

Selektiver, hoch empfindlicher und schneller Nachweis genomischer DNA mit gesteuerten Materialien am Beispiel von *Mycoplasma***

Estela Climent, Laura Mondragón, Ramón Martínez-Máñez,* Félix Sancenón,
M. Dolores Marcos, Jose Ramón Murguía, Pedro Amorós, Knut Rurack* und Enrique Pérez-Payá†

In memoriam Enrique Pérez-Payá

In jüngster Zeit haben Fortschritte in der biomolekularen Chemie und Nanotechnologie zum Design von biologisch inspirierten Systemen mit innovativen, der Biologie entlehnten Funktionen geführt. Eine wichtige Fragestellung in diesem Gebiet ist die Entwicklung von neuen „intelligenten“ Systemen, die auf der Kombination von nanoskopischen Strukturen mit einer Vielfalt an Biomolekülen beruhen, bisher unbekannte Funktionalitäten aufweisen und in Bereichen wie Bio-Engineering, Biosensorik, Bio-Nanotechnologie und Wirkstofffreisetzung neue Wege eröffnen.^[1] In der Wirkstofffreisetzung hat die Entwicklung von Stimuli gesteuerten nanoskopischen Hybridmaterialien, die Biomoleküle als Verschlüsse tragen und eingeschlossene Gastmoleküle gezielt durch Anwendung eines äußeren Stimulus freisetzen können, große Aufmerksamkeit erlangt.^[2–6] Diese Systeme bestehen aus einem Träger, der gewöhnlich das Reservoir darstellt, in dem bestimmte Substanzen eingelagert sind, und Molekülen oder molekular an diese Container angebundenen Objekten, die eine gesteuerte Freisetzung der eingeschlossenen Moleküle ermöglichen. Beide Komponenten können gezielt ausgewählt werden, sodass eine enorme Bandbreite an Kontrollmechanismen implementiert werden

kann. Gekapselte Materialien wurden bislang meist für Anwendungen in der Wirkstofffreisetzung eingesetzt.^[7] Beispiele aus dem Bereich der Sensorik sind wesentlich seltener.^[8] Für die Sensorik sind die Trägersysteme in der Regel mit einem Indikator beladen, und der Verschlussmechanismus ist dergestalt, dass nur der Zielanalyt in der Lage ist, den Verschluss zu öffnen und die Ladung freizusetzen.

Aus dem Bereich der Biomoleküle sind DNA-Sequenzen besonders attraktiv für das Design von gesteuerten Nanosensoren.^[4,5] Aufbauend auf solch einem Ansatz sind etwa chromo- oder fluorogene Nanosensoren denkbar, bei denen der Träger mit einem Nukleinsäurestrang verschlossen ist und eine selektive Öffnung nur durch den komplementären Oligonukleotidstrang bewirkt werden kann, die dann zu einer Freisetzung der eingeschlossenen Farbstofffracht führt. Wir sind davon überzeugt, dass solch ein einfaches System zur Entwicklung sehr spezifischer und empfindlicher Sensorelemente für die einfache und schnelle Identifizierung genomischer DNA-Sequenzen führen kann.

Als ersten Beweis für unsere Vermutung haben wir einen empfindlichen Nanosensor für den direkten und schnellen Nachweis von *Mycoplasma* entwickelt. *Mycoplasma* bezieht

[*] Dr. E. Climent,^[‡] Dr. L. Mondragón,^[‡] Prof. R. Martínez-Máñez, Dr. F. Sancenón, Dr. M. D. Marcos
Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM)
Unidad mixta Universitat Politècnica de València
Universitat de València, Departamento de Química
Universidad Politécnica de Valencia
Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (Spanien)
E-Mail: rmaez@qim.upv.es

Prof. J. R. Murguía
Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Camino de Vera s/n, 46071 Valencia (Spanien)

Dr. E. Climent,^[‡] Dr. L. Mondragón,^[‡] Prof. R. Martínez-Máñez, Dr. F. Sancenón, Dr. M. D. Marcos, Prof. J. R. Murguía
CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) (Spanien)

Prof. P. Amorós
Institut de Ciència dels Materials (ICMUV)
Universitat de València
P.O. Box 2085, 46071 Valencia (Spanien)

Dr. K. Rurack
Fachbereich 1.9, Sensormaterialien
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
Richard-Willstätter-Straße 11, 12489 Berlin (Deutschland)

E-Mail: knut.rurack@bam.de

Prof. E. Pérez-Payá
Laboratorio Péptidos y Proteínas
Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)
C/Eduardo Primo Yúfera 3, 46012 Valencia (Spanien)
und
Instituto de Biomedicina de Valencia-CSIC (IBV-CSIC)
Jaime Roig 11, 46010 Valencia (Spanien)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[‡] Verstorben.

[**] Diese Arbeit wurde durch die Spanische Regierung (MAT2009-14564-C04-01 und SAF2010 15512) und die Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/016 und 2010/005) unterstützt. E.C. dankt dem Spanischen Bildungsministerium für ein Stipendium.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zu allgemeinen Arbeitstechniken, Reagentien, Vorstufensynthese, Synthese und Optimierung von **S1-O1** sowie zur vollständigen Charakterisierung der Verbindungen und Materialien) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201302954> zu finden.

sich hier auf das Genom prokaryotischer Mikroorganismen, die als Parasiten auf Tieren und Pflanzen vorkommen. Des Weiteren sind diese Mikroorganismen häufiger als Kontamination in Zellkulturen von Forschungslaboratorien anzutreffen. So hat z.B. das Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in einer Studie abgeschätzt, dass *Mycoplasma*-Kontaminationen in mindestens 20–25 % der dauerhaft kultivierten Zellen vorkommen, was zu Fehlern bei und Fehlinterpretationen von Forschungsergebnissen führen kann.^[9–11] In diesem Zusammenhang sind viele Forschungslaboratorien besonders auf Strategien zur Früherkennung oder Prävention angewiesen. Die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) und die DSMZ führen daher eine Reihe von Verfahren für den Nachweis dieser Kontaminationen an, von denen die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) die am weitesten verbreitete ist.^[9,10]

Abbildung 1 zeigt das von uns vorgeschlagene Modell für den *Mycoplasma*-Nachweis. Mesoporöse Siliciumdioxid-Nanopartikel (MSN) vom Typ MCM-41 mit ca. 100 nm Durchmesser wurden aufgrund ihrer vorteilhaften Struktureigenschaften wie großer spezifischer Oberfläche (ca. 1000 m² g^{−1}), Porenvolumen (> 1 cm³ g^{−1}), stabiler Mesostruktur, einstell-

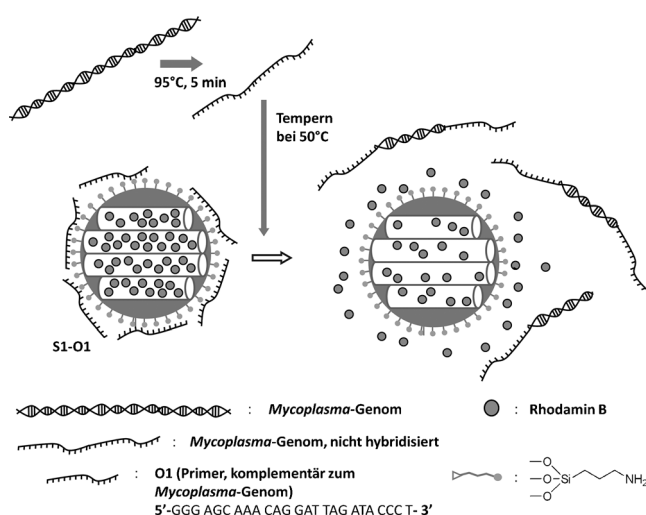


Abbildung 1. Illustration des mit APTS funktionalisierten und dem Einzelstrang des Oligonukleotids O1 verschlossenen, gesteuerten Materials S1-O1. Die Freisetzung des eingeschlossenen Rhodamin B wird selektiv durch die Anwesenheit des komplementären, nichthybridisierten 16S-ribosomalen RNA-Strangs bewirkt.

barem Porendurchmesser (2–10 nm) und Morphologie als anorganischer Träger ausgewählt. Für das Material S1 wurde der MCM-41-Träger zuerst mit einem geeigneten Farbstoff (Rhodamin B) beladen und dann die äußere Oberfläche mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS) funktionalisiert. Aminopropylgruppen sind in pH-neutralen wässrigen Lösungen partiell positiv geladen und können so mit negativ geladenen Oligonukleotiden wechselwirken, was ein Verschließen der Mesoporen zur Folge hat. Die Öffnung der Poren sollte jetzt nur in Anwesenheit des komplementären Strangs erfolgen.

Für das verschließende Oligonukleotid wurde nun eine Sequenz ausgewählt, die im *Mycoplasma*-Genom konserviert ist und zu einem Fragment der 16S-ribosomalen RNA-Untereinheit korrespondiert (O1, 5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3').^[12,13]

Die mesoporösen MCM-41-Nanopartikel wurden nach bekannten Vorschriften hergestellt.^[14] Das aminofunktionale Material S1 wurde durch 24-stündiges Rühren einer Suspension von 400 mg calciniertem MCM-41 und 0.32 mmol Rhodamin B in Acetonitril bei Raumtemperatur erhalten, um eine maximale Beladung der Poren zu garantieren. Danach wurde ein Überschuss APTS zur Suspension gegeben. Zuletzt wurde der rosafarbene Feststoff (S1) durch Filtration gesammelt, mit Acetonitril gewaschen und getrocknet (siehe die Hintergrundinformationen).

S1-O1 wurde durch Suspendieren von S1 in einem Gemisch aus H₂O/DMEM-Puffer (4:6 v/v; pH 7.2), das Oligonukleotid O1 enthält, hergestellt (siehe die Hintergrundinformationen). Das Zielmaterial S1-O1 wurde nach Zentrifugieren und Waschen mit DMEM, um Reste von nichteingelagertem Rhodamin B und nichtgebundenem Oligonukleotid O1 vom verschlossenen Material S1-O1 zu entfernen, isoliert.

Das MCM-41-Gerüst und der mesoporöse Feststoff S1 wurden mit Standardtechniken charakterisiert. Die strukturellen Hauptmerkmale wie Partikeldurchmesser, spezifische Oberfläche nach BET, Porenvolumen und -größe sind in Tabelle 1 zusammengestellt (siehe auch die Hintergrundinformationen). Darüber hinaus wurden die Gehalte an APTS und Rhodamin B in S1 und S1-O1 durch thermogravimetrische

Tabelle 1: Aus den TEM-, PXRD- und N₂-Sorptionsanalysen erhaltene strukturelle Hauptmerkmale von und MCM-41 und S1.

Probe	Partikel- durchmesser [nm]	S _{BET} [m ² g ^{−1}]	Poren- volumen ^[a] [cm ³ g ^{−1}]	Poren- größe ^[a] [nm]	Poren- größe ^[b] [nm]
MCM-41	80 ± 6	937	0.75	2.75	3.66
S1	80 ± 6	80	0.26	–	–

[a] B)H-Modell. [b] NLDFT-Modell.

und Elementaranalyse bestimmt (0.86 mmol g^{−1} APTS und 0.31 sowie 0.073 mmol g^{−1} Rhodamin B).

Das Ansprechverhalten von S1-O1 auf *Mycoplasma*-Genom wurde in Gegenwart von genomischer *Mycoplasma fermentans*-DNA untersucht. *Mycoplasma* wird mit der Pathogenese von rheumatischer Arthritis beim Menschen in Verbindung gebracht.^[14] Hierfür wurden 0.5 mg S1-O1 in 2.0 mL Hybridisierungspuffer suspendiert und in zwei Portionen aliquotiert. Unterdessen wurde eine DMEM-Lösung mit genomischer Doppelstrang(ds)-DNA eines *Mycoplasma fermentans*-Standards (mit 2 × 10³ DNA-Kopien μL^{−1}) für 5 min auf 95°C erwärmt, um die dsDNA zu dehybridisieren. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde diese Lösung zu einem Aliquot gegeben und eine 50°C warme DMEM-Lösung (ohne DNA) zum anderen Aliquot. Beide Suspensionen wurden bei 37°C konditioniert. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden kleine Fraktionen entnommen und zentrifugiert, um den Feststoff abzutrennen. Anschließend wurde

der in die Lösung freigesetzte Rhodamin-Farbstoff durch Fluoreszenzmessung bei 585 nm (λ_{exc} 555 nm) gemessen. Die Freisetzungsprofile von Rhodamin B in An- und Abwesenheit von *Mycoplasma-fermentans*-DNA sind in Abbildung 2 dargestellt. In Abwesenheit der Ziel-DNA ist das Material **S1-O1** fest verschlossen und zeigt nur eine vernachlässigbare

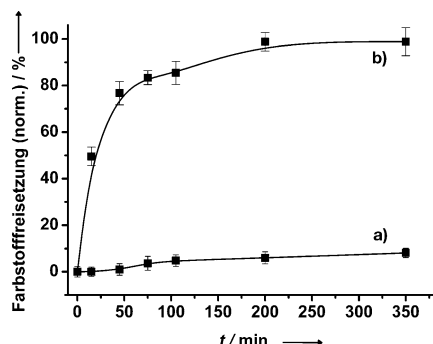


Abbildung 2. Freisetzung von Rhodamin B aus Material **S1-O1** in Abwesenheit (a) und Anwesenheit (b) genomischer DNA eines *Mycoplasma-fermentans*-Standards (2×10^3 Kopien μL^{-1}) in DMEM-Puffer (pH 7.2).

Freisetzung von Rhodamin B (Kurve a). Ist dagegen *Mycoplasma*-DNA in der Probe vorhanden, wird die Öffnung der Poren induziert und der Farbstoff freigesetzt. Nach 90 min sind ca. 80% Rhodamin B freigesetzt worden (entsprechend 30% des anfänglichen Farbstoffgehalts in **S1-O1**).

Im nächsten Experiment wurde die Farbstofffreisetzung aus **S1-O1** in Abhängigkeit der Zahl an Kopien genomischer *Mycoplasma-fermentans*-DNA untersucht. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, korreliert die durch die Konzentration an genomischer DNA bewirkte Verdrängung von **O1** und damit einhergehende Porenöffnung mit der Farbstofffreisetzung.

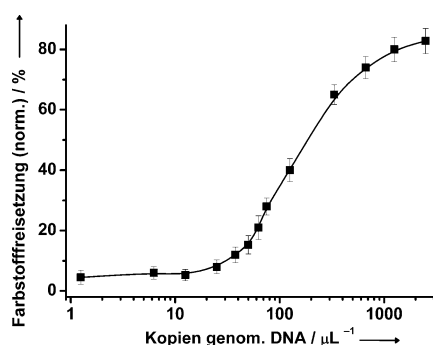


Abbildung 3. Freisetzung von Rhodamin B aus Material **S1-O1** in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an Kopien genomischer *Mycoplasma-fermentans*-DNA in DMEM-Puffer (pH 7.2).

Maximale Freisetzung wurde für eine Konzentration von ca. 900 Kopien *Mycoplasma*-DNA μL^{-1} gemessen. Die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) dieser Methode wurde zu einer Konzentration von nur 50 DNA-Kopien μL^{-1} (3 σ) bestimmt. Abbildung 4 zeigt ein Foto der Rhodamin-B-

Fluoreszenz (Anregung bei 254 nm), die durch Freisetzung unterschiedlicher Mengen an Kopien genomischer *Mycoplasma-fermentans*-DNA (0, 100 und 266 Kopien μL^{-1}) aus

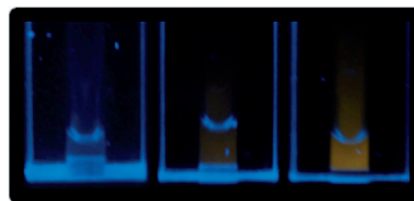


Abbildung 4. Emission (Anregung bei 254 nm) des aus **S1-O1** in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen an genomischer *Mycoplasma-fermentans*-DNA freigesetzten Rhodamin B in DMEM-Puffer (pH 7.2). Von links nach rechts: 0, 100 und 266 Kopien genomischer DNA μL^{-1} . Die Proben wurden mit einer einfachen UV-Lampe bestrahlt.

dem Material **S1-O1** in DMEM-Puffer (pH 7.2) erhalten wurde. Eine sukzessive Zunahme der DNA-Kopienanzahl bewirkt dabei eine verstärkte Rhodamin-B-Freisetzung und damit eine stärkere Fluoreszenz. Deutliche Fluoreszenzänderungen sind zwischen der Kontrollprobe und den Proben mit 100 und 266 DNA-Kopien μL^{-1} sichtbar. So entspricht etwa der Messpunkt nahe des Wendepunkts der Kurve in Abbildung 3 einer Freisetzung von ca. 400 Farbstoffmolekülen pro verdrängtem Oligonukleotid, was einer bemerkenswerten Signalverstärkung entspricht.

Um die Selektivität der Methode zu verifizieren, wurden entsprechende Experimente mit Material **S1-O1** in Gegenwart genomischer DNA anderer Pathogene wie *Legionella pneumophila* und *Candida albicans* in Mengen von 250 Kopien μL^{-1} durchgeführt. Zusätzlich wurde die Störanfälligkeit des Nachweises durch andere Organismen über die Analyse von Proben mit *Mycoplasma-fermentans*-, *Legionella pneumophila*- und *Candida-albicans*-DNA, jeweils in Konzentrationen von 250 Kopien μL^{-1} , sowie eines Gemisches aus diesen DNA-Sequenzen, erfasst (Abbildung 5). Die Ergebnisse zeigen, dass das Material **S1-O1** hoch selektiv auf die Anwesenheit von genomischer *Mycoplasma-fermentans*-DNA anspricht.

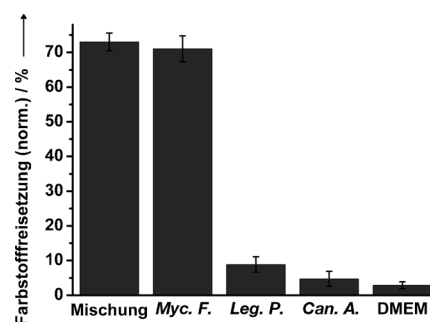


Abbildung 5. Freisetzung von Rhodamin B aus **S1-O1** in Gegenwart von (von rechts nach links): DMEM, genomischer DNA (250 Kopien μL^{-1}) von *Candida albicans* (Can. A.), *Legionella pneumophila* (Leg. P.) und *Mycoplasma fermentans* (Myc. F.) sowie einer Mischung der DNA aller drei pathogenen Spezies.

Anschließend widmeten wir uns dem Nachweis von *Mycoplasma* in Realproben am Beispiel *Mycoplasma*-kontaminierter Zellkulturen. Insbesondere untersuchten wir den Überstand von zwei Zellkulturmedien, humanen Gebärmutterhalskrebs- und Lungenkrebszellen (HeLa bzw. A549), bei denen eine Kontamination mit *Mycoplasma* bekannt war. Im Vergleich dazu wurde der Überstand eines Kulturmediums von nichtkontaminierten HeLa-Zellen untersucht. In Analogie zu der oben beschriebenen Prozedur bestimmten wir die Freisetzungskinetik von Rhodamin B aus Material **S1-O1** für die *Mycoplasma*-kontaminierten und nichtkontaminierten Zellmedien (Abbildung 6). Trotz der Anwesenheit von diversen Proteinen und Metaboliten in den Zellkulturmedien, die das sensorische Verhalten von **S1-O1** hätten beeinträch-

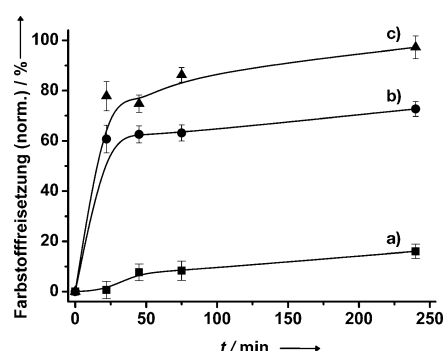


Abbildung 6. Freisetzung von Rhodamin B aus a) dem Material **S1-O1** in DMEM-Kulturmedium nichtkontaminierter HeLa-Zellen sowie in Kulturmedien von b) HeLa-Zellen und c) A549-Zellen mit *Mycoplasma*-Kontamination (pH 7.2).

tigen können, zeigen die Ergebnisse, dass die mit *Mycoplasma* kontaminierten Proben eine Freisetzung des eingelagerten Farbstoffs bewirkten, während nur eine ganz geringe Freisetzung für die nichtkontaminierten Kontrolltests gemessen wurde. Zudem sollte die unterschiedliche Menge an freigesetztem Farbstoff aus den kontaminierten HeLa- und A549-Zellproben von den unterschiedlichen Gehalten an *Mycoplasma*-DNA in den Proben herrühren.

Als nächstes interessierte es uns, in wie weit ein Assay basierend auf **S1-O1** eine potenzielle Alternative zu den derzeit etablierten Verfahren zum *Mycoplasma*-Nachweis mit PCR darstellt. Standard-PCR-Techniken wurden als Referenzmethoden für die Quantifizierung der Kontamination der bereits genannten Proben von A549- und HeLa-Kulturmedien mit *Mycoplasma* herangezogen. Als Primer für den PCR-Assay wurden Oligonukleotide ausgewählt, die spezifischen Zielsequenzen der 16S-ribosomalen *Mycoplasma*-RNA entsprechen und diese geeignet verstärken sollten. Diese Primer, **O1** (5' GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T 3') und **O2** (5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC 3'), ermöglichen die Vervielfachung der 280-Basenpaar(bp)-Bande.^[15] Geeignete PCR-Komponenten und Zyklenparameter wurden durch diverse Testläufe in Anlehnung an Arbeiten von Chopra et al. ermittelt.^[12] Die Ergebnisse der PCR-Analyse kontaminierter Proben von A549- und HeLa-Kulturmedien sowie von *Mycoplasma-fermentans*-

Standardlösungen bei unterschiedlicher Verdünnung sind in Abbildung 7 gezeigt. Die PCR-Produkte wurden durch einen Vergleich der Intensität der 280 bp-Bande bei verschiedenen Verdünnungen der kontaminierten Proben mit dem *Myco*-

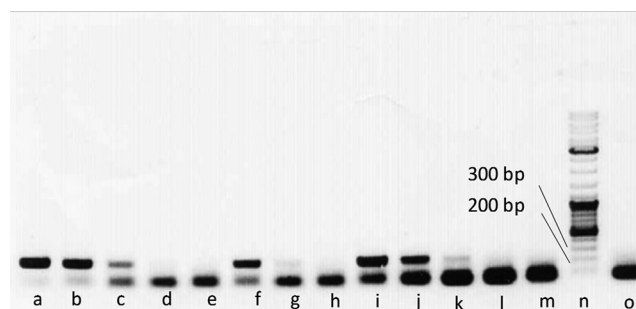


Abbildung 7. Agarose-Gelelektrophorese von Produkten unterschiedlicher Proben (verstärkt mit PCR), die die An- oder Abwesenheit der, mit dem 16S rRNA-Fragment des *Mycoplasma*-Genoms übereinstimmenden 280 bp-Bande zeigen. Bahnen a–e sind serielle Verdünnungen eines *Mycoplasma-fermentans*-Standards, die 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 und 1 Genomkopie μL^{-1} enthalten. Bahnen f–h beziehen sich auf ein A549-Kulturmedium in Anteilen von 100, 10 und 5 %. Bahnen i–l beziehen sich auf ein HeLa-Kulturmedium in Anteilen von 100, 10, 1 und 0.5 %. Bahn m entspricht Wasser (als Negativkontrolle), Bahn n der DNA-Leiter und Bahn o einem DMEM-Medium.

plasma-fermentans-Standard quantifiziert (mit dem Programm Multi Gauge V3.2). Nach dieser Methode wurden *Mycoplasma*-Gehalte von 40000 und 3600 Genomkopien μL^{-1} in den HeLa- und A549-Kulturmedien berechnet. Des Weiteren ergaben diese Untersuchungen eine LOD von ca. 65 Kopien genomischer *Mycoplasma*-DNA μL^{-1} (3σ) für die PCR-Analyse.

Nach Etablierung der Referenzmethode wurden die Proben ebenfalls einem Freisetzungssassay auf Basis des neu entwickelten Materials **S1-O1** unterzogen. Die kontaminierten A549- und HeLa-Proben wurden dabei sukzessive mit frischem DMEM-Puffer verdünnt, um die Nachweisgrenze für **S1-O1** zu bestimmen. Wenn man die aus der PCR-Analyse enthaltene Zahl an Kopien zugrundelegt, ergibt sich eine LOD von 70 Kopien an genomischer DNA μL^{-1} (3σ) für den gesteuerten Freisetzungssassay, was eine vergleichbare Empfindlichkeit zur LOD der PCR-Analyse darstellt (siehe die Hintergrundinformationen). Diese Ergebnisse stellen eindrucksvoll die bemerkenswerte Leistungsfähigkeit des gesteuerten Materials bei der fluorometrischen Bestimmung von *Mycoplasma*-Kontaminationen in Zellkulturmedien unter Beweis. Des Weiteren haben vorläufige Studien ergeben, dass das **S1-O1**-Material über mehrere Wochen ohne Verlust seiner Leistungsfähigkeit gelagert werden kann, was ein wichtiges Kriterium für einfache In-situ-Anwendungen darstellt.

Zusammenfassend haben wir mit Rhodamin B beladene und mit DNA verschlossene, mesoporöse Siliciumdioxid-Nanopartikel hergestellt und für den Nachweis von *Mycoplasma* in real kontaminierten Zellkulturmedien bis zu einer Nachweisgrenze von 70 Kopien genomischer DNA μL^{-1} ohne Zuhilfenahme von PCR-Techniken eingesetzt. Dafür wurde

eine im *Mycoplasma*-Genom hoch konservierte Oligonukleotidsequenz der 16S-ribosomalen RNA-Untereinheit eingesetzt. In Anwesenheit genomischer *Mycoplasma-fermentans*-DNA findet dabei eine Öffnung der Poren des Materials statt, die eine Freisetzung des eingelagerten Farbstoffs bewirkt. Die neue Methode erreicht vergleichbare Selektivitäten wie die PCR, ist aber deutlich einfacher zu handhaben, schneller (die gesamte Assaydauer beträgt ca. 60 min gegenüber ca. 250 min bei der PCR-basierten Methode) und besitzt den immanenten Vorteil, dass das Signal und nicht der Analyt vervielfältigt wird, was Transkriptionsfehler beim Kopieren der DNA vermeidet. In Anbetracht der vergleichsweise teuren Verstärkungs- und Detektionsausrüstung, die für die PCR gebraucht wird, ist die Methode kostengünstiger, denn man benötigt nur eine einfache UV-Lampe für die Detektion der Rhodamin-B-Fluoreszenz (Abbildung 4). Die Tatsache, dass das für den Freisetzungssassay notwendige Probenvolumen noch deutlich größer als bei der PCR ist (120 μ L gegenüber 1 μ L), stellt keine Limitierung für Anwendungen dar, bei denen ausreichend Probenmaterial vorhanden ist. Als Fazit lässt sich feststellen, dass die Kombination von gesteuerter Indikatorfreisetzung mit hoch spezifischer biochemischer Erkennung eine innovative Strategie zum Nachweis von DNA-Sequenzen ist, die mit klassischen, auf der PCR-Vervielfältigung beruhenden Methoden in wichtigen Bereichen wie der Vor-Ort-Diagnose oder dem Nachweis von spezifischen biologischen Kontaminationen mit Pathogenen konkurrieren kann. Solche vergleichsweise einfachen und günstigen, dabei aber hoch empfindlichen und selektiven Assays sind besonders vielversprechend für den Einsatz in Entwicklungsländern.

Eingegangen am 9. April 2013

Online veröffentlicht am 10. Juli 2013

Stichwörter: DNA · Gesteuerte Materialien · Mesoporöse Träger · *Mycoplasma* · Sonden

- [1] a) R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2005**, *310*, 1661–1665; b) M. Nishikawa, S. Rattanakit, Y. Takakura, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 626–632; c) R. Chhabra, J. Sharma, Y. Liu, S. Rinker, H. Yan, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 617–625.
- [2] a) A. Schlossbauer, J. Kecht, T. Bein, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3138–3141; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3092–3095; b) C. Park, H. Kim, S. Kim, C. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16614–16615; c) A. Bernardos, L. Mondragón, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, J. M. Barat, E. Pérez-Payá, C. Guillem, P. Amorós, *ACS Nano* **2010**, *4*, 6353–6368; d) C. Wang, Z. Li, D. Cao, Y.-L. Zhao, J. W. Gaines, O. A. Bozdemir, M. W. Ambrogio, M. Frascioni, Y. Y. Botros, J. I. Zink, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5556–5561; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5460–5465; e) C. Coll, A. Bernardos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 339–349.
- [3] a) Z. Luo, K. Cai, Y. -Hu, L. Zhao, P. Liu, L. Duan, W. Yang, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 666–669; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 640–643; b) F. Porta, G. E. M. Lamers, J. I. Zink, A. Kros, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 9982–9985; c) A. Papat, B. P. Ross, J. Liu, S. Jambhrunkar, F. Kleitz, S. Z. Qiao, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12654–12657; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12486–12489.
- [4] a) E. Climent, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. Soto, A. Maquieira, P. Amorós, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7439–7441; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7281–7283; b) A. Schlossbauer, S. Warncke, P. M. E. Gramlich, J. Kecht, A. Manetto, T. Carell, T. Bein, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4842–4845; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4734–4737; c) C. L. Zhu, C. H. Lu, X. Y. Song, H. H. Yang, X. R. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1278–1281.
- [5] a) V. C. Özalp, T. Schäfer, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9893–9896; b) E. Ruiz-Hernández, A. Baeza, M. Vallet-Regí, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1259–1266; c) Y. Zhang, Q. Yuan, T. Chen, X. Zhang, Y. Chen, W. Tan, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1956–1962; d) D. He, X. He, K. Wang, J. Cao, Y. Zhao, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 4704–4710; e) Z. Chen, Z. Li, Y. Lin, M. Yin, J. Ren, X. Qu, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1778–1783.
- [6] a) A. Baeza, E. Guisasaola, E. Ruiz-Hernandez, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 517–524; b) D. Tarn, M. Xue, J. I. Zink, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 2044–2049.
- [7] a) A. S. Hoffman, *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 153–163; b) J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowling, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Small* **2010**, *6*, 1952–1967.
- [8] a) E. Climent, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, K. Rurack, P. Amorós, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8671–8674; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8519–8522; b) Y. L. Choi, J. Jaworsky, M. L. Seo, S. J. Lee, J. H. Jung, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7882–7885; c) Y. Cui, H. Dong, X. Cai, D. Wang, Y. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 3177–3183; d) X. He, Y. Zhao, D. He, K. Wang, F. Xu, J. Tang, *Langmuir* **2012**, *28*, 12909–12915; e) E. Climent, D. Gröninger, M. Hecht, M. A. Walter, R. Martínez-Mañez, M. G. Weller, F. Sancenón, P. Amorós, K. Rurack, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4117–4122.
- [9] H. G. Drexler, C. C. Uphoff, *Cytotechnology* **2002**, *39*, 75–90.
- [10] D. V. Volokhov, L. J. Graham, K. A. Brorson, V. E. Chizhikov, *Mol. Cell. Probes* **2011**, *25*, 69–142.
- [11] R. S. Barile, *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 143–151.
- [12] P. C. Chopra, A. Vojdani, C. Tagle, R. Andrin, L. Magtoto, *Mol. Cell. Probes* **1998**, *12*, 301–308.
- [13] F. J. M. Van Kuppeveld, T. M. Vanderlogt, F. Angulo, J. Vanzoest, W. G. V. Quint, G. M. Niesters, M. D. Galama, W. J. G. Melchers, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 2606–2615.
- [14] a) T. Sohaeverbeke, C. B. Gilroy, C. Bebear, J. Dehais, D. Taylor-Robinson, *Lancet* **1996**, *347*, 1418–1418; b) S. Horowitz, B. Evinson, A. Borer, J. Horowitz, *J. Rheumatol.* **2000**, *27*, 2747–2753.
- [15] F. J. M. Van Kuppeveld, K. E. Johansson, J. M. D. Galama, J. Kissing, G. Bolske, J. T. M. Van Der Logt, W. J. G. Melchers, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 149–152.