Schlussbericht

TOxAR

Entwicklung eines digitalen Echtzeit-Messsystems für gelöste Schadstoffe im Unterwasser-Umgebungsbereich von Tauchern
Teilvorhaben: TNT-Sensor für ROV/AUV

Förderkennzeichen: 03SX529C
Bewilligungszeitraum: 01.03.2021 bis 29.02.2024 (kostenneutrale Projektverlängerung)
Erstellung des Berichts: 29. August 2024

Förderung durch

Bundesministerium
für Wirtschaft
und Klimaschutz

Projektträger Jülich (PTJ)
Forschungszentrum Jülich GmbH (FZJ)
Schiffstechnik und Grüne Schifffahrt
Postfach 61 02 47
10923 Berlin

miprolab Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostik mbH
Marie-Curie-Str. 8
37079 Göttingen

Ansprechpartner

PD Dr. Frank Gessler
Telefon: 0551 495668-12
E-Mail: gessler@miprolab.com

Dr. Sibylle Pagel-Wieder
Telefon: 0551 495668-14
E-Mail: pagel-wieder@miprolab.com

Inhalt

I. Kurzdarstellung 2
1. Aufgabenstellung 2
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde 2
3. Planung und Ablauf des Vorhabens 2
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde 2
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen 3
II. Eingehende Darstellung 3
1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele 3

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des Spoilers/der Lanze inkl. Teilkomponenten der jeweiligen Kooperationspartner 4
Abb. 2: Chip-Layout zum Nachweis von TNT 4
Abb. 3: Variante I und Variante II des Systemsaufbaus als Einzelmodul 5
Abb. 4: Schematische Darstellung der festzulegenden Parameter des Chips zum Nachweis von TNT 5
Abb. 5: Sukzessive Etablierung eines Referenzsystems für den Nachweis von TNT 6
Abb. 6: Messkopf (identisch zu Feldgerät) angepasst auf Mikrotiterplatte 7
Abb. 7: Fluoreszenzsignal (Fluoreszenzspektrometer) in Abhängigkeit von der TNT-Konzentration – vergleichende Darstellung für unterschiedliche Konzentrationen des Detektionsantikörpers (1 µg/ml; 5 µg/ml) 7
Abb. 8: Komponenten der TNT-Sensoreinheit (d und e); (f) Messaufbau aus Kompartment, Messzelle und Pumpe (nicht sichtbar ⇨ integriert in Kompartment) mit ATTO643N (blaue Messlösung) 8
Abb. 9: ADC Signal (Messkopf IFNANO) in Abhängigkeit von der ATTO643N-Konzentration mit einer Salzlösung (PBS) als Negativkontrolle 8
Abb. 10: Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der TNT-Konzentration (Verdünnung in Meerwasser) 9
Abb. 11: Realtest des Gesamtsystems (Lanze inkl. Bio- und TNT-Sensor, digitaler Signalübertragungseinheiten und Unterwassermodem) 9

I. Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Das Verbundvorhaben hatte zum Ziel, ein Arbeitsschutzsystem für Unterwasserarbeiten zu entwickeln. Das System soll den Taucher während des Einsatzes in Echtzeit vor schädlichen Substanzen warnen.
Im vorliegenden Teilvorhaben wurde ein Sensor zum Nachweis von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT-Sensor), der stationär an einer auf dem Meeresboden fixierten Lanze angebracht wird, entwickelt. Dieser TNT-Sensor ist eine Teilkomponente im Gesamtsystem.
Die Systemintegration erfolgte durch den Verbundpartner MacArtney Germany GmbH. Die Entwicklung, die Optimierung und die Festlegung des TNT-Sensor-Layouts als mikrofluidischer Chip erfolgte in enger Kooperation mit dem Verbundpartner IFNANO.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Koordination des Verbundes erfolgte durch den Kooperationspartner MacArtney. In regelmäßigen Meetings (Online über Videokonferenzen oder in Präsenz), die über MacArtney organisiert wurden, wurden die Ergebnisse der jeweiligen Teilvorhaben vorgestellt und die weiteren Schritte mit den Verbundpartnern abgestimmt.
Da der TNT-Sensor in enger Kooperation mit dem Verbundpartner IFNANO entwickelt wurde, wurden die Abstimmungen zum Messaufbau und Chip-Layout mit dem IFNANO in zusätzlichen Meetings durchgeführt. Ein wesentlicher Vorteil war, dass miprolab und IFNANO am identischen Standort (Göttingen) ihren Sitz haben, so dass nicht nur die Projektbesprechungen, sondern auch gemeinsame Messungen kurzerhand organisiert und durchgeführt werden konnten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Bewilligungszeitraum des Vorhabens mit einer Laufzeit von 30 Monaten war ursprünglich vom 01. Januar 2021 bis 31. August 2023. Am 28. Februar 2023 wurde jedoch ein Antrag auf eine kostenneutrale Verlängerung von 6 Monaten bis zum 29. Februar 2024 gestellt, da es in den Arbeitspakten 6 und 7 gegenüber den im Antrag geplanten Arbeiten zu Verzögerungen gekommen ist. Dem Antrag wurde mit Schreiben vom 28. Juli 2023 stattgegeben. Diese kostenneutrale Verlängerung hat ermöglicht, dass die Arbeiten in AP6 und AP7 und somit das Teilvorhaben mit den geplanten Optimierungen erfolgreich abgeschlossen werden konnten und das Projektziel erreicht wurde.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde

Das Teilvorhaben hatte zum Ziel, einen mikrofluidischen Chip auf Basis von Aptameren, die spezifisch mit TNT reagieren und mit Fluoreszenzpartikeln gekoppelt werden, zu entwickeln.
Zum Zeitpunkt der Antragstellung war kein miniaturisiertes System bekannt, welches in Echtzeit und unter realen Bedingungen im Meerwasser den Nachweis von TNT erbringen konnte. Die recherchierten Nachweismethoden beschränkten sich auf optimierte Rahmenbedingungen in wässrigen Lösungen ohne Sedimentanteil. Die veröffentlichten Daten dienten jedoch dazu, eine Einschätzung der im Meerwasser vorliegenden TNT-Konzentrationen zu erhalten, die nachgewiesen werden müssen, um eine Einschätzung der Gefahrensituation vorzunehmen.

Zudem konnte für die in diesem Teilvorhaben entwickelten Aptamere spezifisch gegen TNT an Literurdaten angeknüpft werden, so dass auf Basis der veröffentlichten Sequenzen eine Synthese der TNT-spezifischen Aptamere erfolgreich durchgeführt werden konnte.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Zusammenarbeit mit anderen Stellen wurde von MacArtney als Verbundkoordinator initiiert und mit den Kooperationspartnern abgestimmt (Details siehe Schlussbericht von MacArtney). Folgende assoziierte Partner wurden hinzugezogen:

HCG Hazard Control GmbH, Visselhövede
Ansprechpartner: Alfred Krippendorf
⇨ Verbundübergreifende Unterstützung bei den Messungen und Nachweis von relevanten Kampfstoffen in den firmeneigenen Laboren; Beratung des Projektkonsortium aufgrund der langjährigen Erfahrung mit Kampfstoffen

Baltic Taucher Bergungsbetrieb GmbH, Rostock
Ansprechpartner: Eyk-Uwe Pap
⇨ Unterstützung bei der Erarbeitung der Anwendungsszenarien (Tauchpersonal) der im Verbund entwickelten Nachweissysteme für Echtzeit und Vor-Ort

Nationales Informationszentrum chemische Kampfmittel (NIcK) e.V., Rostock
Ansprechpartner: Fritz Pfeiffer
⇨ Beratungsfunktion des Expertengremiums für chemische Kampfmittel

II. Eingehende Darstellung

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

Das vorliegende Teilvorhaben hatte zum Ziel, einen mikrofluidischen Sensor zum Nachweis von TNT zu entwickeln, der im Hinblick auf den Arbeitsschutz den Taucher in Echtzeit vor Ort warnen soll. Die Entwicklung und Optimierung sowie die szenariobasierte Erprobung und Validierung erfolgte in enger Kooperation mit dem IFNANO. Der TNT-Sensor stellte eine Teilkomponente im Gesamtsystem, dem Spoiler/der Lanze, dar. Nachfolgende *Abb. 1* zeigt das System inkl. der Teilkomponenten, die von den jeweiligen Kooperationspartnern entwickelt und optimiert wurden.

Abb. 1: Aufbau des Spoilers/der Lanze inkl. Teilkomponenten der jeweiligen Kooperationspartner

Der TNT-Nachweis im mikrofluidischen Chip erfolgte über Aptamere, die spezifisch gegen TNT gerichtet sind. Pump- und Filtervorrichtung sowie Detektionseinheit mit LED/Laserdiode und Fluoreszenzdetektor wurden am IFNANO entwickelt und optimiert (*Abb. 2*).

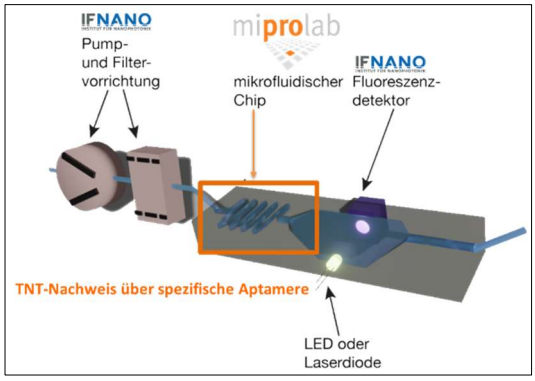

Abb. 2: Chip-Layout zum Nachweis von TNT

Das Teilvorhaben war in folgende Arbeitspakete untergliedert:

AP1	Anwendungsszenarien und Anforderungen
AP2	Voruntersuchungen (Einzelmodul; Gesamtsystem)
AP3	Systemarchitektur (Einzelmodul)
AP4	Labormuster der Einzelkomponente (Aufbau; Test und Optimierung)
AP6	Optimierung (entwicklungsbegleitende Tests; Erstellung verbessertes Labormuster)
AP7	Szenariobasierte Erprobung und Validierung

Da die Ergebnisse zu den o.g. Arbeitspaketen bereits Gegenstand der Zwischenberichte I bis VI waren, werden in den nachfolgenden Abschnitten die wesentlichen Erkenntnisse der einzelnen Arbeitspakete nur in Kürze zusammenfassend dargestellt:

Definition und Festlegung des Systems (Einzelmodul)

Der eigentliche TNT-Nachweis im mikrofluidischen Chip erfolgt über spezifische Aptamere, die mit Fluorophoren markiert und auf dem Chip fixiert werden. Für den Nachweis wurden unterschiedliche Varianten des Chipaufbaus sowie verschiedene Fluorophore mit dem IFNANO im Hinblick auf das

Design der Messeinheit (Anregung: Photodiode; Detektion: LED-Detektor) diskutiert und im frühen Stadium des Vorhabens festgelegt.

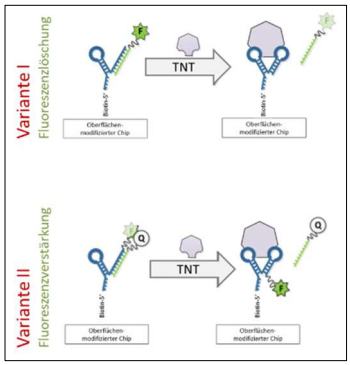

Abb. 3: Variante I und Variante II des Systemsaufbaus als Einzelmodul

Fazit

Festlegung der Variante I (*Abb. 3*) mit TNT-Nachweis über Fluoreszenzlöschung, da hier eine permanente Kontrolle des Chips (⇨ Funktionalität des Systems) erfolgen kann. Das Funktionsprinzip in der Messzelle ist wie folgt:

Das Aptamer wird mit einem ATTO643-markierten Oligonukleotid hybridisiert. Bei Anwesenheit von TNT wird das Oligonukleotid verdrängt und es wird ein TNT-Aptamer-Komplex gebildet. Durch die Dissoziation des ATTO643-markierten Oligonukleotids wird das Fluoreszenzsignal gelöscht, so dass mit zunehmender TNT-Konzentration die Fluoreszenzsignale abnehmen.

Optimierung des Systems als Einzelmodul

Nachfolgende *Abb. 4* gibt einen schematischen Überblick zu den wesentlichen Parametern, die für den TNT-Nachweis im mikrofluidischen Chip als Einzelmodul (Variante I) entwickelt, optimiert und verifiziert wurden.

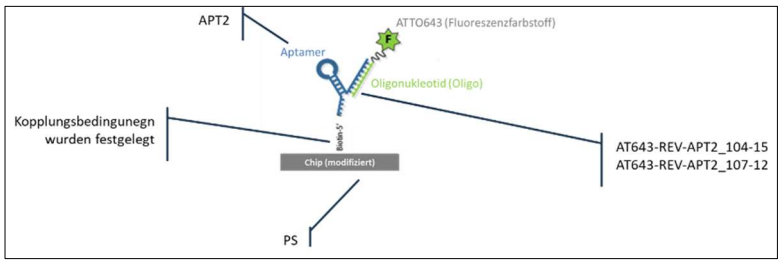

Abb. 4: Schematische Darstellung der festzulegenden Parameter des Chips zum Nachweis von TNT

- Auf Basis von Literaturdaten wurden insgesamt 10 Aptamere, die spezifisch gegen TNT sind und sich in den Sequenzen unterscheiden, ausgewählt.
- Die Aptamere wurden synthetisiert und über ein Pre-Screening mittels Microscale Thermophorese (MST) auf ihre spezifischen Bindungseigenschaften gegenüber TNT überprüft mit dem Ziel, möglichst frühzeitig das Aptamer mit der höchsten Spezifität auszuwählen.
- **APT2** zeigte die beste Perfomance und Spezifität gegenüber TNT und wurde für den mikrofluidischen Chip ausgewählt und festgelegt. Das Aptamer wurde biotinyliert, um eine effiziente Bindung über Streptavidin auf der Chip-Oberfläche zu ermöglichen.

- Synthese von insgesamt 7 verschiedenen ATTO643-Oliognukleotiden, die an unterschiedlichen Positionen des APT2 binden. Diese Untersuchungen waren essentiell, weil die exakte Bindungsposition des TNT an APT2 nicht definiert war und experimentell über die verschiedenen Oligonukleotide bestimmt werden musste.
- Um im finalen Chip eine hohe Spezifität für den TNT-Nachweis und eine Nachweisgrenze im unteren ng/ml-Bereich zu erzielen, wurden unterschiedliche Parameter mit den o.g. Oligonukleotiden und dem APT2 überprüft und getestet:
  1. Hybridisierungs-Puffer unterschiedlicher Zusammensetzung und pH
  2. Aktivierungstemperatur für das Aptamer
  3.Hybridisierungs-Temperatur
  4. Inkubationszeiten für die Hybridisierung
  5. Verhältnis der APT2-Konzentration zu Oligonukleotid-Konzentration
  6. Coating-Konzentration des hybridisierten APT2 auf dem Trägermaterial
  7. Zusammensetzung und Qualität des Streptavidin
  8. Streptavidin-Konzentration für die Aktivierung des Trägermaterials

  Nach Optimierung wurden die Bedingungen für die unter 1. bis 8. geprüften Parameter für den finalen Chipaufbau in Endsystem festgelegt.
- In Abstimmung mit dem Kooperationspartner IFNANO wurden 2 Materialien (PMMA; Poylstyrol) für den Chip geprüft. Folgende Modifizierungen und Untersuchungen wurden durchgeführt:
  - Modifizieren bzw. Coaten der Plättchen mit Streptavidin
  - Variation der Inkubations- und Trocknungszeiten
  - Applikation der hybridisierten Aptamere auf die modifizierten Chips
  - Kontrolle der Kopplungseffizienz über Fluoreszenzmessung

  Polystyrol zeigte eine höhere Kopplungseffizienz als PMMA. Weitere Modifizierungen wie das Schleifen der Oberfläche und die Aktivierung haben einen negativen Effekt auf die Bindung des Aptamers an die Chipoberfläche. Polystyrol wurde als Trägermaterial für den Chip festgelegt.

Fazit

Es wurde ein Sensor für den Nachweis von TNT auf Basis der Aptamertechnologie erfolgreich entwickelt und optimiert.

Referenzsystem und Erstellung eines verbesserten Labormusters

Um ein vergleichbares System für Referenzmessungen vorliegen zu haben, wurde parallel zum TNT-Sensor ein Nachweissystem als Labormuster aufgesetzt. Basierend auf den kompetitiven Nachweis über monoklonale Antikörper und TNT gekoppelt an BSA wurde das System sukzessiv (System 1 bis System 4) entwickelt und optimiert (*Abb. 5*).

	System 1	System 2	System 3	System 4	Chip
System	Lateral Flow Assay	ELISA	Lateral Flow Assay	ELISA	Chip
Festphase	NC-Membran	Mikrotiterplatte	NC-Membran	Mikrotiterplatte	PS
Capture	TNT-BSA	TNT-BSA	TNT-BSA	TNT-BSA	Aptamer (biotinyliert)
Detektion	anti-TNT (mAb)	anti-TNT	anti-TNT (mAb)	anti-TNT (mAb)	--
Marker	CNB (Green)	Enzym (HRP)	ATTO643	ATTO643	Oligo-ATTO643
Status	Done	Done	Done	Done	Done
	ca. 1 ng/ml	ca. 10 ng/ml	nur Machbarkeit	≤ 3 ng/ml	ca. 100 ng/ml

Abb. 5: Sukzessive Etablierung eines Referenzsystems für den Nachweis von TNT

- In Kooperation mit IFNANO (Entwicklung der Messzelle inklusive Detektionseinheit) erfolgten vergleichende Experimente, in denen die Konzentration des Detektionsantikörpers variiert wurde.
- Für die Bestimmung der Nachweisgrenze wurde TNT in einem Konzentrationsbereich von 0,32 bis 1000 ng/ml eingesetzt (2facher Ansatz).
- Als Referenz zur Detektionseinheit (Messkopf; *Abb. 6*) des IFNANO erfolgten zudem die Messungen parallel am Fluoreszenzspektrometer (Laborgerät).

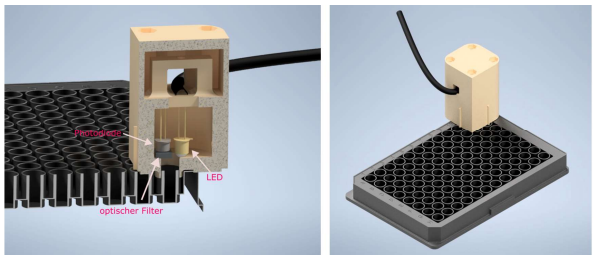

Abb. 6: Messkopf (identisch zu Feldgerät) angepasst auf Mikrotiterplatte

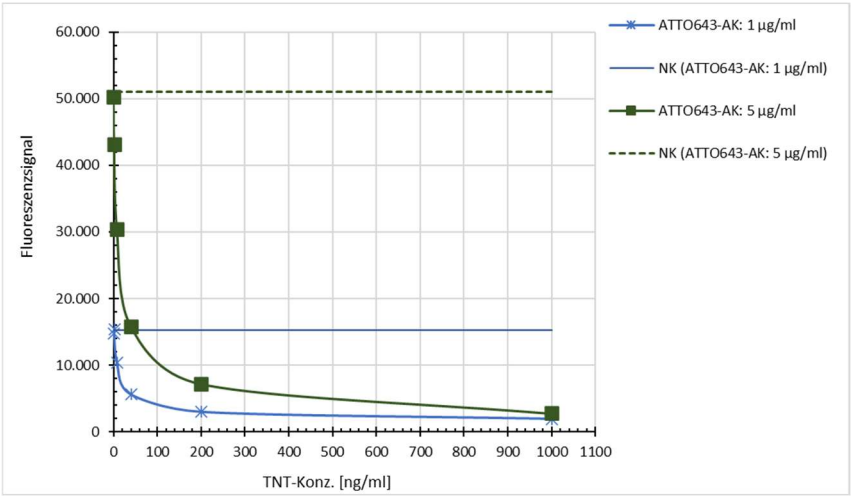

Abb. 7: Fluoreszenzsignal (Fluoreszenzspektrometer) in Abhängigkeit von der TNT-Konzentration – vergleichende Darstellung für unterschiedliche Konzentrationen des Detektionsantikörpers (1 µg/ml; 5 µg/ml)

Fazit

Das antikörper-basierte kompetitive System mit TNT-BSA gekoppelt an die Festphase und einem monoklonalen Antikörper spezifisch gegen TNT (Detektionsantikörper) wurde erfolgreich entwickelt, optimiert und etabliert. Die Ergebnisse der Parallelmessungen mit dem Messkopf von IFNANO zeigten einen identischen Trend zur Referenzmessung mit dem Fluoreszenzspektrometer. Mit zunehmender TNT-Konzentration nahm auch hier das Signal ab. Die Nachweisgrenze lag bei < 3 ng/ml.

Szenariobasierte Erprobung und Validierung

Das Design des Gehäuses (Kompartment) wurde mit den Partnern MacArtney und IFNANO festgelegt und die Messkammer inkl. Chip eingepasst (*Abb. 8*).

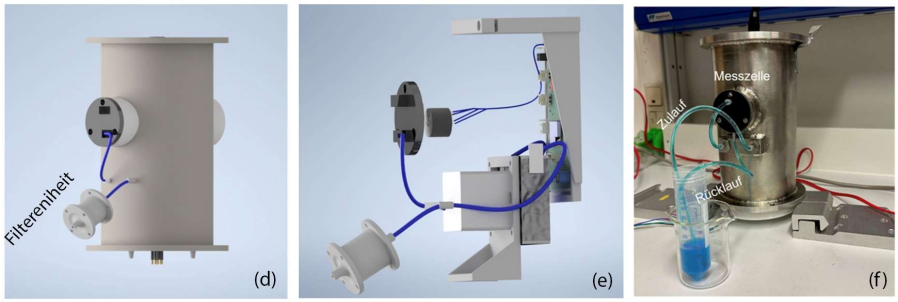

Abb. 8: Komponenten der TNT-Sensoreinheit (d und e); (f) Messaufbau aus Kompartment, Messzelle und Pumpe (nicht sichtbar ⇨ integriert in Kompartment) mit ATTO643N (blaue Messlösung)

- Das Gehäuse inkl. Messkammer (mikrofluidischer Chip mit Messzelle), Pumpe und Filtereinheit wurde in Kooperation mit IFNANO getestet.
- Aus einer Stammlösung des Farbstoffs ATTO643 in DMSO wurde eine Messlösung mit einer Konzentration von 5 µg/ml angesetzt und diese über die Pumpe in die Messzelle überführt.
- Es wurde erfolgreich ein Fluoreszenzsignal gemessen, welches einen deutlichen Signalunterschied zum Hintergrundsignal gezeigt hat.
- Über weitere Verdünnungsschritte wurde die Performance des Systems und des Messkopfes geprüft.
- Es wurde ein deutlicher Unterschied zum Blank (Salzlösung) zu den Signalen generiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff (ATTO643N: 1 bis 5 µg/ml) verzeichnet (*Abb. 9*). Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen den Konzentrationen des Antikörpers gekoppelt an ATTO643N, so dass der Nachweis für die Integration der Antikörper-basierten Methode in das Kompartment des TNT-Sensors erbracht werden konnte.

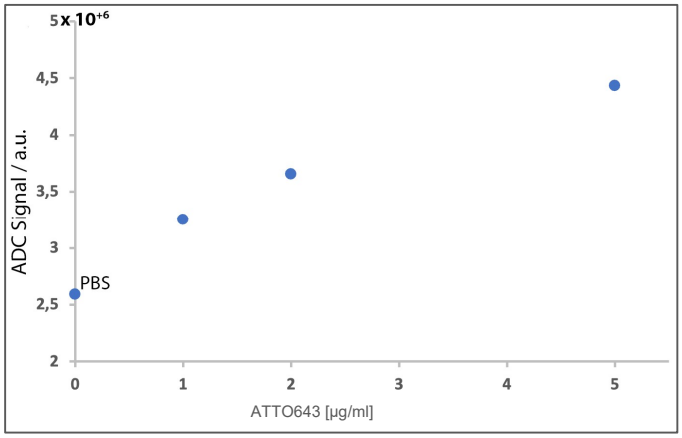

Abb. 9: ADC Signal (Messkopf IFNANO) in Abhängigkeit von der ATTO643N-Konzentration mit einer Salzlösung (PBS) als Negativkontrolle

- In weiterführenden Experimenten wurde die Performance des Systems mit Meerwasser (Ostsee/Kieler Förde) überprüft (*Abb. 10*).

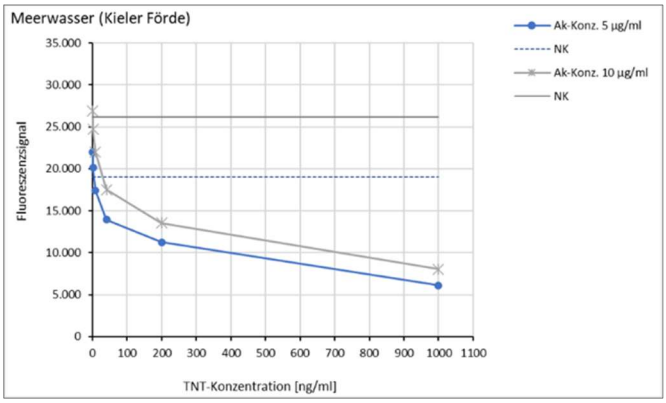

Abb. 10: Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der TNT-Konzentration (Verdünnung in Meerwasser)

- Im Rahmen der Validierung des TNT-Sensors im Gesamtsystem wurde vom Projektpartner MacArtney ein Test des Gesamtsystems (Lanze inkl. TNT- und Bio-Sensoren, digitale Signalübertragungseinheiten und Unterwassermodem) organisiert und mit allen Kooperationspartnern durchgeführt.
- Der TNT-Sensor konnte erfolgreich unter Wasser eingesetzt werden und zeigte keine Undichtigkeit. Zudem konnten die Fluoreszenzsignale über das Unterwassermodem an den externen Empfänger übertragen werden.

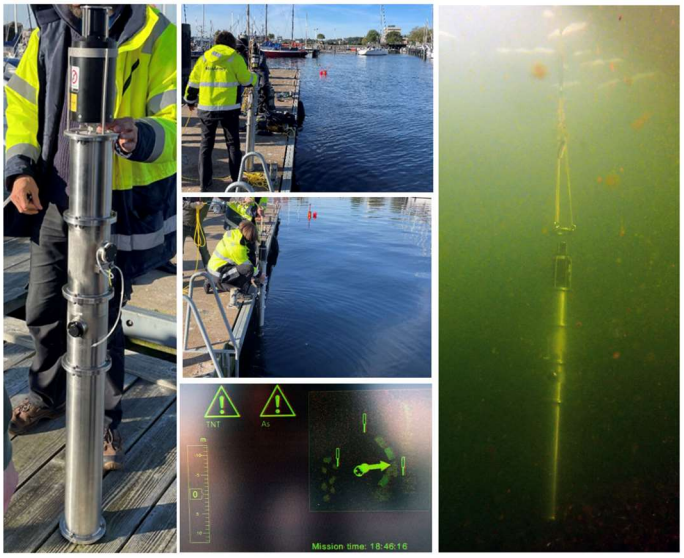

Abb. 11: Realtest des Gesamtsystems (Lanze inkl. Bio- und TNT-Sensor, digitaler Signalübertragungseinheiten und Unterwassermodem)

Gesamtfazit der Teilvorhabens

- ✓ Aptamer (APT2) spezifisch gegen TNT und entsprechendes Oligo wurden entwickelt und auf TNT-Sensor optimiert.
- ✓ Hybridisierungsbedingungen, Chipmaterial inkl. Oberflächenmodifizierungen wurden auf APT2 angepasst und optimiert.
- ✓ Nachweisgrenze lag bei ca. 100 ng/ml.
- ✓ Alternativ wurde ein antikörper-basierter Ansatz entwickelt, optimiert und unter Realbedingungen (Meerwasser) getestet.
- ✓ Nachweisgrenze lag bei < 3 ng/ml.