

Integrierter optischer Biosensor für industrielle Anwendungsfelder

Janette Kothe², Kristof Zarschler¹, Annett Groß¹, Anna Schröter², Kai Ostermann¹, Gerhard Rödel¹, Gerald Gerlach²

¹Institut für Genetik, Technische Universität Dresden

²Institut für Festkörperelektronik, Technische Universität Dresden

Zusammenfassung

In diesem Beitrag wird ein integrierter optischer Biosensor auf Basis eines Hefe-Ganzzellsensorsystems vorgestellt, dessen Funktionsprinzip nachgewiesen und Anwendungspotentiale untersucht. Dabei kommt neben gentechnisch modifizierten Zellen ein kompaktes, optisches Auslesesystem zur Erfassung eines konzentrationsabhängigen Fluoreszenzsignals zum Einsatz.

1 Motivation

Biologische Wandler stellen einen vielversprechenden Ansatz für den Aufbau neuartiger Sensoren dar, mit denen sich bisher nur unzureichend gelöste Messaufgaben im Bereich der Umwelt- und Industrieprozessüberwachung bewältigen lassen. Dabei sind diese Systeme nicht auf die Anwendung im Labor oder Disposable-basierten Point-of-Need-Systemen beschränkt, sondern können vielmehr in solchen Bereichen zum Einsatz kommen, wo portable, günstige und kontinuierliche Echtzeitmessungen mit einem Schwerpunkt auf Bioverfügbarkeit und Aktivität der Analyten von Interesse sind. Mit der Entwicklung eines integrierten Messsystems soll das Potential robuster optischer Biosensoren für den Einsatz in industriellen Umgebungen untersucht werden.

2 Ganzzellsensoren

Gentechnisch modifizierte Mikroorganismen werden bereits heute vielfältig als biologisches Erkennungselement für die Detektion und Quantifizierung von unterschiedlichsten Analyten in Ganzzellsensorsystemen verwendet. Dabei kann die Interaktion zwischen den Mikroorganismen und den zu detektierenden Zielsubstanzen durch eine Vielzahl von Techniken nachgewiesen werden, wobei vor allem elektrochemische und optische Methoden breite Anwendung finden [1]. Die optische Detektion basiert auf der Generierung von Lumineszenz-, Fluoreszenz- oder kolorimetrischen Signalen durch gentechnisch modifizierte Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Anwesenheit bzw. Konzentration der zu detektierenden Zielsubstanz. Dabei wird häufig ein Reportergen mit einem abhängigen Gen bzw. dessen regulatorischen Bereichen fusioniert, was zu einer Induktion oder Repression der Reportergenexpression in Anwesenheit der Zielsubstanz führt [2].

Für den Prinzipnachweis eines integrierten optischen Biosensors wird ein fluoreszenzbasierter Ganzzellsensor auf der Grundlage von rekombinanten Hefezellen aufgebaut, der die Erfassung von verschiedenen Schwermetallkonzentrationen in wässrigen Lösungen gewährleisten soll. Dabei kommt ein zelluläres Verstärkersystem zum Einsatz, bei dem Sensorzellen auf die Anwesenheit eines definierten Schwermetalls mit der Expression und Sekretion eines kleinen löslichen Peptidmoleküls, dem Hefepheromon (α -Faktor) reagieren. Dieses Molekül induziert in α -Faktor responsiven Aktorzellen bzw. Verstärkerzellen die Expression von Fluoreszenzproteinen (FP) oder die Produktion und Sekretion von α -Faktor und führt dadurch zu einer erhöhten Konzentration des Pheromons, was letztlich in einer verbesserten Fluoreszenzinduktion resultiert [3]. Das Konzept des zellulären Verstärkersystems ist in Bild 1 schematisch dargestellt.

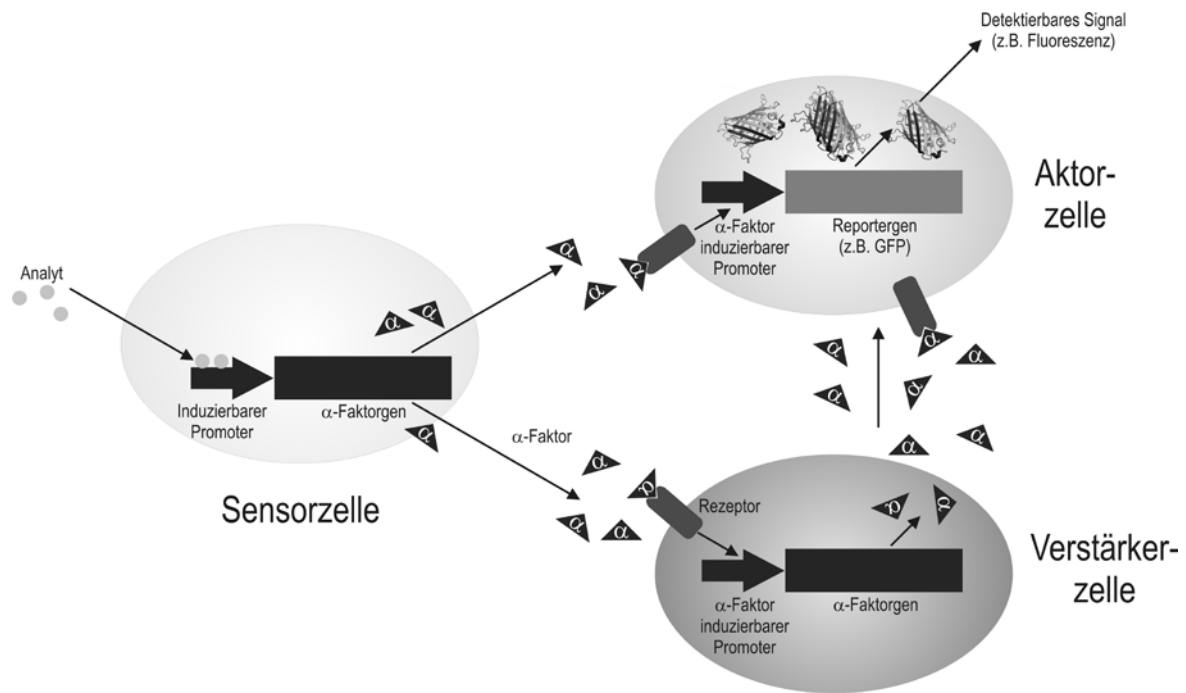


Bild 1 Hefe-basiertes zelluläres Verstärkersystem: Rekombinante Hefe-Sensorzellen reagieren auf die Präsenz auswählbarer Signalmoleküle (Analyt, bspw. Arsen) mit der Sekretion eines kleinen löslichen Peptidmoleküls, dem Hefepheromon (α -Faktor). Dieses Molekül induziert in α -Faktor responsiven Aktorzellen die Expression von Fluoreszenzproteinen und in Verstärkerzellen die Produktion und Sekretion von α -Faktor, was zu einer Erhöhung der Konzentration des Pheromons und damit zu einer Verstärkung des Signals führt.

3 Methoden

Für die Herstellung von α -Faktor responsiven Aktorzellen wurden Hefen des *Saccharomyces cerevisiae* Stammes BY4741 *bar1Δ* [*MATa*, *ura3Δ0*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *his3Δ1*, *yil015w::kanMX4*] (Euroscarf, Frankfurt, Deutschland) verwendet und mit den Hefepiasmiden p426FIG1 bzw. p426FIG1-EGFP transformiert [3]. In letzteren Zellen ist die Expression des FP EGFP durch α -Faktor induzierbar. Für die Erfassung der α -Faktor abhängigen Generierung eines EGFP-Fluoreszenzsignals wurden diese Zellen zunächst über Nacht wie von GROß et al. beschrieben [3] inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen in einem Verhältnis von 1:5 in frischem Medium verdünnt und weitere zwei Stunden kultiviert. Die Zellen wurden danach bei 3500 x g für 10 min zentrifugiert und die optischen Dichte OD₆₀₀ auf 2,0 eingestellt. Je 1 mL dieser Zellsuspension und 1 mL Medium ergänzt mit 2 μ M synthetischem α -Faktor (Zymo Research, Irvine, CA, USA) wurden in einer sterilen 35 mm μ -Petrishale (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) gemischt und für die Fluoreszenzmessung in einem verdunkelten, auf 28°C temperierten Inkubationsraum verwendet.

Mit dem in Bild 2 dargestellten Aufbau wurde der Ansatz über einen Zeitraum von 24 Stunden beobachtet. Die gewählte transmissive Topologie verbindet hohe technologische Flexibilität und Miniaturisierungs- bzw. Integrationspotential mit geringen optischen Verlusten. Um die induzierbare EGFP-Fluoreszenz erfassen zu können, ist eine anregende Strahlung im blauen Wellenlängenspektrum und ein Detektor, der selektiv die grüne Emission erfasst, nötig. Um die Komplexität des Systems zu reduzieren, wurde nur ein Filter verwendet. Dieses muss den Wellenlängenbereich der Anregung mit hoher optischer Dichte sperren und gleichzeitig die Fluoreszenzemission durchlassen.

In einem parallelen Ansatz wurde eine analog präparierte Petrishale mit Hilfe eines Axio Observer Fluoreszenzmikroskops (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) unter Verwendung eines Inkubators (XLmulti S1) bei einer konstanten Temperatur von 28°C für den entsprechenden Versuchszeitraum analysiert. Die Bildaufnahme eines identischen Bereichs erfolgte mittels AxioVision

Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) alle 15 min, wobei ein 40x Objektiv (C-Apochromat, NA1,2) und ein entsprechender Filtersatz (38 HE eGFP shift free) verwendet wurden.

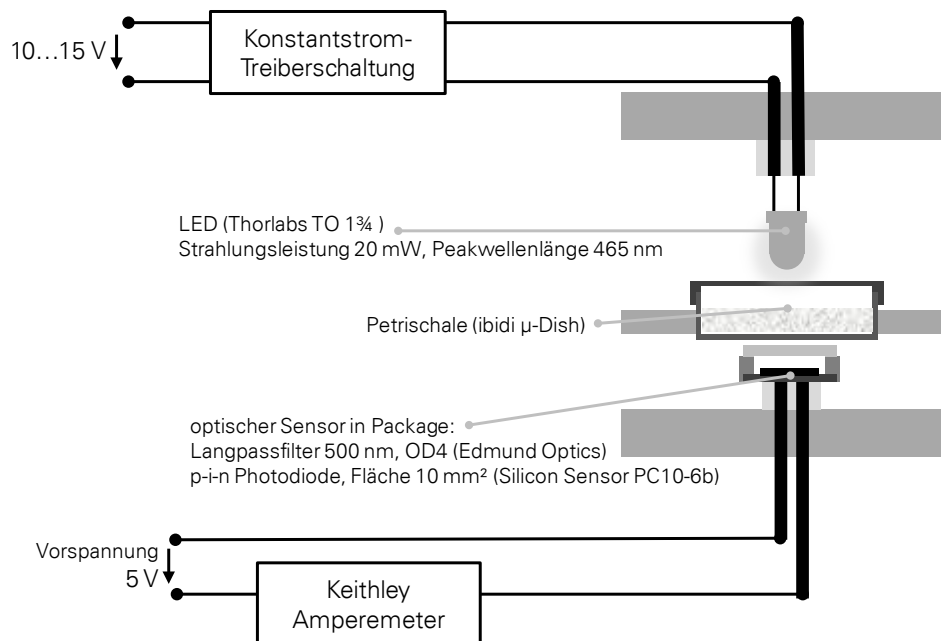


Bild 2 In einem transmissiven Messaufbau sind Anregungsquelle, Probe (Zellsuspension/Medium) und optisches Sensor kompakt angeordnet. (Einzelheiten siehe Text)

4 Ergebnisse und Diskussion

In Bild 3 sind die Ergebnisse der Messungen dargestellt. Während bei der Kontrolle mit zellfreiem Medium ein sehr stabiler Photostrom gemessen werden konnte, unterlagen die Messungen mit Hefezellen einer größeren Streuung, wie sie für biologische Systeme typisch ist.

Das durch das intrazelluläre FP generierte Fluoreszenzsignal kann mit dem gewählten Messaufbau etwa sieben Stunden nach der Zugabe des Hefepheromons sicher erfasst werden, wobei die Fluoreszenz im mikroskopischen Bild je nach Belichtungszeit bereits nach etwa zwei Stunden zu erkennen ist. Der relativ lange Zeitraum zwischen Applikation des Stimulus und frühester Detektion der Fluoreszenz ist durch mehrere biologische Prozesse bedingt. Zunächst setzt die Anwesenheit des Pheromons nach dessen Bindung an spezielle Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, wodurch letztendlich im Zellkern die Genexpression induziert wird [4]. Weiterhin benötigt die Reifung der Chromophore von FP nach erfolgter Expression bis zu zwei Stunden [5]. Um die Reaktionszeit des Biosensors zu erhöhen, könnten daher in Zukunft FP-Varianten mit einer deutlich verkürzten Reifungszeit (z.B. mCherry, TurboRFP) verwendet werden. Allerdings besitzen derartige Alternativen häufig eine geringere Quantenausbeute und Helligkeit [6]. Die Steigerung der Fluoreszenzausbeute könnte zum einen durch die Verwendung von FP-Varianten mit größerer Helligkeit (z.B. tdTomato) erreicht werden [6]. Zum anderen sollte angestrebt werden, dass jede einzelne Hefezelle zum Gesamtfluoreszenzsignal des Biosensors beiträgt, was durch die derzeitige plasmid-kodierte Expression des Reportergens nicht gewährleistet ist.

Wie in Bild 3 deutlich zu erkennen ist, kommt es durch das langsame Sedimentieren der Zellen nach Start der Messung und durch die Ausbildung der typischen Paarungsprojektionen (Birnenform, sog. Shmoo) nach Zugabe des α -Faktors zu einer charakteristischen Änderung des Streuverhaltens der Probe, was zu einem Ansteigen des Signals führt. Diese charakteristische Änderung der Zellmorphologie kann im mikroskopischen Bild bei einigen Hefezellen bereits nach 30 min beobachtet werden. Die separate Detektion dieses Parameters könnte daher als zeitiger Indikator für die abhängige Sekretion des Hefepheromons innerhalb des zellulären Verstärkersystems verwendet werden [7].

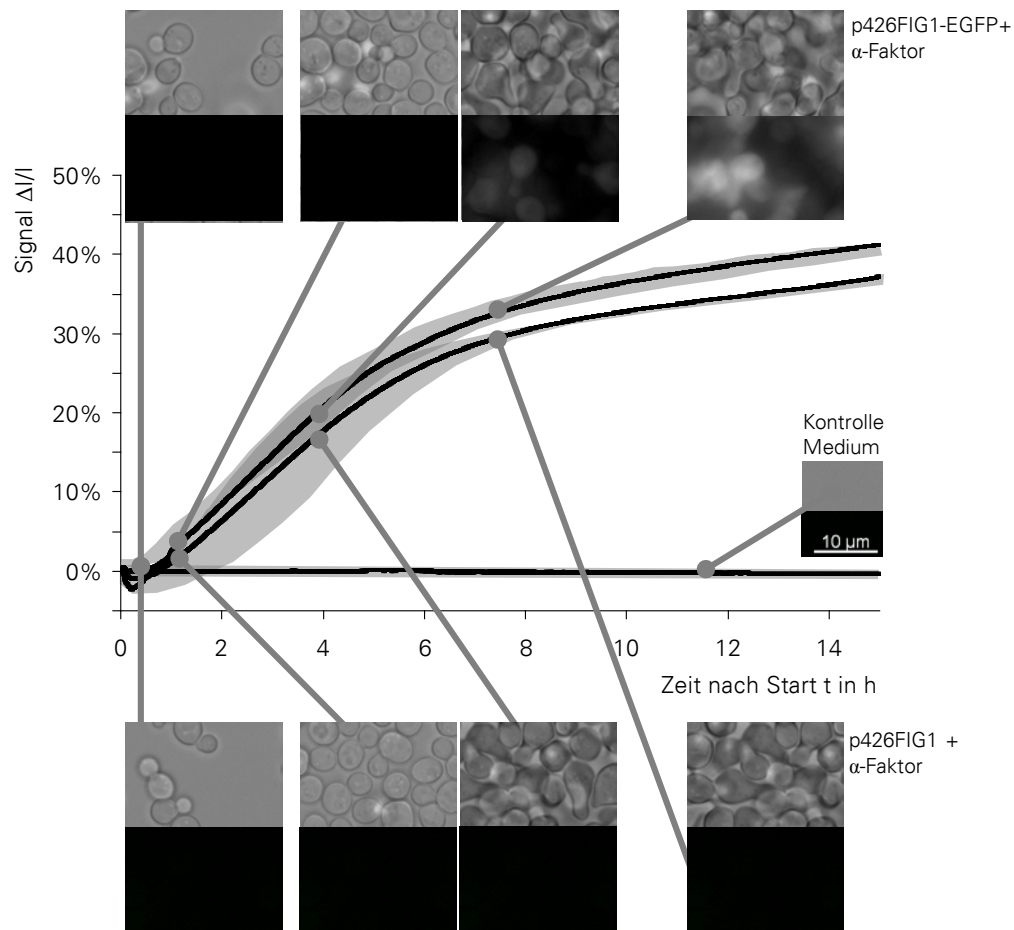


Bild 3 Vergleich zwischen zellfreiem Medium (Kontrolle) und mit p426FIG1 bzw. p426FIG1-EGFP transformierten Hefezellen: zeitliche Änderung des Signals (6-Sigma-Bereich grau unterlegt). Neben dem Fluoreszenzsignal, das nach ca. 7 Stunden sicher erfasst werden kann, gibt es einen deutlichen Einfluss des veränderlichen Streuverhaltens der Probe durch die Änderung der Zellmorphologie.

5 Ausblick

Es wurde ein Aufbau für ein Ganzzeellsensorsystem vorgestellt, mit dem sich eine abhängige Biofluoreszenz erfassen lässt. Der Prinzipnachweis eines kompakten, integrierten Biosensors konnte erfolgreich geführt werden. Allerdings müssen bei der weiteren Entwicklung insbesondere die optischen Auswirkungen der Zellmorphologie-Änderung beachtet werden.

Literatur

- [1] L. Su, W. Jia, C. Hou, Y. Lei: Microbial biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics* (2011); 26: 1788-1799.
- [2] S.M. Borisov, O.S. Wolfbeis: Optical biosensors. *Chemical Reviews* (2008); 108 (2): 423-461.
- [3] A. Groß, G. Rödel, K. Ostermann: Application of the yeast pheromone system for controlled cell-cell communication and signal amplification. *Letters in Applied Microbiology* (2011); 52: 521-526.
- [4] K. Schrick, B. Garvik, L.H. Hartwell: Mating in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of the pheromone signal transduction pathway in the chemotropic response to pheromone. *Genetics* (1997); 147 (1): 19-32.
- [5] B.G. Reid, G.C. Flynn: Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* (1997); 36 (22): 6786-6791.
- [6] N.C. Shaner, R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N.G. Giepmans, A.E. Palmer, R.Y. Tsien: Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* (2004); 22 (12): 1567-1572.
- [7] K. Ostermann, A. Groß, O. Zierau, P. Diel, G. Vollmer, S. Lehmann, F. Rataj, G. Rödel: Method for verification and/or identifying hormonally effective substances. WO Patent 2010072767 (2010).