

## Fluoreszenzquantifizierung bakterieller Endosporen mittels Aptazymen und Molecular Beacons

### IGF 21043 N

Einige bakterielle Erreger können widerstandsfähige Endosporen ausbilden, die sich bei routinemäßigen Reinigungs-/Desinfektionsmaßnahmen unter Einsatz bakterizid wirkender Desinfektionsmittel und -verfahren nicht mit ausreichender Sicherheit beseitigen lassen und bis zu mehreren Monaten auf Oberflächen oder Textilien überdauern können. Ziel war es daher, ein eigenständig, ohne Fachkenntnisse durchführbares Verfahren zur Fluoreszenzquantifizierung von Endosporen hygiene-relevanter Bakterien (*C. difficile*, *B. cereus*) zu realisieren. Ein solches Verfahren würde Reinigungsdienstleister erstmals befähigen, die Sporenbelastung von Oberflächen, Textilien und Prozesswässern im Rahmen innerbetrieblicher Eigenkontrollen eigenständig zu bewerten und somit den Erfolg von ihnen vorgenommener Dekontaminationsmaßnahmen zu überwachen.

Im Fokus der Forschungsarbeiten standen aus DNA bestehende Moleküle, die in Gegenwart von Sporen zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals fähig sind: Zum einen wurden sog. Aptamere identifiziert, die an spezifische Zielmoleküle, z. B. auf der Sporenoberfläche hygiene-relevanter Bakterien, binden. Zum anderen wurden DNAzyme identifiziert, die über eine katalytische Aktivität verfügen. Für die DNAzyme wurde fluorogene Substrate designt: Dabei handelte es sich um spezifische DNA-Stränge, die eine Stammschleifenstruktur ausbilden, in der der an dem einen Strangende gebundene Fluorophor und der an dem anderen Ende gebundene Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander vorliegen. Solche Moleküle werden als Molecular Beacons bezeichnet.

## Fluorescence quantification of bacterial endospores using aptazyme-pairs and molecular beacons

### IGF 21043 N

Some bacterial pathogens can form resistant endospores which cannot be safely removed by routine cleaning/disinfection procedures using bactericidal disinfectants and methods; endospores may persist for up to several months on surfaces or textiles.

The aim of the research project was therefore to implement an independent method for fluorescence quantification of endospores of hygiene relevant bacteria (*C. difficile*, *B. cereus*).

Such a procedure would enable cleaning service providers for the first time to independently assess the spore contamination of surfaces, textiles and process waters as part of in-house controls and thus to monitor the success of their decontamination measures.

The research focused on molecules consisting of DNA that are capable of generating a fluorescence signal in the presence of spores: On the one hand, aptamers were identified that bind to specific target molecules, e. g. on the spore surface of hygiene-relevant bacteria. On the other hand, DNA enzymes have been identified that have catalytic activity.

Fluorogenic substrates were designed for the DNA enzymes: These were specific DNA strands that form a stem loop structure in which the fluorophore bound at one strand end and the quencher bound at the other strand end are in close proximity to each other. Such molecules are called molecular beacons.

Fortsetzung auf Seite 2

To be continued on page 2

## Fortsetzung:

### IGF 21043 N

Durch Verknüpfung eines Aptamers mit einem DNAzym wurde ein DNA-Strang erhalten, der sowohl spezifisch an sein Zielmolekül band als auch eine katalytische Aktivität aufwies, ein sog. Aptazym. Durch mikroskopische Analyse von Endosporen des Bakteriums *B. cereus*, die zuvor mit Aptazym und anschließend mit Substrat inkubiert wurden, ließ sich nachweisen, dass eine Substrat spaltung an der Sporenoberfläche erfolgte, was voraussetzt, dass die Sporenoberfläche mit Aptazymen belegt war.

Um nachzuweisen, dass die mittels Aptazymen detektierten Sporen auskeimungsfähig sind, wurde Dipicolinsäure als Indikatormolekül ausgewählt, da diese im Sporenkern aller sporenbildenden Bakterien mit einem hohen Gehalt vorliegt; zudem wird Dipicolinsäure zu Beginn des Auskeimungsprozesses freigesetzt. Da keine Aptamere gegen Dipicolinsäure bekannt sind, wurde ein spezielles Verfahren zu deren Selektion durchgeführt; dabei konnten verschiedene DNA-Stränge identifiziert werden, die als potentielle Aptamere in Frage kommen.

Der Forschungsbericht ist auf Anfrage beim  
wfk - Cleaning Technology Institute erhältlich.

## Continued:

### IGF 21043 N

By linking an aptamer with a DNAzyme, a strand of DNA was obtained that both specifically bound to its target molecule and exhibited catalytic activity, a so-called aptazyme.

Microscopic analysis of *B. cereus* endospores previously incubated with the aptazyme and subsequently with substrate showed that substrate cleavage occurred at the spore surface, which presupposes that the spore surface was covered with aptazymes.

In order to prove that spores detected by aptazymes are germinating, dipicolic acid was selected as an indicator molecule, since it is present in the spore nucleus of all spore-forming bacteria with a high content; moreover, dipicolic acid is released at the beginning of the germination process. Since no aptamers against dipicolic acid are known, a special procedure was carried out to select them; different DNA strands could be identified as potential aptamers.

The research report is available on request from the  
wfk - Cleaning Technology Institute

Das IGF-Projekt 21043 N der Forschungsvereinigung Europäische Forschungsgemeinschaft Reinigungs- und Hygienetechnologie e.V., Campus Fichtenhain II, 47807 Krefeld, wurde über die AiF 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:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

The IGF project 21043 N of the research association Europäische Forschungsgemeinschaft Reinigungs- und Hygienetechnologie e.V., Campus Fichtenhain II, 47807 Krefeld, was supported via the AiF within the funding program „Industrielle Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)“ by the Federal Ministry of Economic Affairs and Climate Action due to a decision of the German Parliament.