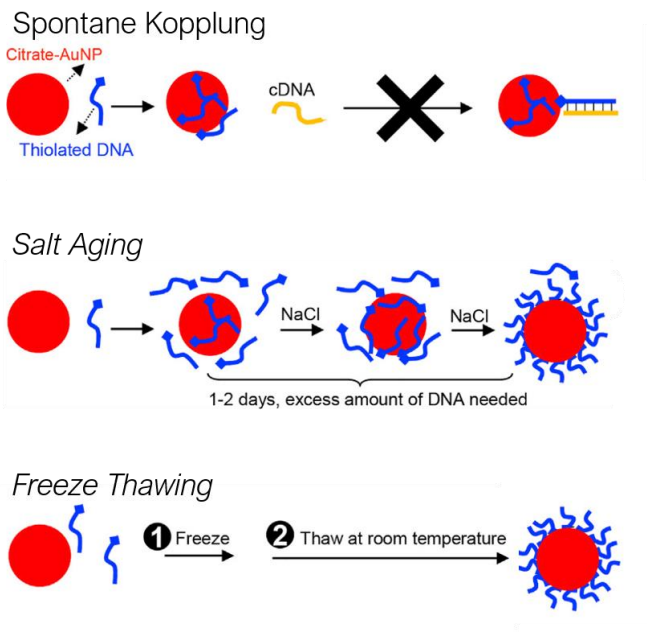


Abbildung 5.8.1.1: Schema Salt-Aging und Freeze-Thawing. Die spontane Kopplung von DNA an GNP über Thiole kann darüber hinaus zur Adsorption der DNA an die Goldoberfläche führen, wodurch die Bindung komplementärer DNA unterbunden wird. Eine höhere Dichte der DNA auf der Oberfläche gewährleistet deren Verfügbarkeit für Reaktionen und wird durch Salt-Aging oder Freeze Thawing erreicht. Bei dem Salt-Aging wurde die DNA mit den GNP inkubiert und die Salzkonzentration sukzessive erhöht. Dadurch wurde die elektrostatische Abstoßung reduziert und mehr DNA-Moleküle banden an die GNP-Oberfläche. Das Freeze-Thawing wurde bei niedrigerer Salzkonzentration durchgeführt. Während des Gefrierens der Lösung konzentrierten sich sowohl GNP als auch DNA und Salze in den zunehmend kleiner werdenden Volumina, die noch flüssig waren. So wurde ebenfalls eine Anreicherung von DNA und Salzen in GNP-Nähe erreicht, die zu einer hohen Dichte der gekoppelten DNA auf der Oberfläche der GNP führte.

Es wurden 3 Modifikationen der Salt-Aging Methode untersucht. Dabei wurde die Salzkonzentration über mehrere Stunden in 10, 12, oder 19 Schritten erhöht. Für das Freeze-Thawing wurden 2 Modifikationen mit unterschiedlicher Konzentration an NaCl durchgeführt, s. Tab. 5.8.1.1.

Tabelle 5.8.1.1: Salt-Aging und Freeze-Thawing-Reaktionsbedingungen. Die Methode des Salt-Aging wurde in 3 Varianten durchgeführt, bei denen die Anzahl der Schritte (Salzzugabe) und die resultierende Gesamtdauer des Verfahrens variiert wurden. Die Methode des Freeze-Thawings wurde mit 2 Salzkonzentrationen durchgeführt.

Salt-Aging	Probe	Kontrolle
1) Standard (12,5h/19 *Schritte*)	GNP + Initiator (TCEP)	GNP + TE
2) Schnell (7,0 h/10 *Schritte*)	GNP + Initiator (TCEP)	GNP + TE
3) Schnell Plus (8,5 h/12 *Schritte*)	GNP + Initiator (TCEP)	GNP + TE
Freeze-Thawing	Probe	Kontrolle
4) Standard 2,66 mM	GNP + Initiator (TCEP)	GNP + TE
5) 2 x NaCl 5,32 mM	GNP + Initiator (TCEP)	GNP + TE

Alle 5 Modifikationen der Methoden führten zu einer erfolgreichen Funktionalisierung der GNP (rote Farbe blieb erhalten), während die Kontrollproben in allen Fällen eine Farbveränderung nach lila bzw. farblos zeigten, was eine Agglomeration der GNP ohne gebundene DNA anzeigte, s. Abb. 5.8.1.2. Eine Lagerung für 3 Wochen war ohne Funktionsverlust möglich (Ergebnisse nicht gezeigt).

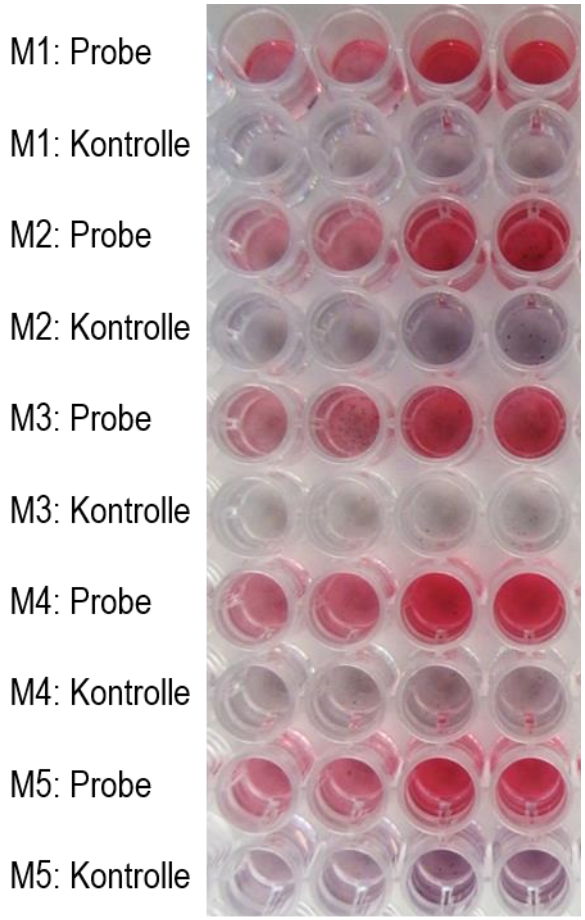


Abbildung 5.8.1.2: Ergebnisse Salt-Aging und Freeze-Thawing. Beide Methoden in ihren 5 Modifikationen erzeugten stabilisierte GNP für die zwei untersuchten GNP-Konzentrationen (rote Farbe unverändert). Die Kontrollproben ohne DNA zeigten Farbveränderungen nach lila oder farblos. Die Bezeichnung entspricht den in Tabelle 5.8.1 genannten Methoden (M1 – M3: Salt-Aging, M4 – M5: Freeze-Thawing).

Für die Auswahl der für das Projekt geeigneten Methode wurde daraufhin die Anzahl an DNA-Molekülen pro GNP bestimmt. Dazu wurden die funktionalisierten GNP mit der komplementären fluoreszenzmarkierten Sonde inkubiert. Eine direkte optische Visualisierung der gebundenen Sondenmoleküle war nicht möglich, da GNP in ihrer nahen Umgebung Fluoreszenz quenchen. Daher wurden die GNP nach der Hybridisierung der Sonde durch Zentrifugation abgetrennt, gewaschen und dann die gebundenen komplementären Sondenmoleküle bei einem hohem pH-Wert von 11 dehybridisiert. Die GNP wurden erneut abzentrifugiert und die Fluoreszenz der im Überstand gelösten Sondenmoleküle bei pH 9 vermessen. Durch Vergleich mit einer Kalibrationsgeraden, gemessen mit dem freien Farbstoff 6-FAM, wurde die Konzentration der Sondenmoleküle bestimmt und ins Verhältnis zur Konzentration der GNP gesetzt.

Die Methode des Salt-Aging lieferte ca. 38 ± 10 Oligos pro GNP, während bei dem Freeze-Thawing ca. 66 Oligos pro GNP erreicht wurden. Damit konnte gezeigt werden, dass das Freeze-Thawing Verfahren effizienter war als das Salt-Aging. Zudem beeinflussen die unterschiedlichen Salzkonzentrationen das Ergebnis beim Freeze-Thawing kaum, auch wenn die Zahlen zwischen zwei Experimenten stärker schwankten (orange markierte Ergebnisdaten des ersten Experiments (Versuch 501) und des dritten Experiments (Versuch 503+504), s. Abb. 5.8.1.3.

			Versuch 501			Versuch 502			Versuch 503 + 504		
			Probe	Kontr.	korrigiert	Probe	Kontr.	korrigiert	Probe	Kontr.	korrigiert
Salt Aging	Standard	12,5 h, 19 *steps*	44,5	6,1	**38,4**	-	-	-	52,0	17,0	**35,0**
	Schnell	7,0 h, 10 *steps*	52,6	6,9	**45,7**	-	-	-	69,6	14,8	**54,9**
	Schnell Plus	8,5 h, 12 *steps*	46,8	18,5	**28,4**	-	-	-	47,3	18,3	**29,0**
Freeze Thawing	Standard	48 h, 2,66 mM	54,7	67,1	**-12,4**	72,5	6,9	**65,6**	120,4	11,4	**109,0**
	2 x NaCl	48 h, 5,32 mM	22,1	2,9	**19,2**	74,3	7,3	**67,0**	118,8	11,9	**106,9**
	Standard	24 h, 2,66 mM	-	-	-	71,8	6,4	**65,4**	128,7	10,9	**117,8**

Abbildung 5.8.1.3: Anzahl DNA-Moleküle pro GNP. Die Methoden Salt Aging und Freeze Thawing wurden ausgewertet und verglichen. Mehrere Versuche zeigten, dass Freeze Thawing eine höhere Dichte der DNA auf der Oberfläche der GNP erreicht.

5.8.2 Zugänglichkeit der auf GNP gebundenen DNA für andere DNA

Die GNP wurden erfolgreich mit Thiol-gekoppelter DNA funktionalisiert und so stabil in Dispersion gehalten. Die Hybridisierung dieser DNA-Moleküle mit den fluoreszierenden DNA-Sonden wurde nachgewiesen, wodurch bestätigt wird, dass die DNA auf den GNP für andere Moleküle zugänglich ist. Gerade die Hybridisierung mit komplementärer ssDNA war entscheidend für den Einsatz der Surrogat-GNP als Initiator der RCA und ebenso für die Verwendung als Farb-Indikator, wo die gebundene DNA durch DNAzyme abzubauen war. Die Ergebnisse bestätigten, dass die hergestellten DNA-funktionalisierten GNP für beide Anwendungen geeignet waren.

5.8.3 Immobilisierung der Substrat-DNA auf GNP

Die Substrat-DNA wurde mit der für die Initiator-DNA etablierten Methode auf den GNP immobilisiert. Dazu wurde die entsprechende DNA mit einer Thiol-Funktionalisierung beschafft, nachfolgend die Sequenz der eingesetzten DNA:

TTCATGTTGGACCAGGTTCGAAATTTGCAAAT***GTTGA-AG***GATCGTCACTTTT-SH

Die Spaltstelle (rot markiert) wurde so positioniert, dass die Spaltung durch das DNAzym den größten Teil der DNA entfernte. Die GNP wurden mit der Freeze-Thawing-Methode funktionalisiert. Sowohl die GNP Typ A wie auch Typ C wurden erfolgreich mit der Substrat-DNA beschichtet. Die Dichte der auf der Oberfläche gebundenen DNA-Moleküle sollte durch Zugabe von Mercaptohexanol reduziert werden, da dieses kurzkettige Thiol mit den DNA-Molekülen um Positionen auf der Oberfläche der GNP konkurriert. Es zeigte sich, dass die GNP sich direkt nach der Zugabe einer äquimolaren Menge Mercaptohexanol blau färbten, eine anschließende Funktionalisierung mir DNA durch Freeze-Thawing wurde so unterbunden. Die hergestellten GNP wurden in Reaktionspuffer gegeben, um die Stabilität unter den notwendigen Salzkonzentrationen zu evaluieren. Die mit DNA beschichteten GNP zeigten unverändert die typische rote Farbe, was belegte, dass die Funktionalisierung erfolgreich durchgeführt worden war. Im Vergleich dazu zeigten GNP Typ C sofort nach Zugabe des Reaktionspuffers eine Entfärbung. GNP Typ A zeigten aufgrund ihrer Stabilisierung mit einem Tensid direkt nach Zugabe des Reaktionspuffers noch eine rötliche Farbe, nach 60 min war auch hier eine Entfärbung erkennbar. GNP, die das Freeze-Thawing Protokoll ohne DNA Zugabe (mit TE-Puffer als Kontrolle) durchlaufen hatten, hatten sich bereits beim Einfrieren entfärbt. Die Ergebnisse belegten, dass die GNP auch mit der Substrat-DNA erfolgreich funktionalisiert wurden und so unter Reaktionsbedingungen stabilisiert vorlagen, s . Abb. 5.8.3.1. Eine Lagerung über 3 Wochen war ohne Funktionsverlust möglich (Ergebnisse nicht gezeigt).

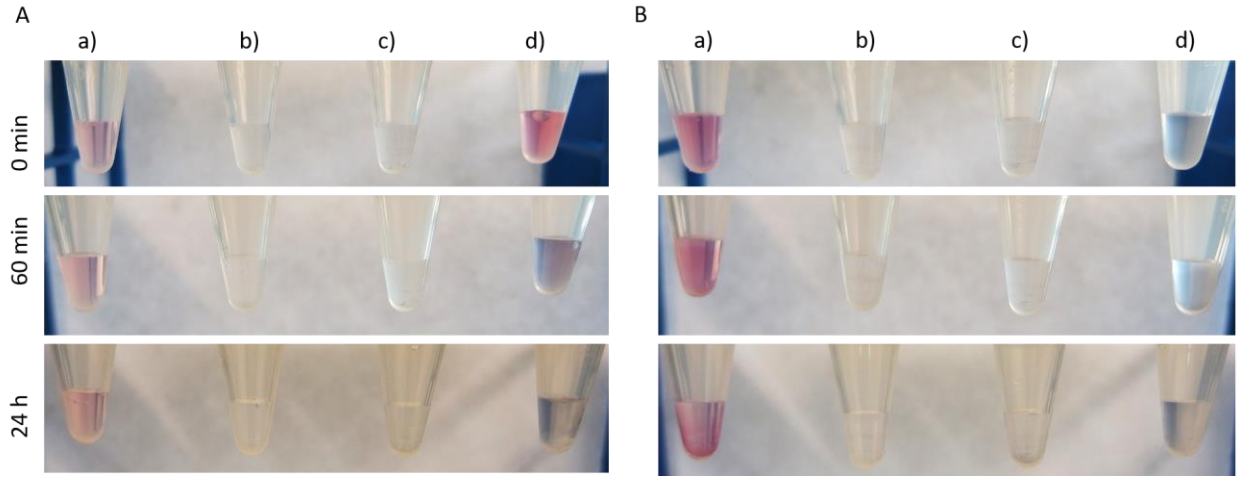


Abbildung 5.8.3.1: Immobilisierung der Substrat-DNA auf den GNP. Die Substrat-DNA wurde mit einem Thiol durch die Freeze-Thawing Methode auf der Oberfläche der GNP gebunden. Die so funktionalisierten GNP wurden in Reaktionspuffer gegeben, um ihre Stabilität zu prüfen. Es wurden GNP sowohl von Typ A (A) als auch Typ C (B) funktionalisiert. Direkt nach Zugabe in den Reaktionspuffer (0 min) als auch nach 60 min und 24 Stunden zeigen die DNA-funktionalisierten GNP eine rote Farbe, was ihre Stabilität belegte (a). Im Vergleich dazu wurden 3 weitere GNP präpariert: Probe b) enthielt zusätzlich zur DNA Mercaptohexanol, Probe c) TE-Puffer und Probe d) nicht funktionalisierte GNP. Einzig die nicht funktionalisierten GNP Typ A waren direkt nach Zugabe in den Reaktionspuffer noch rot gefärbt, entfärbten sich jedoch bereits nach 60 min. Alle anderen Proben waren farblos, was eine Bildung größerer Agglomerate anzeigte.

5.9 Entwicklung des DNAzyms „DNAse A“

Das Tandem-DNAzym umfasste 2 DNAsen, von denen die „DNAse A“ die Aufgabe hatte, die durch die RCA gebildete lange Kette von Tandem-DNAzymen in einzelne Segmente zu zerschneiden. Dabei schneidet jede DNAse A jeweils die Spaltstelle, die im eigenen Segment liegt, jedoch keine weiteren. Aus dem Grund wurde das DNAzym I-R1 gewählt, bei dem sowohl die katalytische Sequenz als auch die zu schneidende Sequenz im Loop einer Hairpin-Struktur lagen. Damit waren sie konstitutiv in räumlicher Nähe. Die katalytische wie die Substrat-Sequenz sind konserviert, um die Aktivität zu erhalten, in dem verbindenden Bereich des Loops ist eine gewisse Variabilität der Sequenz möglich. Hier wurden 3 Substitutionen eingefügt und getestet, in wie weit sich dadurch die Aktivität des DNAzyms beeinflussen und optimieren ließ, s. Abb. 5.9.1.

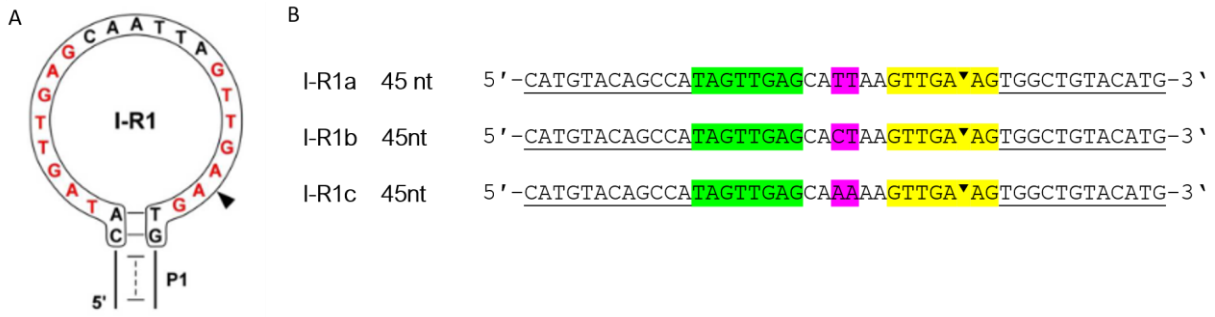


Abbildung 5.9.1: Design und Struktur der entwickelten Varianten der DNAse A. Die ursprüngliche DNAse I-R1 besaß einen Loop (A), der die katalytische Sequenz (A links) und die Substrat-Sequenz (A rechts) enthielt. Diese rot markierten Sequenzen sind konserviert, während die schwarz gekennzeichneten Nucleotide variabel sind. Es wurden 3 Varianten designt (B) und ihre Aktivität getestet. Die katalytische Sequenz ist in grün, die Substrat-Sequenz in gelb und die variierten Nucleotide in lila gekennzeichnet, der selbstkomplementäre Stem-Bereich ist unterstrichen dargestellt.

Es war wichtig, dass beide DNAzyme des Tandems unter denselben Bedingungen Aktivität zeigten. Die DNAzyme sind daher so gewählt worden, dass sie einander strukturell ähneln und beide die Hydrolysereaktion über ein Zink-Ion katalysieren, das im aktiven Zentrum gebunden wird. Damit sind die Reaktionsbedingungen, die für das DNAzym B (I-R3) optimiert wurden, auch für das DNAzym I-R1 als optimal festgestellt worden. Die drei Varianten von I-R1 wurden unter diesen Bedingungen getestet und die DNAse-Aktivität verglichen. Die Hydrolysereaktion wurde über 24 Stunden durchgeführt und zu Beginn sowie nach 1, 4 und 24 Stunden Proben genommen. Diese wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und so die Banden des Substrates sowie der beiden Spaltprodukte im Gel angefärbt. Die jeweilige Intensität des Fluoreszenzsignals korrelierte mit der Menge der jeweilen Oligonukleotide, so dass auf diese Weise die Bildung des Produktes abhängig von der Reaktionszeit gemessen wurde. Es zeigt sich, dass die Unterschiede relativ gering waren, s. Abb. 5.9.2. Die Variante I-R1c wies einen schnellen Abbau zu Beginn auf und behielt die höchste Aktivität über den gesamten untersuchten Zeitraum von 24 Stunden verglichen mit den beiden anderen Varianten. Daher wurde das DNAzym I-R1c für die folgenden Experimente ausgewählt.

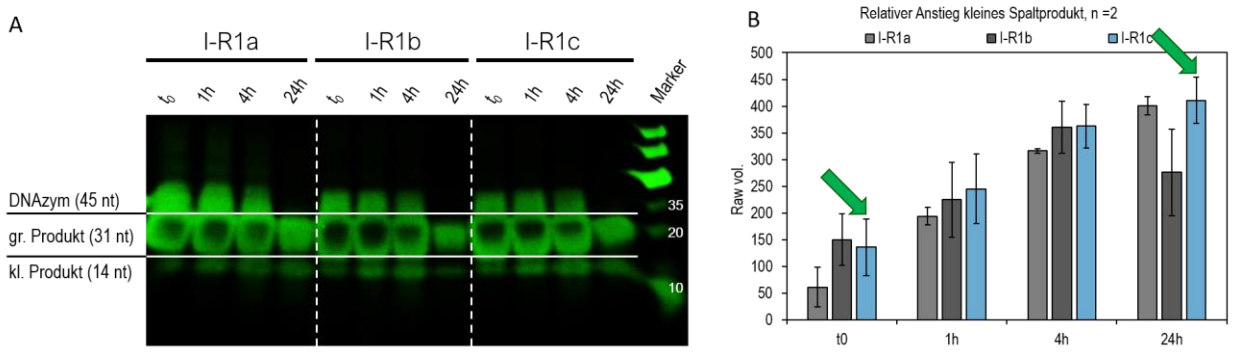


Abbildung 5.9.2: Funktionstest der DNAse A. Die 3 entwickelten Varianten der DNAse A (I-R1a-c) wurden getestet und der Substratumsatz nach 1, 4 und 24 Stunden Reaktionszeit gemessen. Die Reaktionslösungen wurden gelelektrophoretisch analysiert, das kleinere 14 Nucleotide lange Produkt wie auch das größere 31 Nucleotide messende Produkt wurden getrennt (A) und durch Anfärben mit dem Farbstoff SYBR Gold quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität des kleinen Produktes nahm mit steigender Reaktionszeit zu (B) und zeigte so die fortschreitende Spaltung des Substrates an. Alle drei Varianten wiesen DNAase Aktivität auf.

5.10 Entwicklung des Tandem-DNAzyms

Die beiden DNAzyme DNAse A und DNAse B sind erfolgreich entwickelt und getestet worden. Für die Verwendung als Tandem-DNAzym folgt nun die Kombination beider Segmente in einem DNA-Strang. In dem *in silico* Design wurde zudem eine Spacer-Sequenz zwischen beiden DNAsen berücksichtigt, die beiden Komponenten zusätzliche Flexibilität ermöglichte, s. Abb. 5.10.1.

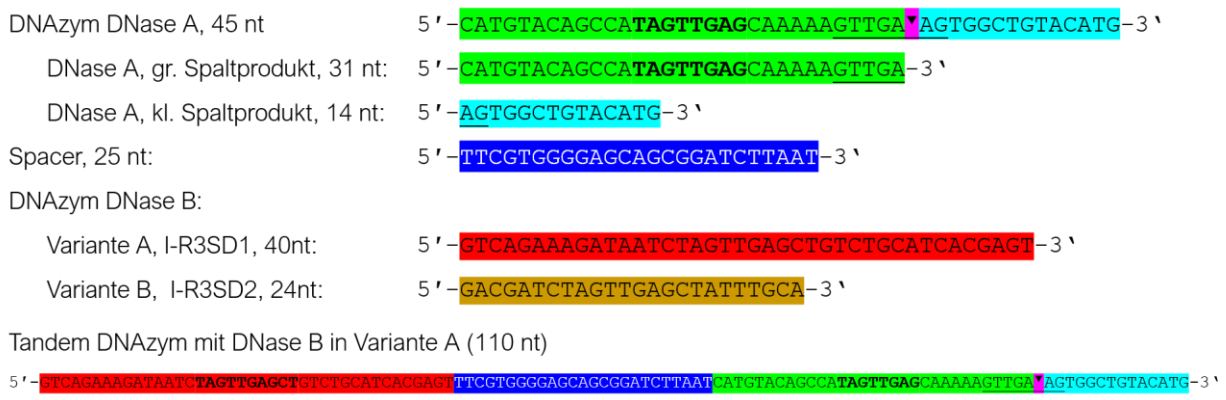


Abbildung 5.10.1: Design und Aufbau des Tandem-DNAzyms. Die DNAse A (grün+hellblau) wurde über einen Spacer von 25 Nucleotiden (dunkelblau) an die DNAse B (rot) gekoppelt. Die DNAse A spaltete sich selbst an der lila markierten Position, dadurch wurden 2 Produkte gebildet: Ein kurzes Segment mit 14 Nucleotiden (hellblau) sowie der verbleibende größere Teil von 96 Nucleotiden.

Das entwickelte Tandem-DNAzym wurde beschafft und unter den zuvor optimierten Reaktionsbedingungen getestet. Es sind 3 Reaktionsansätze hergestellt worden, die es ermöglichten, die DNAse A alleine oder in Kombination mit DNAse B zu testen:

1. Funktionstest „DNAse A“ Aktivität **ohne** Zugabe des Substrats der „DNAse B“
2. Funktionstest „DNAse A + B“ Aktivität **bei sofortiger** Zugabe des Substrats der „DNAse B“
3. Sequenzieller Funktionstest Aktivität **bei Zugabe** des Substrats der „DNAse B“ **nach 1 h**

Die Reaktionslösungen enthielten 2,5 µM DNAzym und für den Funktionstest der DNAse B zusätzlich 12,5 µM Substrat. Die Bestandteile der Reaktionsansätze wurden gelelektrophoretisch analysiert, dazu wurden Proben nach definierten Zeiten (15 min, 1 h, 4h, 24 h) entnommen und in einem Gel aufgetrennt. Der Funktionstest der „DNAse A“ zeigte, dass bereits nach 15 min eine erhebliche Menge des Spaltprodukts gebildet wurde. Nach 4 Stunden Reaktionszeit war die Bande des Produktes deutlich heller als die des Substrates, was bedeutete, dass die DNAse A den größten Teil des Tandem-DNAzyms umgesetzt hatte. Das entsprach den Beobachtungen, die für die DNAse A allein gemacht wurden (Abschnitt 5.9). Nach 24 Stunden war nur noch ein kleiner Teil des ungeschnittenen Tandem-DNAzyms nachweisbar. Im Gel war insbesondere das große Spaltprodukt sichtbar, da die Menge an gebundenem Farbstoff und damit die Helligkeit der Bande mit der Anzahl der Nukleotide korreliert. Der Funktionstest „DNAse A + B“ zeigte, dass bereits nach 15 Minuten eine Spaltung des Substrats nachweisbar war. Die Intensität der Bande nahm mit der Zeit zu, jedoch war der Anstieg relativ gering und auch nach 24 Stunden die Reaktion nicht abgeschlossen. Das Substrat wurde in einem 5x-Überschuss zugesetzt, daher war

davon auszugehen, dass die Spaltung der ersten Substrat-Moleküle schnell geschah. Eine weitere katalytische Umsetzung des Substrates erfolgte möglicherweise langsamer. Man kann annehmen, dass das gespaltene Produkt die katalytische Aktivität beeinflusste. Ein ähnliches Ergebnis war für den sequenziellen Funktionstest festzustellen. In diesem Test war die Spaltung des Tandem-DNAzyms durch die DNAse A bereits fortgeschritten. Damit war die aktive Komponente, die das Substrat spaltete, das schon gespaltene Segment des Tandem-DNAzyms. Es konnte folglich klar gezeigt werden, dass dieses ebenso wie das vollständige Tandem-DNAzym eine aktive DNAse B-Einheit trug, s. Abb. 5.10.2.

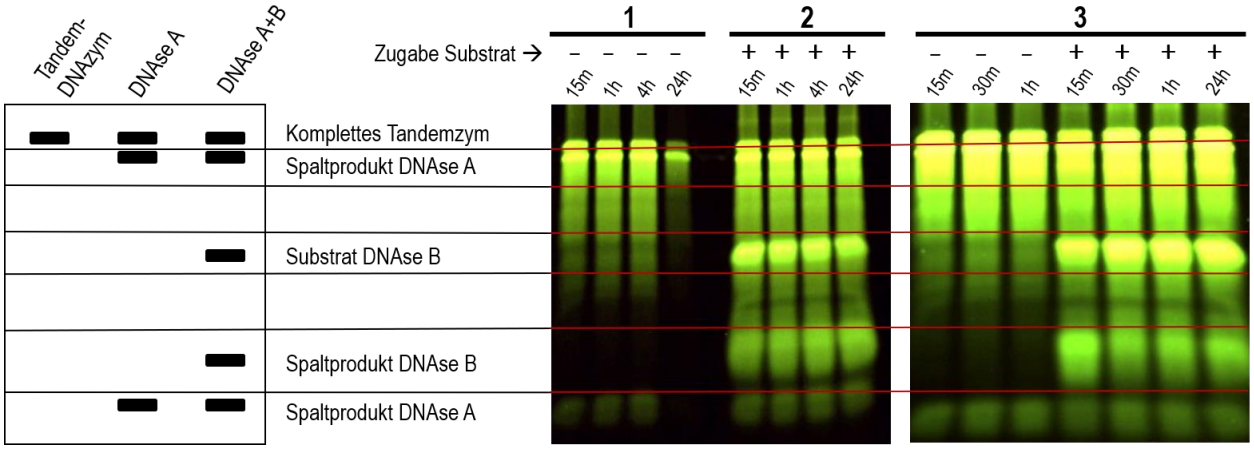


Abbildung 5.10.2: Funktionstest des Tandem-DNAzyms. Die Funktion des Tandem-DNAzyms wurde in 3 Schritten getestet. 1. Die Funktion der DNAse A ohne Zugabe des Substrats, 2. Die Funktion des Tandem-DNAzyms mit sofortiger Zugabe des Substrats und 3. Die Funktion des Tandem-DNAzyms mit Zugabe des Substrats nach 1 Stunde Reaktionszeit. Unter diesen Bedingungen wurde zuerst die Spaltung des Tandem-DNAzyms durch DNAse A durchgeführt und anschließend die Funktion der so prozessierten DNAse B mit dem Substrat überprüft. Die Reaktion des Tandem-DNAzyms wurde durch Mischen mit dem Reaktionspuffer gestartet und Proben nach definierten Zeiten von 15 min, 1h, 4h und 24 h gelelektrophoretisch analysiert. Die so getrennten Nucleotide wurden entsprechend ihrer Größe zugeordnet (Schema links). Es wurden 2,5 µM Tandem-DNAzym sowie 12,5 µM Substrat verwendet.

5.11 Entwicklung der zirkulären Matrizen-DNA

Das erfolgreich getestete Tandem-DNAzym sollte durch eine Rolling Circle Amplification (RCA) in großer Anzahl gebildet werden. Dazu musste die codierende komplementäre Sequenz zu einem Ring zyklisiert werden, der weiterhin eine Initiatorsequenz zum Start der RCA beinhalten musste. Die Zyklisierung wurde dabei enzymatisch durchgeführt, wobei hier als Ligasen die T4-Ligase und die CircLigase II eingesetzt wurden.

5.11.1 Design und Entwicklung der Sequenz

Das Design der Sequenz der Matrize erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst erfolgte die Einfügung der Initiatorsequenz:

3‘-GTACAACCTGGTCCAAGCTTTA-5‘

Hierdurch erreiche die Größe des Matrizenstrages 132 Nucleotide, s. Abb. 5.11.1.1, was über der Zielmarke von 120 Nukleotiden lag. Dieser Wert gilt als Obergrenze für die Standard-Synthese von DNA-Oligonukleotiden. Die Synthese längerer Oligonukleotide ist zwar möglich, aber technisch komplexer.

Daher wurde in einem ersten Schritt eine gekürzte Variante der DNAse B eingesetzt, deren katalytische Bereiche unverändert blieben, die nicht-konservierten Randbereiche aber kleiner ausfielen. Diese Struktur wurde in das *in silico* Design eingebracht. Die Modellierung ergab, dass der Matrizenstrang in Teilen selbstkomplementär war und damit partiell doppelsträngige Strukturen gebildet wurden. In einigen Bereiche war dieses Verhalten erwartbar, da beispielsweise die hier codierte DNAse A einen Hairpin bildete und der Gegenstrang in der Matrize demnach auch. Die in der RCA eingesetzte Polymerase Phi29 besitzt die Fähigkeit, solche doppelsträngige Matrizen-DNA zu dehybridisieren, so dass partielle doppelsträngige DNA toleriert werden konnte. Weitere Iterationen waren die Umgestaltung der Initiator-Bindesequenz und des Linkerbereiches in einer Weise, dass die 5‘- und 3‘-Enden einzelsträngig vorlagen und so für die Ligation zur Verfügung standen. Die Enden wurden durch das entwickelte Splint Oligonukleotid verbunden, so dass die Ligase sie kovalent koppeln konnte. Dieser Kopplungsbereich lag in einem größeren Loop, in dem die Matrize einzelsträngig vorlag. Aus diesem Grund wurde die Bindestelle der Initiator-DNA ebenfalls dort angesiedelt. Dadurch wurde keine extra Sequenz mehr benötigt und die Größe des Matrizenstranges auf 93 Nucleotide reduziert. Die entsprechende Initiatorsequenz, die die Surrogatpartikel auf der Oberfläche tragen, wurde entsprechend angepasst, da diese Sequenz keinen weiteren Vorgaben unterlag und daher im Gegensatz zum Matrizenstrang leicht veränderbar war, s. Abb. 5.11.1.2.

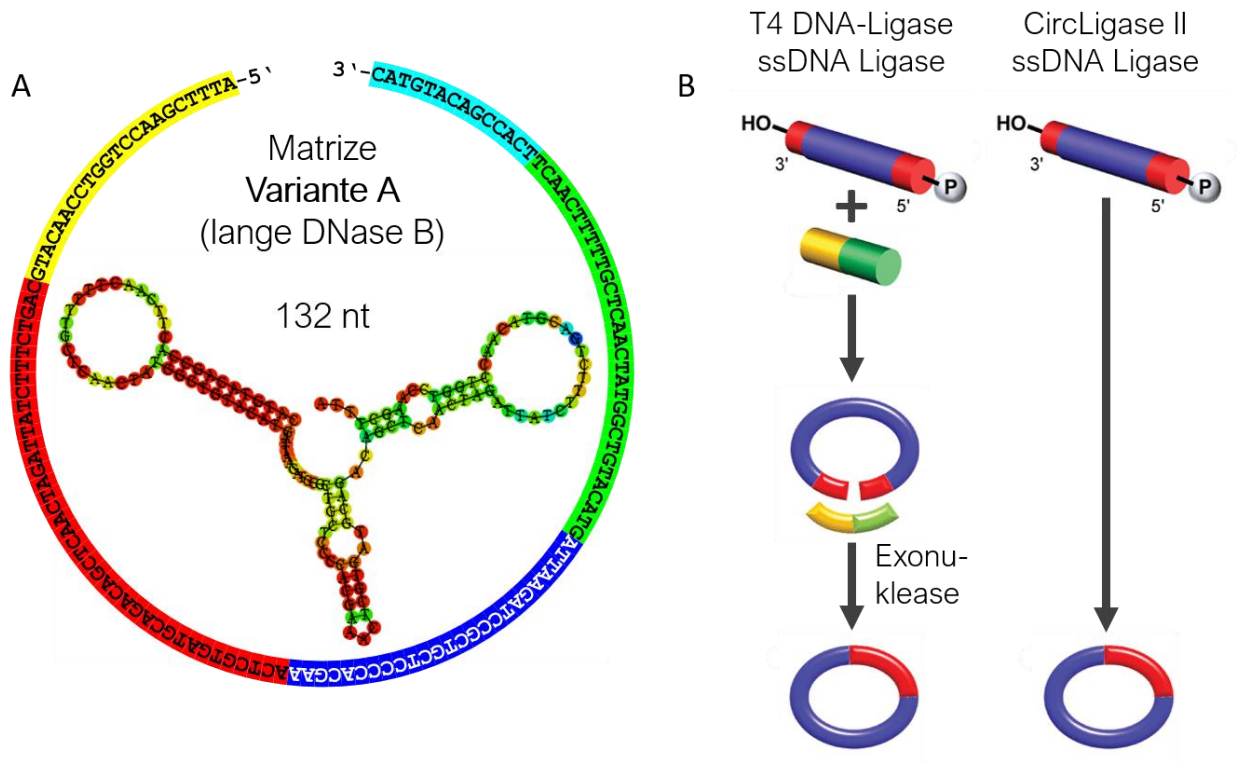


Abbildung 5.11.1.1 Entwicklung der Matrizen-DNA, Variante A. Der Entwurf der Matrizen-DNA (A) enthielt die DNAse A (türkis + grün), den Linker (blau), die DNAse B (rot) sowie die Bindestelle des Initiators (gelb). Es wurde die Sekundärstruktur berechnet, die diese DNA annimmt (A, Mitte). Die Zyklisierung dieser Matrizen-DNA kann auf 2 Wegen erreicht werden (B). Das Enzym T4-Ligase verbindet die beiden Enden, wobei diese durch ein komplementäres Splint-Oligonukleotid in direkte Nähe gebracht werden. Durch eine Exonuklease lässt sich das lineare Splint-Oligonukleotid anschließend abbauem. Eine alternative Reaktion unter Verwendung der CircLigase II verzichtet auf den Einsatz eines Splint-Oligonukleotids aufgrund der dafür optimierten Eigenschaften der CircLigase II.

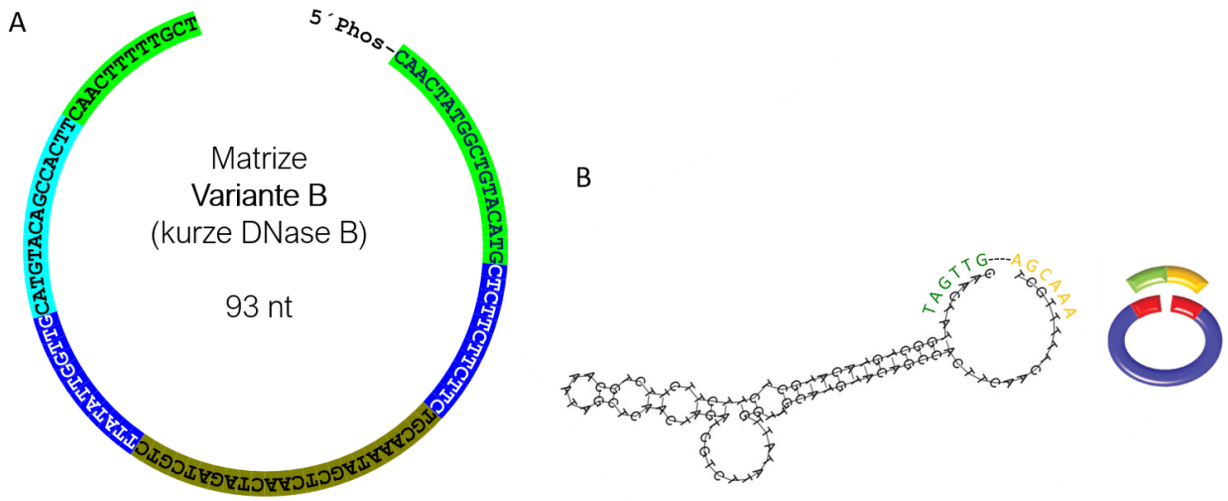


Abbildung 5.11.1.2 Entwicklung der Matrizen-DNA, Variante B. Der Entwurf der Matrizen-DNA (A) enthielt die DNAse A (türkis + grün), den Linker (blau), sowie die DNAse B (beige). Die Ligationsstelle wurde in Bereich der DNAse A eingebaut, da diese nicht doppelsträngig sondern als einzelsträngiger Loop vorlag (B). Das ermöglichte die Bindung des Splint-Oligonukleotids (B, gelb-grün), zudem wurde dieser Bereich auch als Initiator-Bindestelle für die RCA festgelegt. Die DNAse B wurde in der kurzen Variante eingesetzt und an beiden Seiten durch ein Linker-Segment von der DNAse A abgetrennt. Durch diese Weiterentwicklungen war es gelungen, die Länge des Matrizen-Stranges auf 93 Nucleotide zu verkürzen.

Für die Rolling Circle Amplification (RCA) ist eine zirkuläre Matrize notwendig. Diese Ligation kann durch verschiedene Enzyme umgesetzt werden wie beispielsweise die T4-Ligase und die CircLigase II. Beide Enzyme benötigen für die Reaktion Energie, die durch die Spaltung von Phosphatbindungen bereitgestellt wird. Während die T4-Ligase dafür auf ATP Moleküle aus dem Reaktionsmedium zurückgreift, arbeitet die CircLigase II ATP-unabhängig, da das Enzym energiereiche spaltbare Gruppen trägt. Damit ist der Umsatz der CircLigase II limitiert, sodass für die Ligation die T4-Ligase eingesetzt wurde. Der optimierte Matrizenstrang wurde mit einer 5‘-Phosphatgruppe beschafft, die für die Ligationsreaktion erforderlich ist.

5.11.2 Ligation des Matrizenstranges

Für die Ligation wurden die 5‘- und 3‘-Enden des Matrizenstranges in direkte räumliche Nähe gebracht, so dass sie durch die Ligase kovalent verbunden werden konnten. Dazu wurde ein komplementäres Splint-Oligonukleotid genutzt, mit dem beide Enden hybridisierten. Es wurde ein entsprechend designtes 12er Oligonukleotid mit jeweils 6 Basenpaaren pro Matrizenende verwendet (Splint I). Die Sequenz ist nachfolgend angegeben:

Splint I-Oligonukleotid: TAGTTGAGCAAA

Die Ligation konnte mit dem Splint I-Oligonukleotid erfolgreich durchgeführt werden, wie die Analyse der anschließend durchgeführten Gelelektrophore zeigte. Das zyklisierte Produkt besaß zwar die gleiche Masse wie das lineare Substrat, zeigte aber aufgrund der Zirkularisierung ein anderes Laufverhalten im Gel, so dass es im elektrischen Feld langsamer wanderte und als Oligonukleotid größerer Masse erschien. Die entsprechende Bande im Gel zeigte klar die erfolgreiche Ligation des Matrizenstranges an. Weiterhin war eine Bande noch größerer Masse erkennbar. Ein solches Verhalten war zu erwarten, da die Ligation zu Di- und Oligomeren führen kann. Dabei werden nicht die Enden eines Oligonukleotids miteinander verbunden, sondern 2 oder mehr Oligonukleotide miteinander verknüpft. Da es sich dabei um identische Matrizenstränge handelt, würde eine RCA mit einer solchen Matrize dennoch erfolgreich ablaufen. Es war jedoch wünschenswert, ein klar definiertes Material zur RCA einzusetzen und daher wurde eine Methodik entwickelt, um die Bildung solcher Di- und Oligomere zu vermeiden. Dazu wurde ein jüngst publiziertes Verfahren eingesetzt, das durch die Modifikation der Struktur des Splint-Oligonukleotids die Bildung von Dimeren verhindert [73]. Das Splint-Oligonukleotid (Splint II) wurde an beiden Enden um kurze Sequenzen erweitert, die selbstkomplementär sind und je einen kleinen Hairpin ausbildeten. Diese sterisch anspruchsvollere Struktur erleichterte zum einen die Ligation auch kleinerer Ringe und verhinderte gleichzeitig die Ligation zweier unterschiedlicher Moleküle, die einen größeren Raumbedarf haben. Beide Split-Oligonukleotide wurden eingesetzt und die Ergebnisse zeigten klar, dass die Ligation mit der optimierten Variante signifikante Verbesserungen brachte. Es wurden keine Di- oder Oligomere gebildet, sondern ausschließlich das monomere zirkularisierte Produkt.

In einem Aufreinigungsschritt wurden die nicht umgesetzten und damit linearen DNA-Moleküle enzymatisch abgebaut. Es wurden die Exonukleasen I und III verwendet, die ausschließlich lineare DNA abbauen. Dadurch wurde weiterhin klar bewiesen, dass die kovalente Ligation erfolgreich war. Die so behandelten Proben zeigten für das ursprüngliche Splint-Oligonukleotid (Splint I) zwei Banden (mono- und dimeres Produkt), für das optimierte Spint-Oligonukleotid (Splint II) war eine einzige Bande im Gel erkennbar. Dieses monomere Produkt wurde zudem in deutlich größerer Menge produziert als unter Verwendung des ursprünglichen Splint-Oligonukleotids (Splint I), was an der hohen Intensität der Bande sichtbar war, s. Abb. 5.11.2.1.

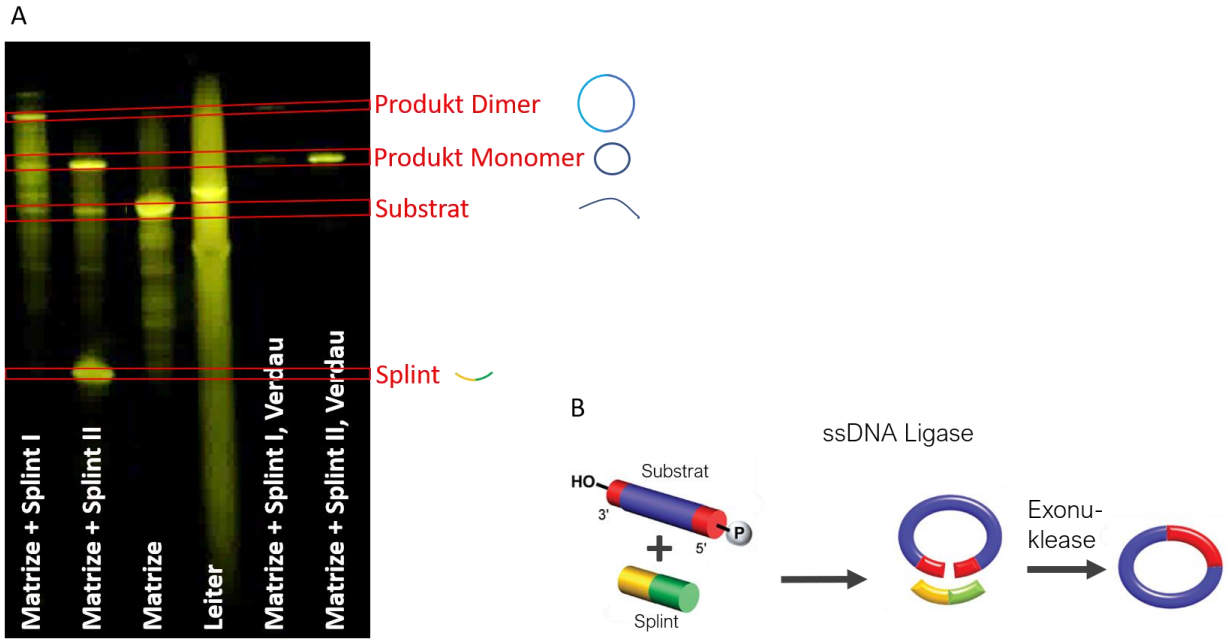


Abbildung 5.11.2.1: Ligation der Matrizen-DNA. Die Ligation der Matrizen-DNA wurde mit der T4-Ligase unter Verwendung eines Splint-Oligonukleotids durchgeführt und die Reaktionslösung anschließend gelelektrophoretisch analysiert (A). Die zyklisierte DNA wies ein langsameres Migrationsverhalten auf als die lineare DNA gleicher Nukleotidlänge, so dass Substrat und Produkt getrennt wurden. Unter Verwendung des ursprünglichen Split I wurden 2 Produktbanden erhalten, die monomeres sowie dimeres Produkt anzeigen. Im Gegensatz dazu wurden mit dem Split II ausschließlich monomere Produkte erhalten. Der anschließende Verdau mit Exonukleasen I und III entfernte verbleibendes Substrat und andere lineare DNA, während allein zyklisierte Produkte erhalten wurde.

5.11.3 Etablierung der Rolling Circle Amplification (RCA)

Die erfolgreich hergestellte Matrize wurde in einem nächsten Schritt als Basis für die RCA eingesetzt. Dazu wird ein Initiator-Oligonukleotid zu dem Matrizenstrang gegeben und beide hybridisiert. Der Matrizenstrang lag wie erläutert teilweise doppelsträngig vor, die Bindestelle des Initiator-Oligonukleotids befand sich in dem einzelsträngigen Bereich des Loops. Für die anschließende RCA band eine Polymerase an diesem dann doppelsträngigen Initiator und nutzte dessen freies 3‘-Ende, um dort durch Polymerisation den Gegenstrang der Matrize zu synthetisieren. Dieser Gegenstrang bestand somit aus repetitiven Einheiten des codierten Tandem-DNAzyms. Die hier eingesetzte Polymerase muss eine sogenannte strand-displacement Funktion besitzen, da sie nach Durchlauf der ersten Runde den von ihr selbst gebildeten Gegenstrang von dem Matrizenstrang verdrängen musste. Aus diesem Grund war es tolerierbar, dass der Matrizenstrang selbst partiell doppelsträngig vorliegt.

Neben der zwingend erforderlichen strand-displacement Funktion sollte die Polymerase eine hohe Aktivität aufweisen und in kurzer Zeit eine große Menge DNA synthetisieren. Diese Anforderungen werden von der Phi29-Polymerase erfüllt, die deswegen häufig für RCA-Anwendungen eingesetzt wird.

Für die RCA-Reaktion wurden der Matrizenstrang und das Initiator-Oligonukleotid im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und hybridisiert (jeweils 10 µM). Die RCA wurde durch Zugabe der Phi29-Polymerase gestartet und für 45 min bei 25 °C geführt, danach für weitere 75 min bei der optimalen Temperatur von 30 °C. Dadurch wurde sichergestellt, dass der Initiator an dem Matrizenstrang gebunden hatte und die RCA Reaktion startete. Nach Beendigung der RCA wurden Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff GelRed gefärbt, dessen Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration der DNA ist. Als Vergleich dienten Proben, die vor der RCA genommen wurden und die Ausgangskonzentration der DNA anzeigten. Es wurden Matrizen-Stränge untersucht, die mit dem ursprünglichen oder optimierten Splint-Oligonukleotid synthetisiert wurden. Für beide wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, d. h. der DNA-Konzentration, von ca. 80 x gemessen. Dieser Faktor war für beide Proben praktisch gleich, dies belegte die zuvor getroffene Aussage, dass auch Matrizenstränge, die aus Dimeren bestehen, in gleicher Weise in der RCA prozessiert werden. Es war zu berücksichtigen, dass die Konzentration der Matrizen-DNA deutlich höher war, als die der Phi29-Polymerase. Eine Konzentrationsangabe bei Enzymen bezieht sich auf deren Umsatz und wird in Units (U) angegeben, so dass ein direkter Vergleich molarer Mengen nur bedingt möglich war. Der eingesetzte Überschuss an Matrizen-DNA war notwendig, um zu garantieren, dass das Enzym mit Substrat gesättigt war und bei der vom Hersteller empfohlenen Enzymkonzentration von 10 U / 20 µl seine volle Aktivität erreichte. Das bedeutete, dass nur ein entsprechend geringerer Anteil der DNA in der RCA amplifiziert wurde, weil sich der ermittelte Amplifkationsfaktor 80x auf die Gesamtmenge der eingesetzten DNA bezog. Der Amlifikationsfaktor pro aktivem Komplex aus Phi29-Polymerase und einer Matrizen-DNA lag mutmaßlich deutlich höher als 80x und damit näher an den aus der Literatur bekannten 1400 – 2280 Nukleotiden pro Minute [43, 44, 74] entsprechend 1000 – 1500 replizierten Matrizen-Einheiten pro Stunde, s. Abb. 5.11.3.1, s. Tab. 5.11.3.1.

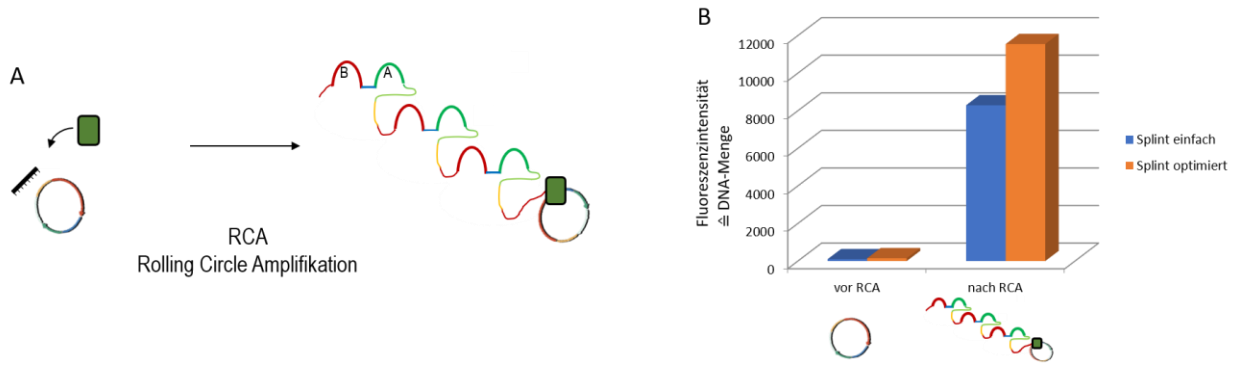


Abbildung 5.11.3.1: DNA-Amplifikation durch RCA. Die Matrizen-DNA wurde in einer RCA durch die Phi29-Polymerase amplifiziert und eine Vielzahl an Tandem-Sequenzen produziert (A). Die Zunahme der Menge der produzierten DNA wurde durch Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff GelRed gemessen (B). Die Menge an DNA steigt während der RCA innerhalb von 2 Stunden Amplifikationsdauer stark an.

Tabelle 5.11.3.1: Quantifizierung der DNA-Amplifikation durch RCA. Die Zunahme der DNA-Menge durch RCA wurde durch Markierung mit dem Farbstoff GelRed bestimmt. Die Fluoreszenzintensität stieg ca. um den Faktor 80 an.

	Vor RCA	Nach RCA	Zunahme
Splint I-ligierte Matrize	100	8290	83 x
Splint II-ligierte Matrize	150	11550	77 x

Die RCA-Reaktion wurde in dem vom Hersteller der Phi29-Polymerase empfohlenen Puffer durchgeführt und zeigte dort eine erfolgreiche Synthese der Tandem-DNAzym-Sequenz. Die RCA bewirkt allerdings nur eine lineare Amplifikation der DNA, da jedes Initiator-Molekül eine RCA auslöste. Die exponentielle Hyperamplifikation erfolgt erst, wenn die einzelnen Tandem-DNAzym-Segmente sich selbst aus der gebildeten langen Kette herausschneiden und anschließend selbst weitere RCAs initiieren. Dazu mussten sie katalytisch aktiv sein, was in dem Polymerase-Puffer nicht gegeben war, sondern den speziell entwickelten Reaktionspuffer erforderte. Aus diesem Grund wurden RCA-Reaktionen in diesem Reaktionspuffer durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass in parallel durchgeführten Experimenten die RCA in Polymerasepuffer erfolgreich war, während in dem Reaktionspuffer keine Zunahme der DNA-Konzentration festgestellt werden konnte. Dabei war der Reaktionspuffer zusätzlich mit 4 mM TCEP versetzt worden, das als Reduktionsmittel wirkte und Stabilität und Aktivität der Phi29 Polymerase gewährleistete. Es hat damit dieselbe Funktion wie das DTT, das im Polymerasepuffer verwendet wird und ist diesem

sogar überlegen in Bezug auf die Reaktivität und die Stabilität gegenüber Sauerstoff. Die Verwendung von DTT wäre nicht möglich gewesen, da dieses Thiol mit den GNP reagieren würde.

Weitere Unterschiede zwischen beiden Puffern waren die gelösten Ionen und insbesondere deren Konzentrationen. Der Reaktionspuffer enthielt 100 mM NaCl, während der Polymerasepuffer 10 mM $(NH_4)_2SO_4$ beinhaltete. Eine NaCl-Konzentration dieser Höhe kann die Aktivität der Phi29-Polymerase deutlich reduzieren [75]. Auch die Konzentration an $MgCl_2$ war deutlich unterschiedlich; das zweiwertige Magnesium ist in Reaktionen von DNA häufig von großer Bedeutung. Insgesamt lag die Ionenstärke, die die Bedeutung mehrfach geladener Ionen berücksichtigt, im Reaktionspuffer deutlich über dem Wert des Polymerasepuffers, s. Tab. 5.11.3.2. Durch die Entwicklung alternativer Puffersysteme kann die Kompatibilität beider Reaktionen verbessert werden. Die in Kapitel 5.3. dargestellten Optimierungsschritte bezüglich des Reaktionspuffers für die DNAzyme bilden die Basis dafür. Durch parallel durchzuführende Vergleichsmessungen mit der Polymerase sollte sukzessive eine Reaktionsbedingung zu evaluieren sein, die den kombinierten Anforderungen gerecht wird. Auch eine Anpassung der eingesetzten katalytischen Systeme ist zu berücksichtigen, und beide Optionen lassen die zukünftige Umsetzung der Hyperamplifikation realisierbar erscheinen.

Tabelle 5.11.3.2: Zusammensetzung der Puffer. Vergleich der Zusammensetzung von Reaktionspuffer und Polymerasepuffer hinsichtlich Salzgehaltes und Ionenstärke

	Phi 29-Polymerasepuffer	Reaktionspuffer
	10 mM $(NH_4)_2SO_4$	100 mM NaCl
$MgCl_2$	10 mM	40 mM
$ZnCl_2$	-	4 mM
Puffer	50 mM Tris	50 mM Hepes
DTT / TCEP	4 mM DTT	4 mM TCEP
Ionenstärke	110 mM	280 mM

5.12 Entwicklung der Messapparatur

Bei der Entwicklung der Testapparatur (Funktionsmuster) wurde in Teilen auf existierende Komponenten zurückgegriffen und diese entsprechend den Anforderungen des Forschungsprojektes modifiziert. Die Apparatur bestand aus einem Zylinder aus Edelstahl, an dessen unterem Ende der Probenträger durch ein Schraubgewinde montiert wurde, s. Abb. 5.12.1. Dieser bot eine Aufnahmemöglichkeit für die zu prüfende Textilprobe, die auf diese Weise

mit dem Zylinder verbunden wurde. Der Zylinder besaß am oberen Ende eine Öffnung zur Montage eines Schlauches, durch den Druckluft in den Zylinder geleitet wurde. Die Kontrolle des Druckes erfolgte über ein Ventil und Manometer, das den Druck in der Apparatur maß. Der Probenträger besaß einen Auslass am unteren Ende, durch den die Rückseite der Textilprobe zugänglich war. So wurde diese mit der Waschlösung beschickt und diese Lösung wieder entnommen und der Analytik zugeführt.

Ein entscheidender Punkt war die Entwicklung eines Verfahrens, die Textilprobe in den Probeträger so einzubauen, so dass diese mechanisch fixiert war und an den Rändern ein Durchtritt von Flüssigkeit ausgeschlossen wurde. Auf die Textilprobe wurde oben ein Gummi-Dichtungsring aufgelegt, der beim Verschrauben mit dem Zylinder durch einen Metallkonus sowohl auf die Probe wie auch an den Metallrand des Probeträgers gepresst wurde. Es hat sich gezeigt, dass die dreidimensionale Struktur des Gewebes eine dauerhafte und vollkommene Abdichtung erschwerte. Zudem wurde die Testlösung vor dem Verschrauben mit dem Zylinder auf das Textil aufgetragen, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die Abdichtung noch nicht gegeben war. Auch die Waschlösung, mit der potentiell durchgetretenes Material von der Unterseite der Textilprobe abgenommen wurde, konnte vom Rand her in die Fasern eindringen (Dochteffekt). Aus diesen Gründen war es notwendig, ein Verfahren zu entwickeln, dass den kritischen Randbereich der Textilprobe sicher abdichtete und das bereits vor dem Verschrauben mit dem Metallzylinder. Die Verwendung eines zweiten Dichtungsringes, der unter der Textilprobe positioniert wurde, hat sich hierbei als unzureichende erwiesen. Daher wurde eine flexible Silikonmasse am Rand des Probeträgers in Form eines ca. 1 mm breiten dünnen Films aufgetragen. Die Textilprobe wurde darauf gelegt, mit dem Dichtungsring abgedeckt und der Probeträger mit dem Zylinder verschraubt. Durch den dabei ausgeübten Druck wurde die Silikonmasse eng mit der Textilprobe verbunden und auch am Rand bis zu dem Dichtungsring gedrückt. Nach dem Aushärten des Silikons konnte so eine Verbindung zwischen der Textilprobe und dem Probeträger geschaffen werden, die einerseits die Probe dauerhaft an der gewünschten Postion hielt und andererseits die Penetration von Flüssigkeit im Randbereich sicher unterband. Dochteffekte an den Enden der Fasern traten nicht mehr auf. Um diesen Effekt zu erzielen war es wichtig, eine geeignete Silikonmasse zu finden. Um die benötigte Verarbeitungszeit kurz zu halten, sollte sie innerhalb von wenigen Minuten aushärten, im Gegensatz zu üblichen Silikonen, die mehrere Stunden benötigen. Das Haftvermögen musste eine sichere Abdichtung garantieren aber nach Beendigung des Experimentes ein einfaches und restloses Entfernen der Probe und des Materials gestatten. Beides wurde mit Verwendung des hochdetaillierten Abformsilikons TFC Silikon Kautschuk Typ 1 realisiert.

Die Funktionsfähigkeit wurde an High Performance OP-Textilien mit einer konzentrierten Lösung von Fluorescein durchgeführt. 4 ml dieser 10 mM Lösung wurden auf die Textilprobe gegeben und der Probenträger mit dem Zylinder verschraubt. Die Probelösung wurde für 5 min inkubiert und anschließend der Prüfdruck von 14 kPa angelegt für die Dauer von 1 min. Anschließend wurde die Probe weitere 4 min bei Normaldruck inkubiert. Zur Dichtigkeitsprüfung wurde der Probenträger wieder gelöst und die Testlösung mit einer Pipette vollständig entfernt. Die Rückseite der Testprobe wurde mit 3 ml der Spüllösung beschickt und diese für 1 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Spüllösung wurde mit einer Pipette abgenommen und die Fluoreszenz gemessen (Tecan: Anregung 485 nm, Emission 520 nm). Um auch eine sehr niedrige Fluoreszenzintensität detektieren zu können, wurde ein hoher Verstärkungsfaktor von 100 eingestellt. Es wurde ein Wert der Fluoreszenzintensität von 255 AU gemessen, der exakt dem Wert für reines Wasser entsprach.

Legt man das Detektionslimit von < 20 pM zugrunde, das der Hersteller für Fluorescein angibt (Tecan, Handbuch Infinity 200 PRO), wäre ein penetriertes Volumen von 6 pl aufgenommen in 3 ml Waschlösung noch nachweisbar. Ein solch kleines Volumen wäre mit bloßem Auge nicht mehr erkennbar. Es ist damit festgestellt worden, dass der Durchtritt von Fluorescein durch ein High Performance OP-Textil nicht nachweisbar war. Der Normdruck konnte einfach angelegt und über die geforderte Zeit gehalten werden. Das belegt klar, dass das Funktionsmuster geeignet ist, die Textilprobe dicht abgeschlossen zu vermessen. Dieser Aufbau einer Messapparatur lässt sich im Rahmen der weiteren, auf den Ergebnissen aufbauenden Produktentwicklung durch Hersteller von Prüfapparaturen unter Implementierung eines Klemmmechanismus in eine zerstörungsfreie Messapparatur überführen.

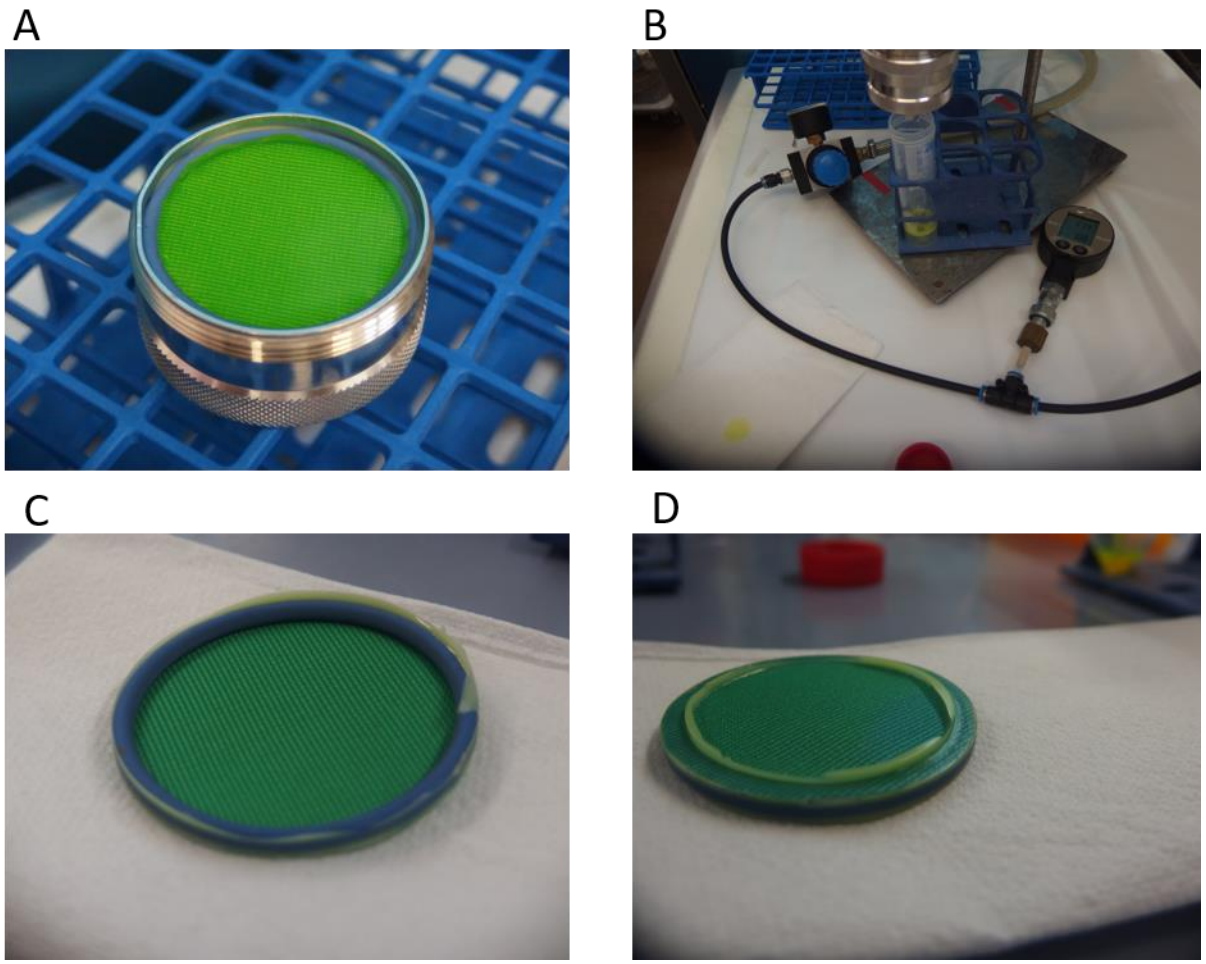


Abbildung 5.12.1: Aufbau der Messapparatur (Funktionsmuster). Für die Messung wurde eine bestehende Apparatur weiterentwickelt. Diese Apparatur aus Edelstahl bestand aus einem Probenträger, in den die Textilprobe eingelegt wurde und der anschließend mit dem Zylinder verschraubt wurde. In dem Zylinder wurde der Druck um 0,14 bar erhöht, was über ein Ventil erfolgte und mittels Manometer kontrolliert wurde. Um die Abdichtung der Textilprobe zu garantieren, wurde diese am Rand in eine dünne Schicht Silikon eingebettet. Dieses Silikon umschloss den Randbereich der Textilprobe sowie den aufgelegten Dichtungsring und wurde beim Verschrauben mit dem Zylinder in engen Kontakt mit den Fasern gepresst. Dazu wurde die Probe auf das noch leicht flüssige Silikon aufgelegt, solange dieses nicht vollständig auspolymerisiert und damit noch formbar war. Nach dem Auspolymerisieren des Silikons in der zusammengesetzten Apparatur wurde diese geöffnet, die Probelösung auf die Textilprobe aufgetragen und die Apparatur verschlossen für den Test.

5.13 Gegenüberstellung von Zielen und erreichten Ergebnissen

5.13.1 Verwendung der Zuwendung

Die Durchführung der unten beschriebenen Untersuchungen erfolgte im Berichtszeitraum durch wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) im Umfang von 19,5 Personenmonaten.

5.13.2 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Ausgaben während der Projektlaufzeit waren für die Durchführung der geleisteten Arbeit notwendig und angemessen. Die im Berichtszeitraum durchgeführten Arbeiten stellen die Umsetzung der im Forschungsantrag vorgesehenen Arbeitsschritte dar und waren für die Erreichung des Forschungsziels wichtig. Die geleisteten Arbeiten waren zur Bearbeitung der genannten Arbeitspakete erforderlich.

Nr.	Ziel des Arbeitsschrittes	Erzielte Ergebnisse
1	Entwicklung von DNA-Hairpins	Es konnten erfolgreich geeignete DNA-Hairpins entwickelt und im Loop-Bereich mit einer Schnittstelle für das DNAzym versehen werden. Die gebundenen DNA-Hairpins stabilisierten die GNP in Dispersion. Die Ablösung eines DNA-Einzelstrangs nach DNAzym-vermittelter Spaltung der Hairpins in Gegenwart von Polyelektrolyten scheiterte aufgrund von Löslichkeitsinkompatibilität der Polyelektrolyte. Unter Beibehaltung von Oligonukleotiden mit DNAzym-Schnittstelle konnte ein alternativer Mechanismus entwickelt werden. ➔ **Teilweise erfolgreich durchgeführt.**
2	Entwicklung einer „DNAse B“	Verschiedene literaturbeschriebene DNAzyme wurden verglichen. Für die gewählte DNAse mit der höchsten Aktivität wurden die Reaktionsbedingungen optimiert. Die Sequenz des DNAzyms sowie des Hairpin-Substrats wurden aufeinander abgestimmt und die Kinetik des Substratumsatzes gelelektrophoretisch analysiert. ➔ **Erfolgreich durchgeführt.**
3	Entwicklung eines Tandem-DNAzyms ohne Initiator-Sequenz	Für das „DNAzym A“ wurde basierend auf Literaturdaten eine dem „DNAzym B“ verwandte Sequenz gewählt und so identische Reaktionsbedingungen für beide DNAzyme ermöglicht. Die Entwicklung beider DNAzyme beinhaltete eine spezifische Anpassung an die jeweilige Substratstruktur und die Integration einer Spacer-Sequenz. Das *in silico* designte Tandem-DNAzym wurde experimentell getestet und die Aktivität beider DNAzyme experimentell erfolgreich nachgewiesen. ➔ **Erfolgreich durchgeführt.**

4	Entwicklung der zirkulären Matrizen-DNA	Die Sequenz des entwickelten Tandem-DNAzyms wurde in eine Matrizen-DNA umgesetzt. Dabei wurde die komplementäre Bindungssequenz für den Initiator integriert und die Länge der Matrizen-DNA auf das Minimalmaß reduziert. Die Ligation wurde mit der T4-Ligase realisiert und durch Verwendung eines entwickelten Splint-Oligonukleotids eine hohe Reinheit des zirkularisierten Ligationsproduktes erzielt. Die RCA an der zirkularisierten Matrize konnte erfolgreich mit Phi29-Polymerase demonstriert werden. ➔ **Erfolgreich durchgeführt.**
5	Entwicklung von Surrogat-GNP	Die Surrogat-GNP wurden mit Thiol-funktionalisierter Initiator-DNA funktionalisiert, wobei 2 Methoden erfolgreich eingesetzt wurden. Die unterschiedliche Dichte der DNA auf der Oberfläche wurde durch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden bestimmt, durch dieses Verfahren wurde zugleich die Zugänglichkeit der Initiator-DNA für eine Hybridisierung nachgewiesen. ➔ **Erfolgreich durchgeführt.**
6	Entwicklung der Tandem-DNAzym Hyperamplifikation	Sowohl die enzymatische Aktivität beider DNAzyme als auch die RCA-vermittelte Amplifikation der zirkulären Matrizen-DNA konnten erfolgreich demonstriert werden. Die RCA unter Verwendung von Phi29-Polymerase und die DNAzym vermittelte Hydrolyse von DNA machten unterschiedliche Pufferzusammensetzungen notwendig, waren jedoch nicht miteinander kompatibel. Hierdurch ließ sich keine gleichzeitige RCA-vermittelte Amplifikation unter sofortiger Freisetzung der Tandem-DNAzym-Einheiten realisieren. Eine exponentielle Hyperamplifikation erscheint jedoch zukünftig durch Entwicklung alternativer Puffersysteme oder Einsatz alternativer katalytischer Systeme umsetzbar. ➔ **Teilweise erfolgreich durchgeführt.**
7	Untersuchung der Methodenäquivalenz und Lagerstabilität	DNA-funktionalisierte GNP-Surrogatpartikel, DNA-Substrat-funktionalisierte Indikator-GNP und zirkuläre Matrizen-DNA erwiesen sich über mehr als 4 Wochen lagerstabil bei Raumtemperatur. Die zur RCA benötigte Phi29-Polymerase lässt sich gefroren in Puffer mehr als 1 Jahr lagern und kann unmittelbar vor Testdurchführung zugegeben werden. Die Methodenäquivalenz konnte aufgrund der zu AS 6 beschriebenen Restriktionen noch nicht experimentell demonstriert werden. ➔ **Teilweise erfolgreich durchgeführt.**
8	Zerstörungsfreie Prüfapparatur und Praxisuntersuchung	Die bei einer zerstörungsfreien Prüfapparatur (Funktionsmuster) bestehende Herausforderung einer absolut viren- und flüssigkeitsdichten Fixierung der Textilprobe konnte durch Verwendung einer speziellen Silikonabdichtung erfolgreich gelöst werden. ➔ **Erfolgreich durchgeführt.**
9	Dokumentation und Berichterstattung	Die Ergebnisse wurden kontinuierlich dokumentiert. ➔ **Erfolgreich durchgeführt.**

6 Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

6.1 Durchgeführte spezifische Transfermaßnahmen während der Laufzeit des Vorhabens			
Transfermaßnahme	**Ziel**	**Ort/Rahmen**	**Datum/Zeitraum**
wfk-Homepage	Schnelle Verbreitung des neuen Forschungs-themas	Vorstellung des Projektes	Durchgeführt: 11. Januar 2022
Zeitschrift „wfk news“	Transfer in die Wirtschaft	Vorstellung ausgewählter Ergebnisse	Ausgabe: 2023 (5): 6-8
wfk Activity Report	schnelle und umfassende Verbreitung der Ergebnisse	Vorstellung des Projektes bzw. der Ergebnisse	Durchgeführt: April 2022 April 2023
Sitzung wissenschaftlicher Beirat der Forschungseinrichtung	Transfer in die Branche der textilen Dienstleister	Vorstellung der Ergebnisse und Diskussion des weiteren Vorgehens	Durchgeführt: 22. Juni 2022 22. Juni 2023
Zeitschrift „Wäscherei + Reinigungspraxis“	Ergebnisverbreitung in der Branche	Vorstellung ausgewählter Ergebnisse	Ausgabe: 2023 (6): 40-41
Projektbegleitender Ausschuss (PA)	Ergebnisse werden kontinuierlich im PA diskutiert.	Vorstellung des Projekts und der Ergebnisse; Diskussion der geplanten Arbeiten; Abschlusspräsentation und Diskussion der erzielten Ergebnisse	Durchgeführt: 23.05.2022 30.03.2023 23.11.2023 19.02.2024
6.2 Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach Abschluss des Vorhabens			
Transfermaßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/Zeitraum
wfk-Homepage	Ergebnistransfer in die Wirtschaft	Zusammenfassung der Ergebnisse	2. Quartal 2024
wfk Activity Report	schnelle und umfassende Verbreitung der Ergebnisse	Vorstellung des Projektes bzw. der Ergebnisse	2. Quartal 2024
Publikation in „wfk-news“	Ergebnistransfer in die Branche der textilen Dienstleister	Zusammenfassung der Ergebnisse	3. Quartal 2024
Zeitschrift „Wäscherei + Reinigungspraxis“	Ergebnisverbreitung in der Branche	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	3. Quartal 2024
International Detergency Conference (IDC)	Ergebnistransfer in die Wirtschaft	Vorstellung der Projektergebnisse	2. Quartal 2025
ISO/TC 94/SC 13/WG 6	Transfer in die Normung	Vorstellung ausgewählter Ergebnisse	2. Quartal 2025

Die Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts wird als sehr gut eingeschätzt. Die dargestellten Transfermaßnahmen führen zu einer Verbreitung der erzielten Projektergebnisse bei textilen Dienstleistern, Konfektionären von OP-Textilien, Herstellern von OP-Textilmaterialien sowie Prüflaboratorien und Anbietern von Waschchemikalien. Die textilen Dienstleister, die zumeist als Betreiber der OP-Textilien agieren, oder spezialisierte Prüflabore können hierdurch die Projektergebnisse aufgreifen und im Rahmen der Produktentwicklung eigene Schnelltestsysteme zum Nachweis der Barrierewirkung von OP-Textilien entwickeln. Durch die Projektergebnisse erhalten alle an OP-Textilien beteiligten Verkehrskreise eine wichtige Hilfestellung, um mit der nach Veröffentlichung von ISO/WD20384 geforderten Prüfung der Barrierewirkung gegenüber der Penetration flüssigkeitsgetragener Viren umzugehen und die Anforderungen zukünftig nach der Produktentwicklung einfach erfüllen zu können.

7 Zusammenfassende Diskussion und Folgerungen für die Praxis

OP-Textilien (OP-Mäntel und Abdecktücher) müssen einen hinreichenden Schutz gegenüber der Penetration von potentiell pathogenen Mikroorganismen gewährleisten. Das betrifft einerseits den Schutz der operierten Person (Schutzwirkung für Patienten), die aufgrund der OP-Wunde besonders gefährdet ist. Im Sinne dieser Schutzwirkung für Patienten erfolgt die Zulassung von OP-Textilien als Medizinprodukt. Auf der anderen Seite müssen die operierenden Personen vor Gefährdungen geschützt werden, die mit dem Kontakt zu Blut und anderen Flüssigkeiten einhergehen, die bei der Operation freigesetzt werden. Diese Schutzwirkung für den Operateur wird üblicherweise durch Schutzausrüstung erfüllt und ist im Fall von OP-Textilien inkludiert. Während in Deutschland bislang Vorgaben existieren, wie ein solcher Schutz gegenüber Bakterien gewährleistet und entsprechend getestet werden soll, existieren solche Prüfanforderungen für die Testung der Barrierewirkung gegenüber flüssigkeitsgetragenen Viren bislang nur in den USA (ASTM F1671) [9]. Eine Angleichung der Prüfanforderungen an OP-Textilien im Verkehrsbereich USA und Europa sowie weiteren Ländern steht durch die aktuelle Erarbeitung einer harmonisierten ISO-Norm (ISO/WD 20384) bevor

Das bedeutet, dass zukünftig auch textile Dienstleister in Deutschland, die OP-Textilien aufbereiten und wieder in Verkehr bringen, entsprechende Prüfungen durchführen oder bei externen Speziallabors in Auftrag geben müssen. Der Zeit- und Kostenaufwand kann jedoch mit einem einfachen Testverfahren, das vor Ort durchführbar, d.h. innerbetrieblich anwendbar ist, deutlich gesenkt werden. Dazu ist es notwendig, die Testung außerhalb eines mikrobiologischen Labors durchführbar zu machen. Hierzu sollte im Rahmen dieses Forschungsvorhabens ein Verfahren entwickelt werden, das auf die Verwendung von Viren verzichtet und an deren Stelle Surrogat-Partikel einsetzt, die den normativ eingesetzten Prüfviren hinsichtlich ihrer Penetrationseigenschaften und insbesondere hinsichtlich ihrer Größe gleichen.

Der gemäß ASTM F1671 festgelegte normative Prüfvirus Phi-X 174 (Bakteriophage) besitzt ein ikosaedrisches Kapsid und kann daher als annähernd sphärisch angenommen werden. Der Durchmesser ist mit 27 nm sehr klein und repräsentiert humanpathogene Viren wie Hepatitis C.

Als Surrogat-Partikel wurden Gold-Nanopartikel eingesetzt, die in dem für Viren relevanten Größenbereich kommerziell erhältlich sind und eine geringe Standardabweichung des Durchmessers aufweisen. Zur Funktionalisierung der Goldoberfläche konnte auf etablierte Methoden zurückgegriffen werden, so sind beispielsweise die adsorptive Bindung von DNA oder die Kopplung von Molekülen über deren Thiolgruppe beschrieben. Diese Funktionalisierung der Surrogat-GNP war entscheidend für den Nachweis, der zur Aufgabe hatte, ein einzelnes durch die Textilprobe penetriertes Partikel zu detektieren. Hierzu wurde ein molekularbiologischer Verstärkungsmechanismus eingesetzt, der durch Initiator-Oligonukleotide ausgelöst wird, die auf der Oberfläche der

Surrogat-GNP gebunden wurden. Die durch den molekularbiologischen Verstärkungsmechanismus in hoher Anzahl produzierten DNA-Einheiten besaßen zwei enzymatisch aktive Bereiche (Tandem-DNAzyme), durch deren Aktivität eine Farbänderung eines Indikators hervorgerufen werden sollte. Hierzu wurden Indikator-GNP entwickelt, die mit einem Indikator- bzw. Substrat-Oligonukleotid (DNA) funktionalisiert wurden. Diese Indikator-Oligonukleotide waren notwendig, um die Indikator-GNP in Dispersion zu stabilisieren. Die Funktion der Tandem-DNAzyme lag darin, diese Indikator-Oligonukleotide zu hydrolysieren, so dass die nicht länger stabilisierten Indikator-GNP agglomerierten, was für einen mit bloßem Auge sichtbaren Nachweis genutzt werden kann.

Der zur Indikation eingesetzte Farbumschlag basiert auf den optischen Eigenschaften von nanoskaligen Goldpartikeln in wässriger Lösung. Diese optischen Eigenschaften sind sowohl abgängig von der Größe der dispergierten Partikel als auch von der Größe der gebildeten Agglomerate. Einzelne dispergierte Partikel weisen eine rote Farbe auf. Bei Agglomeration der GNP kommt es zu einem Farbumschlag von rot über lila nach blau. Die einzelnen Indikator-GNP wurden durch auf der Oberfläche gebundene Indikator-Oligonukleotide in Dispersion stabilisiert und eine Agglomeration so unterbunden. Hierbei spielte die hohe negative Ladung der Oligonukleotide eine entscheidende Rolle, die eine elektrostatische Abstoßung bewirkt und die einzelnen GNP so voneinander entfernt hält. Um den Farbumschlag zu generieren, sollten die als Hairpin realisierten Indikator-Oligonukleotide nach dem Schneiden durch die DNAse B des Tandem-DNAzyms von einem speziellen Polyelektrolyten gebunden und so von den Indikator-GNP abgelöst werden. Dazu wurden die zwei Polykationen PDDA und PFP eingesetzt und hinsichtlich ihrer Wirkung untersucht. Das Kriterium, nur einzelsträngige DNA zu binden, wurde von PDDA nicht erfüllt, während für PFP bekannt ist, dass es bevorzugt einzelsträngige DNA bindet. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss dieses Polyelektrolyten auf die GNP untersucht, bevor diese mit den stabilisierenden Oligonukleotiden funktionalisiert wurden. Es wurde festgestellt, dass die GNP, die Tenside auf der Oberfläche trugen, nur wenig von PFP beeinflusst wurden, während mit Citrat-funktionalisierte GNP (GNP Typ C) eine deutliche Farbänderung nach blau zeigten. Diese fand bei einer PFP-Konzentration von 1 µM für eine 1 nM GNP Dispersion statt, während bei einer höheren GNP-Konzentration von 5 nM auch eine größere Konzentration des PFP von 10 µM notwendig war, um diese Farbänderung auszulösen. Die Bindung der Tensid-Moleküle auf der GNP-Oberfläche bewirkt also eine bessere Stabilisierung der Dispersion gegenüber Agglomeration. Weiterhin wurde ermittelt, dass eine adsorptive Bindung der Hairpin-Oligonukleotide eine Citrat-funktionalisierte Oberfläche erforderte, so dass diese GNP vom Typ C für die weiteren Experimente verwendet wurden.

In einem nächsten Schritt wurde ein als geeignet erscheinendes DNAzym ausgewählt und experimentell charakterisiert, das als DNAse B die Indikator-Oligonukleotide von den GNP hydrolysieren sollte. Eine Literaturrecherche ergab mehrere geeignet erscheinende Kandidaten des DNAzyms. Die für die Auswahl entscheidenden Kriterien der Aktivität und Größe der Sequenz führten zur Auswahl des DNAzyms I-R3. Für dieses DNAzym wurden die Reaktionsbedingungen untersucht und optimiert. Der höchste Substratumsatz wurde mit 100 mM NaCl, 40 mM $MgCl_2$ und 4 mM $ZnCl_2$ in einem 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5 erzielt, diese Bedingungen wurden als Reaktionspuffer für die weiteren Experimente festgelegt. Die für dieses DNAzym notwendige Substratsequenz wurde im Loop-Bereich des Hairpin-Oligonukleotids eingebaut. Zur Ermittlung der optimalen Sequenz des Hairpin-Oligonukleotids wurden verschiedene Varianten mit leicht unterschiedlichen Sequenzen beschafft, die durch unterschiedliche Basenpaarungen im Stem-Bereich in ihrer Stabilität variierten. Dadurch sollte die Möglichkeit untersucht werden, mit intaktem Loop (nicht durch DNAzym B hydrolysiert) als doppelsträngige Struktur vorzuliegen, nach der enzymatischen Hydrolyse durch DNAzym B aber zumindest zeitweise in zwei Einzelstränge aufzuschmelzen, welche dann durch den Polyelektrolyten PFP dauerhaft getrennt und somit von der Oberfläche der GNP entfernt werden konnten.

Diese Wechselwirkung zwischen PFP und doppel- beziehungsweise einzelsträngiger DNA wurde experimentell untersucht. Um ein mögliches Aufschmelzen der dsDNA durch die Bindung von PFP detektieren zu können, wurde ein spezieller Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) eingesetzt, dessen Spektrum sich verschiebt, wenn er an einzelsträngige DNA (ssDNA) beziehungsweise an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Hierdurch konnte gezeigt werden, das kurze dsDNA wie auch im doppelsträngigen Stem-Bereich identisch aufgebaute Hairpins (7 Basenpaare im Stem-Bereich) durch die Bindung von PFP in Einzelstränge aufgeschmolzen werden. Dieser Effekt konnte durch längere (≥ 30 Basenpaare) und damit stabilere doppelsträngige Segmente unterbunden werden.

Nachdem die Reaktionsbedingungen für das DNAzym festgelegt worden waren, wurde die stabilisierende Wirkung der Indikator-Oligonukleotide auf den GNP untersucht. Im Unterschied zu der bisher eingesetzten GNP-Dispersion in Wasser trugen die im Reaktionspuffer anwesenden Salze in erheblichem Maße zur Destabilisierung der GNP-Dispersion bei. Insbesondere bei den Citrat-stabilisierten GNP spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle. Diese Abstoßung wird durch die in Reaktionspuffer anwesenden Gegenionen in weiten Teilen neutralisiert, so dass die Dispersion bei ca. 70-80 mM NaCl instabil wurde, was spektroskopisch analysiert und optisch an der Farbänderung erkennbar wurde. Die mit DNA funktionalisierten GNP wiesen eine größere Stabilität auf, wobei ssDNA einen größeren Effekt hatte als vergleichbare Hairpin-DNA. Als Grund kann die adsorptive Bindung der DNA an der Goldoberfläche angeführt werden, die insbesondere durch die Nukleobasen herbeigeführt wird. Dagegen weist

doppelsträngige DNA eine höhere negative Ladung auf, die zudem in der Helix-Struktur an der Außenseite lokalisiert ist und repulsiv wirkt, während die für die Bindung relevanten Nukleobasen im Inneren der Helix schlechter zugänglich sind.
Der Polyelektrolyt PFP zeigte ebenfalls eine signifikante Reaktion auf die veränderten Bedingungen des Mediums. Zur Bestimmung seiner Löslichkeit wurde die Fluoreszenzintensität quantifiziert. PFP zeigt sowohl eine optische Absorption als auch eine Fluoreszenz, die für einzelne Moleküle in Lösung sehr ausgeprägt sind. Die Löslichkeit in Wasser ist jedoch aufgrund der weitgehend hydrophoben Molekülstruktur begrenzt und insbesondere mit steigender Salzkonzentration bildet PFP zunehmend Agglomerat aus, die praktisch keine Fluoreszenz zeigen. Dieser Effekt war bereits bei 5 mM NaCl deutlich erkennbar und führte zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität im Reaktionspuffer auf 0,04 % verglichen mit der Fluoreszenzintensität in Wasser. Eine weitere Zugabe von DMSO als Lösungsvermittler wie auch verschiedener Detergenzien zeigten nur minimalen Effekte.
Daher wurde alternativ die Substrat-DNA als lineares Molekül über eine Thiol-Gold-Bindung an die GNP gekoppelt. Die ssDNA wurde so designt, dass die Schnittstelle des DNAzyms nahe an der Partikeloberfläche lokalisiert war, so dass sich nach der Spaltung der größte Teil des Indikator-Oligonukleotids vom GNP ablöste. Dadurch sollte sich die stabilisierende Wirkung der DNA in Gegenwart der hohen Salzkonzentration so weit reduziert werden, dass die Farbänderung der Partikel eintritt.
Die Kopplung der DNA an die GNP wurde über die integrierte Thiol-Gruppe durchgeführt, die eine starke Bindung zu Goldoberflächen ausbildet. Auch über Thiole gekoppelte DNA kann darüber hinaus unspezifisch an der Goldoberfläche adsorbieren, wie es ursprünglich zu Bindung der Hairpin-DNA geplant war. Dadurch würde die Bindung komplementärer DNA unterbunden, was aber für die Initiation der RCA sowie die Spaltung durch das DNAzym essentiell war. Daher wurde die Dichte der DNA auf der Goldoberfläche – das heißt, die Anzahl DNA-Moleküle pro Fläche – erhöht, so dass die weiteren über die vergleichsweise starken Thiol-Gold-Bindungen gekoppelten DNA-Moleküle die schwach gebundenen adsorbierten DNA-Stränge verdrängen. Dazu wurden zwei Techniken erfolgreich durchgeführt und die Methode des Freeze-Thawing für die weiteren Experimente eingesetzt. Durch diese Technik konnten im Mittel 66 Oligonukleotide auf der Oberfläche eines GNP immobilisiert werden. Diese waren in der Lage, mit komplementärer DNA zu hybridisieren und erfüllen damit die genannte Anforderung.

Das zweite DNAzym des Tandem-DNAzyms, die DNAse A, wurde so gewählt, dass es strukturelle Ähnlichkeit zur DNAse B aufwies und somit dieselben Reaktionsbedingungen für beide DNAzyme genutzt werden konnten. Das DNAzym I-R1 erfüllte diese Bedingung und es wurden 3 Varianten entwickelt und vergleichend untersucht. Es handelte sich um ein selbstschneidendes

DNAzym, das sich in einen Hairpin faltet und im Loop die katalytische Sequenz wie auch die gespaltene Sequenz trägt. Die Variante I-R1c erreichte nach ca. 4 Stunden einen fast vollständigen Umsatz und wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Nachdem beide DNAsen entwickelt und getestet waren, wurden sie als Tandem-Sequenz zusammengefügt. Dazu wurden sie über ein Linker-Segment miteinander verbunden, das beiden Einheiten räumliche Distanz und Flexibilität gewährte. Es wurde gezeigt, dass beide DNAzyme auch als Tandem katalytische Aktivität aufwiesen. Dabei ist für die DNAse A nach 4 Stunden ein Umsatz von über 50 % des Substrats und nach 24 Stunden eine fast vollständige Umsetzung des Substrats ermittelt worden.

Für die DNAse B wurde bereits nach 15 Minuten eine deutliche Produktion des Spaltproduktes nachgewiesen. Die weitere Zunahme der Produktmenge war allerdings sehr langsam. Es wurde ein 5facher molarer Überschuss an Substrat eingesetzt, der nach 24 Stunden nicht vollständig umgesetzt wurde. Das Substrat und damit auch das gespaltene Produkt binden über Basenpaarungen mit dem DNAzym, daher ist die Bindung des Produktes ähnlich stark wie die des Substrates. Die Dissoziation des Produktes erfolgt relativ langsam, was zu einer Blockierung des DNAzyms für weitere Reaktionen führt. Im Fall der DNAse A würde ein solches Verhalten weder stören noch bemerkbar sein, da die DNAse A ausschließlich die eigene DNA-Sequenz schneidet, also nur eine einzige Reaktion ausführt. Eine genauere Analyse war durch die Gelelektrophorese nur bedingt möglich, da die denaturierende Urea-PAGE alle in der Reaktionslösung vorliegenden doppelsträngigen DNA-Segmente in Einzelstränge überführte.

Eine mögliche Steigerung der Aktivität könnte durch eine Anpassung der Substrat-Sequenz erfolgen. Eine Änderung der Basensequenz würde die Bindungsenergie von DNAzym und Produkt reduzieren und damit eine Dissoziation erleichtern. Damit würde aber in gleicher Weise die Bindung des Substrates geschwächt, so dass ein solcher Schritt vorerst nicht durchgeführt wurde aber bei nachfolgenden Entwicklungen realisiert werden kann.

Die Produktion des Tandem-DNAzyms erfolgte durch die RCA, die zu einer Hyperamplifikation erweitert werden sollte. Dazu wurde die Sequenz des Tandem-DNAzyms in einen komplementären Matrizenstrang überführt und dieser zu einem Ring geschlossen. Eine direkte Umsetzung der Tandem-DNAzym Sequenz mit dem zusätzlichen Einbau einer Bindestelle für die Initiator-DNA hätte die Struktur unnötig vergrößert. Es wurde daher ein natürlich vorliegender einzelsträngiger Bereich als Bindestelle für den Initiator definiert und dessen Sequenz entsprechend angepasst. Weiterhin wurde eine verkürzte Version der DNAse B verwendet, bei der nicht-essentielle Nukleobasen entfernt wurden. So konnte die Größe des Matrizenstranges von 132 auf 93 Nucleotide reduziert werden. Die Ligation zu einem geschlossenen Ring wurde mit der T4-Ligase durchgeführt, die verglichen mit der alternativen CircLigase II eine höhere Produktivität ermöglicht. Für die Ligation war ein komplementäres Splint-Oligonukleotid notwendig, das entsprechend einer

kürzlich veröffentlichten Prozedur optimiert wurde und die Produktion des Matrizenstranges signifikant verbesserte [73]. Unter Verwendung eines einfachen komplementären Spint-Oligonukleotids wurden neben dem gewünschten zirkularisierten Produkt auch di- und oligomere Produkte durch Kopplung mehrerer Matrizenstränge erzeugt. Durch Verwendung des optimierten Splint-Oligonukleotids wurden nicht nur ausschließlich monomere Produkte erzeugt, sondern auch deren Ausbeute erhöht.

Der erzeugte Matrizenstrang wurde für die RCA eingesetzt und unter Verwendung der Polymerase Ph29 sowie des Initiator-Oligonukleotids erfolgreich umgesetzt. Dabei wurde der erwähnte einzelsträngige Loop-Bereich des Matrizenstranges als Bindestelle für das Initiator-Oligonukleotid eingesetzt. Die Gesamtmenge der DNA wurde durch die RCA um den Faktor 80 gesteigert. Dabei war zu berücksichtigen, dass die Konzentration der Matrizen-DNA im Überschuss eingesetzt wurde, bezogen auf die Phi29-Polymerase und somit nur ein geringer Anteil dieser DNA tatsächlich an der Reaktion beteiligt war. Der erzielte Amplifikationsfaktor ist bezogen auf diese Menge an DNA um mindestens 1000x höher.

Bei dieser hohen Amplifikation handelt es sich bislang nur um eine lineare Steigerung, eine weitere exponentielle Steigerung sollte durch die Hyperamplifikation erfolgen. Diese basiert auf der Initiation weiterer RCA-Zyklen durch die gebildeten Tandem-DNAzym Einheiten. Dazu wurde die RCA Reaktion auch in dem für die DNAzyme optimierten Reaktionspuffer durchgeführt. Darin können die gebildeten Tandem-DNAzym Einheiten sich selbst schneiden und somit aus dem langen DNA-Strang herauslösen. Im Gegensatz zu dem zuvor verwendeten Puffer, der vom Hersteller für die Phi29-Polymerase vorgegeben wurde, konnte im Reaktionspuffer keine Zunahme der DNA-Konzentration festgestellt werden. Wahrscheinliche Gründe dafür waren die in Teilen andere Salzzusammensetzung und insbesondere die höhere Konzentration an Kationen, die für die DNAzyme notwendig war. Diese können die Aktivität der Phi29 Polymerase reduzieren [75], so dass die RCA im Reaktionspuffer nicht durchgeführt werden konnte. Da sowohl die DNAzyme als auch die Phi29 Polymerase divergierende Anforderungen an die Pufferzusammensetzung haben, wäre hier eine Anpassung notwendig, welche jedoch die beide Reaktionsschritte von den jeweiligen Optimalbedingungen entfernt und damit die Reaktionsgeschwindigkeit reduzieren würde.

Die Prüfapparatur (Funktionsmuster) wurde basierend auf einem bestehenden Aufbau entwickelt, um diese Apparatur zeiteffizient und kostengünstig zu realisieren. In diesem ersten Aufbau wurde daher ein Stück einer Textilprobe eingesetzt. Eine besondere Herausforderung lag auf der flüssigkeits- und partikeldichten Abdichtung der Probe am Rand der Klemmhalterung.

Diese Herausforderungen konnten durch die Auftragung einer flexiblen Silikondichtmasse am Fixierungsbereich der Textilprobe überwunden werden. Durch hochsensitive Experimente mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde gezeigt, dass die Prüfapparatur das Prüftextil vollständig dicht

abschließt. Die zur Entwicklung und Überprüfung verwendete Schraubfassung lässt sich in eine zerstörungsfreie Klemmapparatur überführen, sodass eine zerstörende Entnahme von Textilproben nicht mehr notwendig ist.

8 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihr innovativer Beitrag und ihre industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Es ist davon auszugehen, dass textile Dienstleister, Prüflaboratorien sowie Hersteller von molekularbiologischen Reagenzien aufbauend auf den Projektergebnissen im Rahmen der Produktentwicklung innerhalb der nächsten Jahre innovative Schnelltest-Kits zur Prüfung der viralen Barriereeigenschaften entwickeln und vermarkten werden, die von Herstellern von OP-Textilmaterialien, Konfektionären, textilen Dienstleistern, Waschmaschinenherstellern und Herstellern von Waschchemikalien zur Qualifizierung ihrer Produkte und Verfahren genutzt werden können. Durch den großen Geltungsbereich der zukünftigen ISO 20384 ergeben sich nicht nur neue nationale Absatzmärkte für ein solches Schnelltestverfahren, sondern es ist mit einer starken internationalen Nachfrage zu rechnen.

Das zugrunde liegende molekularbiologische Prinzip erlaubt zudem die Adaption an andere Problemstellungen und kann somit als Basis für die Entwicklung weiterer Testsysteme genutzt werden. Aufgrund der resultierenden großen Einsparmöglichkeiten ist mit einer schnellen Umsetzung der Projektergebnisse in den o.g. vorwiegend kleinen und mittelständischen Unternehmen zu rechnen.

9 Danksagung

Das IGF-Projekt 21961 N der Forschungsvereinigung Forschungskuratorium Textil e.V. (FKT), Reinhardtstraße 14-16, 10117 Berlin, wurde im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Wir danken ferner herzlich den beteiligten Firmen für die Bereitstellung von Versuchsmaterialien und für die Begleitung der Arbeiten mit Beratung und Unterstützung bei praxisnahen Versuchen.

10 Literaturverzeichnis

[1] Verordnung (EU) 2017/745 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. April 2017 über Medizinprodukte. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0745

[2] Gesetz zur Durchführung unionsrechtlicher Vorschriften betreffend Medizinprodukte (Medizinprodukterecht-Durchführungsgesetz-MPDG). www.gesetze-im-internet.de/mpdg/MPDG.pdf (accessed 19 August 2022).

[3] Verordnung über das Errichten, Betreiben und Anwenden von Medizinprodukten (Medizinprodukte-Betreiberverordnung - MPBetreibV). Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1007/978-3-662-55461-6_58.

[4] von Eiff W: Klinische Textilien im OP der Zukunft: Wirtschaftlichkeit und Qualität von Mehrweg-Produkten. Das Krankenhaus, 2016, 9:777-780

[5] Wirtschaftsverband Textil Service (Wirtex) e.V. (2018): Branchendaten - Kennzahlen der Textil-Service-Unternehmen. Wirtex Branchenkompendium

[6] EN 13795:2013-10. Operationsabdecktücher, -mäntel und Rein-Luft-Kleidung zur Verwendung als Medizinprodukte für Patienten, Klinikpersonal und Geräte - Allgemeine Anforderungen für Hersteller, Wiederaufbereiter und Produkte, Prüfverfahren und Gebrauchsanforderungen. Beuth-Verlag, Berlin

[7] ISO 22610:2006-10. Operationsabdecktücher, -mäntel und Rein-Luft-Kleidung zur Verwendung als Medizinprodukte für Patienten, Klinikpersonal und Geräte - Prüfverfahren für die Widerstands-fähigkeit gegen Keimdurchtritt im feuchten Zustand. Beuth-Verlag, Berlin

[8] ISO 22612:2005-05. Schutzkleidung gegen infektiöse Agenzien - Prüfverfahren zur Beständigkeit gegen mikrobielle Penetration im trockenen Zustand. Beuth-Verlag, Berlin

[9] ASTM F1671 (February 2007): Standard Test Method for Resistance of Materials Used in Protective Clothing to Penetration by Blood-Borne Pathogens Using Phi-X 174 Bacteriophage Penetration as a Test System. ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, USA

[10] ISO 16604:2004-04. Kleidung zum Schutz gegen Kontakt mit Blut und Körperflüssigkeiten - Bestimmung des Widerstandes von Material für Schutzkleidung gegen Durchdringung von Krankheitskeimen, die durch Blut übertragen werden - Prüfverfahren unter Verwendung von Bakteriophage Phi-X-174. Beuth-Verlag, Berlin

[11] EN 29073-3:1992-08. Textilien – Prüfverfahren für Vliesstoffe – Teil 3: Bestimmung der Höchstzugkraft und der Höchstzugkraftdehnung. Beuth-Verlag, Berlin

[12] ISO 13938-1:1999-10. Textilien – Bersteigenschaften von textilen Flächengebilden – Teil 1: Hydraulisches Verfahren zur Bestimmung von Berstdruck und Berstwölbung. Beuth-Verlag, Berlin

[13] ISO 9073-10:2005-03. Textilien – Prüfverfahren für Vliesstoffe – Teil 10: Analyse von Faserfragmenten und anderen Partikeln im trockenen Zustand. Beuth-Verlag, Berlin

[14] ISO 11737-1:2009-09. Sterilisation von Medizinprodukten – Mikrobiologische Verfahren – Teil 1: Bestimmung der Population von Mikroorganismen auf Produkten. Beuth-Verlag, Berlin

[15] EN 20811:1992-08. Textilien – Bestimmung des Widerstandes gegen das Durchdringen von Wasser – Hydrostatischer Druckversuch. Beuth-Verlag, Berlin

[16] AAMI PB 70 (August 2012): Liquid barrier performance and classification of protective apparel and drapes intended for use in health care facilities. Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 4301 N. Fairfax Drive, Suite 301, Arlington, VA 22203-1633

[17] EN 14126:2004-01. Schutzkleidung - Leistungsanforderungen und Prüfverfahren für Schutzkleidung gegen Infektionserreger. Beuth-Verlag, Berlin

[18] Knipe DM, Howley PM (Editors in Chief): Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2007, ISBN-13: 978-0-7817-6060-7

[19] Hambsch B, Bösl M, Eberhagen I, Müller U: Removal of bacteriophages with different surface charges by diverse ceramic membrane materials in pilot spiking tests. Water Sci Technol, 2012, 66(1): 151-157

[20] Duek A, Arkhangelsky E, Krush R, Brenner A, Gitis V: New and conventional pore size tests in virus-removing membranes. Water Res, 2012, 46(8): 2505-2014

[21] Ver BA, Melnick JL, Wallis C: Efficient Filtration and Sizing of Viruses with Membrane Filters. J Virol, 1968, 2(1): 21-25

[22] Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ: Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. Anal Chem, 1995, 67(4): 735-743

[23] Kumar S, Gandhi KS, Humar R: Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method. Ind Eng Chem Res, 2007, 46(10): 3128-3136

[24] Li J, Yao QH, Fu HE, Zhang XL, Yang HH: High sensitive and label-free colorimetric DNA detection based on nicking endonuclease-assisted activation of DNAzymes. Talanta, 2011, 85(1): 91-96

[25] Doria G, Conde J, Veigas B, Giestas L, Almeida C, Assuncao M, Rosa J, Baptista PV: Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. Sensors, 2012, 12(2): 1657-1687

[26] Yeh YC, Creran B, Rotello VM: Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. Nanoscale, 2012, 4(6): 1871-1880

[27] Liu B, Liu J: Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. Anal Methods, 2017, 9(18): 2633-2643

[28] Kirsch J, Siltanen C, Zhou Q, Revzin A, Simonian A: Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. Chem Soc Rev, 2013, 42(22): 8733-8768

[29] Chegel V, Rachkov O, Lopatynski A, Ishihara S, Ynachuk I, Nemoto Y, Hill JP, Ariga K: Gold Nanoparticles Aggregation: Drastic Effect of Cooperative Functionalities in a Single Molecular Conjugate. J Phys Chem C, 2012, 116(4): 2683–2690

[30] Amendola V, Pilot R, Frasconi M, Marago OM, Iati Ma: Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: a Review. J Phys Condens Matter, 2017, 29(20): 203002

[31] Li H, Rothberg LJ: Label-Free Colorimetric Detection of Specific Sequences in Genomic DNA Amplified by the Polymerase Chain Reaction. J Am Chem Soc, 2004, 126(35): 10958-10961

[32] Wang L, Liu X, Hu X, Song S, Fan C: Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers. Chem Commun, 2006, (36): 3780-3782

[33] Li H, Rothberg L: Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(39): 14036-14039

[34] Polavarapu L, Xu QH: Water-Soluble Conjugated Polymer-Induced Self-Assembly of Gold Nanoparticles and Its Application to SERS. Langmuir, 2008, 24(19): 10608-10611

[35] Xia F, Zuo X, Yang R, Xiao Y, Kang D, Vallée-Belisle A, Gong X, Heeger AJ, Plaxco KW: On the Binding of Cationic, Water-Soluble Conjugated Polymers to DNA: Electrostatic and Hydrophobic Interactions. J Am Chem Soc, 2010, 132(4): 1252-1254

[36] Jiang B, Taranekar P, Reynolds JR, Schanze KS: Conjugated Polyelectrolytes: Synthesis, Photophysics, and Applications. Angew Chem Int Ed, 2009, 48(24): 4300-4316

[37] Bala R, Kumar M, Bansal K, Sharma RK, Wangoo N: Ultrasensitive aptamer biosensor for malathion detection based on cationic polymer and gold nanoparticles. Biosens Bioelectron, 2016, 85: 445-449

[38] Xu QH, Wang S, Korystov D, Mikhailovsky A, Bazan GC, Moses D, Heeger AJ: The fluorescence resonance energy transfer (FRET) gate: A time-resolved study. PNAS, 2005, 102(3): 530-535

[39] Gao J, Shimada N, Maruyama A: Enhancement of Deoxyribozyme Activity by Cationic Copolymers. Biomater Sci, 2015, 3(2): 308

[40] Xia F, Zuo X, Yang R, Xiao Y, Kang D, Vallée-Belisle A, Gong X, Yuen JD, Hsu BBY, Heeger AJ, Plaxco KW: Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(24): 10837-10841

[41] Ali MM, Li F, Zhang Z, Zhang K, Kang D, Ankrum JA, Le XC, Zhao W: Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. Chem Soc Rev, 2014, 43(10): 3324-3341

[42] Gu L, Yan W, Liu L, Wang S, Zhang X, Lyu M: Research Progress on Rolling Circle Amplification (RCA)-Based Biomedical Sensing. Pharmaceuticals, 2018, 11(2): 35

[43] Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS: Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. Genome research, 2001, 11(6): 1095-1099

[44] Soengas MS, Gutiérrez C, Salas M: Helix-destabilizing Activity of f29 Single-stranded DNA Binding Protein: Effect on the Elongation Rate during Strand Displacement DNA Replication. J Mol Biol, 1995, 253(4): 517-529

[45] Wang W, Chen C, Qian M, Zhao XS: Aptamer biosensor for protein detection using gold nano-particles. Anal Biochem, 2008, 373(2): 213-219

[46] Pensa E, Cortés E, Corthey G, Carro P, Vericat C, Fonticelli M, Benítez G, Rubert A, Salvarezza R: The Chemistry of the Sulfur-Gold Interface: In Search of a Unified Model. Acc Chem Res, 2012, 45(8): 1183-1192

[47] Liu M, Zhang Q, Chang D, Gu J, Brennan J, Li Y: A DNAzyme Feedback Amplification Strategy for Biosensing. Angew Chem Int Ed, 2017, 56(22): 6142-6146

[48] Liu X, Xue Q, Ding Y, Zhu J, Wang L, Jiang W: A cascade signal amplification strategy for sensitive and label-free DNA detection based on Exo III-catalyzed recycling coupled with rolling circle amplification. Analyst, 2014, 139(11): 2884-2889

[49] Shi D, Huang J, Chuai Z, Chen D, Zhu X, Wang H, Peng J, Wu H, Huang Q, Fu W: Isothermal and rapid detection of pathogenic microorganisms using a nano-rolling circle amplification-surface plasmon resonance biosensor. Biosens Bioelectron, 2014, 62: 280-287

[50] Xu H, Zhang Y, Zhang S, Sun M, Li W, Jiang Y, Wu ZS: Ultrasensitive assay based on a combined cascade amplification by nicking-mediated rolling circle amplification and symmetric strand-displacement amplification. Anal Chim Acta, 2019, 1047: 172-178

[51] Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M: Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation–rolling circle amplification. Nucleic Acids Res, 2009, 37(3): e19

[52] Gu H, Breaker RR: Production of single-stranded DNAs by self-cleavage of rolling-circle amplification products. BioTechniques, 2013, 54(6): 337-343

[53] Zhang XB, Wang Z, Xing H, Xiang Yu, Lu Y: Catalytic and Molecular Beacons for Amplified Detection of Metal Ions and Organic Molecules with High Sensitivity. Anal Chem, 2010, 82(12): 5005–5011

[54] Zhu L, Li G, Shao X, Huang K, Lou Y, Xu W: A colorimetric zinc(II) assay based on the use of hairpin DNAzyme recycling and a hemin/G-quadruplex lighted DNA nanoladder. Microchim Acta, 2020, 187(1): 26

[55] Huang J, Wu J, Li Z: Biosensing using hairpin DNA probes. Rev Anal Chem, 2015, 34(1-2): 1–27

[56] Hollenstein M: DNA Catalysis: The Chemical Repertoire of DNAzymes. Molecules, 2015, 20(11): 20777-20804

[57] Silverman SK: Catalytic DNA (deoxyribozymes) for synthetic applications-current abilities and future prospects. Chem Commun, 2008, (30): 3467-3485

[58] Breaker RR, Joyce GF: A DNA enzyme that cleaves RNA. Chem Biol, 1994, 1(4): 223-229

[59] Schlosser K, Li Y: Biologically inspired synthetic enzymes made from DNA. Chem Biol, 2009, 16(3): 311-322

[60] Silverman SK: DNA as a Versatile Chemical Component for Catalysis, Encoding, and Stereocontrol. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, 49(40): 7180-7201

[61] Silverman SK: Deoxyribozymes: selection design and serendipity in the development of DNA catalysts. Acc Chem Res, 2009, 42(10): 1521-1531

[62] Joyce GF: Forty years of in vitro evolution. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46(34): 6420-6436

[63] Gu H, Furukawa K, Weinberg Z, Berenson DF, Breaker RR: Small, highly active DNAs that hydrolyze DNA. J Am Chem Soc, 2013, 135(24): 9121-9129

[64] Liu J, Cao Z, Lu Y: Functional Nucleic Acid Sensors. Chem Rev, 2009, 109(5): 1948-1998

[65] Travascio P, Li Y, Sen D: DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA-aptamer-hemin complex. Chem Biol, 1998, 5(9): 505-517

[66] Cuenoud B, Szostak JW: A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. Nature, 1995, 375: 611–614

[67] Ma L, Liu J: Catalytic Nucleic Acids: Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology. iScience, 2020, 23(1): 100815

[68] Javadi-Zarnaghi F, Höbartner C: Lanthanide cofactors accelerate DNA-catalyzed synthesis of branched RNA. J Am Chem Soc, 2013, 135(34): 12839-12848

[69] Carmi N, Shultz LA, Breaker RR: In vitro selection of self-cleaving DNAs. Chem Biol, 1996, 3(12): 1039-1046

[70] Ding J, Zhou W, Li X, Sun M, Ding J, Zhu Q: Tandem DNAzyme for double digestion: a new tool for circRNA suppression. Biol Chem, 2019, 400(2): 247-253

[71] Gao J, Shimada N, Maruyama A: Enhancement of Deoxyribozyme Activity by Cationic Copolymers. Biomater Sci, 2015, 3(2): 308

[72] Pamies R, Cifre J, Espın V, Collado-Gonzalez M, Banos F, de la Torre J: Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. J Nanopart Res 2014, 16:2376

[73] Chandra M, Sachdeva A, Silverman S: DNA-catalyzed sequence-specific hydrolysis of DNA. Nature Chemical Biology, 2009, 5(10), 718-720

[74] Paluzzi V, Zhang C, Mao C: Near-Quantitative Preparation of Short Single-Stranded DNA Circles. Angew. Chem. Int. Ed. 2023, 62(16), e202218443

[75] Melin J, Jarvius J, Goransson J, Nilsson M. Homogeneous amplified single-molecule detection: Characterization of key parameters. Analytical biochemistry. 2007, 368:230–238.

[76] Gao Y, He Y, Chen L,Liu X, Ivanov I, Yang X, Tian H: Chimeric Phi29 DNA polymerase with helix–hairpin–helix motifs shows enhanced salt tolerance and replication performance. Microbial Biotechnology 2021, 14(4), 1642–1656