

**Entwicklung einer funktionellen Einheit bestehend aus
Probenvorbereitung und Realtime PCR für die Diagnostik
flüssiger Proben an ausgesuchten Modellorganismen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

genehmigte

Dissertation

von

M. Sc. Alexandra Scholz

geboren am 04. Oktober 1986

in Weimar (Thüringen)

Hannover 2014

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Detlef W. Bahnemann

Tag der Promotion: 31.01.2014

Danksagung

Im Rahmen meiner Promotion habe ich, während dieser drei Jahre, sehr viel neues Wissen erlangt, tolle Ergebnisse generiert und einen Einblick in verschiedene Arbeitsbereiche der Industrie erhalten, da beispielsweise eine enge Zusammenarbeit zwischen F&E und dem Produktmanagement unabdingbar ist. Aus diesem Grund möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir diese Erfahrungen und diese spannende Zeit ermöglicht haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei den Personen bedanken, die die direkte Betreuung meiner Promotion übernommen haben und immer ausführlich und mit viel Geduld auf all meine Fragen eingegangen sind und mir stets gute Denkanstöße gegeben haben: Dr. Karl Pflanz sowie Dr. Elke Rüngeling der Sartorius Stedim Biotech GmbH.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper sei für die Übernahme des Referats gedankt sowie für das große Interesse und die innovativen Ideen, die sowohl er selbst als auch Herr Dr. rer. nat. Frank Stahl während Diskussionsrunden dieser Arbeit entgegengebracht haben. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Detlef W. Bahnemann für die Übernahme des Koreferats.

Natürlich gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern der Sartorius Stedim Biotech GmbH, die mich handwerklich, technisch, informativ oder menschlich während meiner Doktorandenzeit unterstützt haben. Hervorzuheben sind hierbei Doris Hickmann und Anja Ulrich, die mir bei Anliegen jeglicher Art ausnahmslos immer helfen oder einen Ansprechpartner nennen konnten.

Außerdem möchte ich mich bei dem Minerva Biolabs Team und vor allem bei Dr. Dirk Vollenbroich und Matthias Hornschuh bedanken, für sehr viele produktive Vorschläge sowie das zur Verfügung stellen von zahlreichen Diagnostik Kits für meine Laborversuche.

Abschließend ein dickes Dankeschön an meinen Lebenspartner, Christoph Müller, meine Familie und meine Freunde, die stets mit tollen Ausflügen und Freizeitaktivitäten dafür gesorgt haben, dass meine Live-Work-Balance perfekt ausgeglichen war.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alexandra Scholz
Anschrift: Groner Straße 5
37073 Göttingen
Telefon: +491636374067
E-Mail: scholz_alexandra@freenet.de
Geburtsdatum: 04.10.1986
Geburtsort: Weimar
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

1997 – 2005 Friedrich-Schiller-Gymnasium Weimar
(Leistungskurse: Mathematik und Biologie; Note: 1,4)
10/2005 - 06/2008 Bachelor of Science in Biotechnologie; Technische Universität
Carolo-Wilhelmina, Braunschweig; Note: 2,3
Thema Bachelorarbeit: „Einfluss des Leistungseintrags durch
Rührergeschwindigkeiten und Begasungsrate auf Pelletmor-
phologie und Produktbildung von *Aspergillus niger*“
03/2009 - 10/2010 Master of Science in Biotechnologie; Technische Universität
Carolo-Wilhelmina, Braunschweig; Note: 1,5
Thema Masterarbeit: „Optimierung von *Mycoplasma* Nach-
weisen mit quantitativer Realtime PCR“ (in Kooperation mit
Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, und Minerva Biolabs,
Berlin)
seit 12/2010 Promotion; Leibniz Universität Hannover (Doktorarbeit in Ko-
operation mit Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)
Voraussichtlicher Abschluss (Dr. rer. nat.): Dez. 2013/Jan. 2014
Thema Doktorarbeit: „Entwicklung einer funktionellen Einheit
bestehend aus Probenvorbereitung und Realtime PCR für die
Diagnostik flüssiger Proben an ausgesuchten Modellorganismen“

Berufliche Erfahrung

10/2007 - 08/2008 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Bioverfahrens-
technik der TU Braunschweig; Aufgabenbereich: *Aspergillus*
niger Kultivierungen in einem 28 L-Bioreaktor

Schulungen und Seminare

- Einführung in die statistische Datenanalyse mit SPSS
- Grundlagentraining BWL (Sartorius College)
- Ideenworkshop (Geschäftsideen generieren, Wirtschaftspotentialbewertung, Umfeldanalyse)
- Advanced Course Quantitative Real-Time PCR

Veröffentlichungen

- „Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*” (Biochemical Engineering Journal, Volume 49, Issue 2, Pages: 213 – 220, 15.04.2010; veröffentlicht als Zweitautor)
- Patentschrift DE102012014981B3: “Verfahren zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen” (Patenterteilung: 18.07.2013)
- Gebrauchsmusterschrift DE202012007324U1: “Vorrichtung zur Behandlung eines Filtrationsmediums”
- Patentanmeldung DE102012015063.6: “Vorrichtung und Verfahren zur Behandlung eines Filtrationsmediums” (Juli 2012 beim PA eingereicht, noch nicht veröffentlicht)
- Poster “Sample Concentration Methods for sensitive and reliable PCR-Detection as exemplified by *Mycoplasma* and *Legionella*” (präsentiert auf der “Rapid Methods Europe Conference”, Januar 2013, Niederlanden)
- “(K)eine Frage der Geschwindigkeit - Echtzeit PCR zum schnellen Nachweis von Mykoplasmen-Kontaminationen“ (Stephanie Schweizer und Alexandra Scholz, GIT-Labor-Fachzeitschrift 9/19, S. 548-549, 20.09.2013)

Sonstiges

03/2005	Teilnahme bei „Jugend forscht“ in Erfurt mit einem Sonderpreis für Biologie
09/2004 - 09/2005	Übungsleiterin im HSV Weimar e.V. in der Abteilung Gerät- und Trampolinturnen
10/2008 - 03/2009	Work & Travel in Australien
10/2009 – 03/2010	Betreuer der Sportart "Circuit- und Konditionstraining" beim Unisport an der TU Braunschweig

Besondere Kenntnisse

Fremdsprachen:	Englisch fließend Französisch Grundkenntnisse
EDV:	MS-Office-Anwendungen, SigmaPlot, EndNote, Citavi

Abstract (Deutsch)

Entwicklung einer funktionellen Einheit bestehend aus Probenvorbereitung und Realtime PCR für die Diagnostik flüssiger Proben an ausgesuchten Modellorganismen

Sauberes Wasser ist ein wertvolles Gut, das geschützt und regelmäßig kontrolliert werden muss. Derzeit werden für mikrobiologische Routineuntersuchungen hauptsächlich wachstumsbasierte Methoden angewandt, die einzelne Mikroorganismen mithilfe von selektiven Kultivierungsschritten nachweisen. Diese Methoden benötigen Inkubationszeiten von bis zu sieben Tagen, um eine Kontamination des Wassers auszuschließen. Jedoch gerade, wenn es um die Freigabe von Prozesswasser für industrielle Anwendungen geht, ist eine mehrtägige Unterbrechung aufgrund von langsamen Analysemethoden nicht tolerierbar und meist mit hohen Kosten verbunden.

Aus diesem Bedarf heraus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Verfahren entwickelt, das innerhalb weniger Stunden die sensitive Detektion von Mikroorganismen in einem großen Volumen einer wässrigen Probe ermöglicht. Dieses Verfahren umfasst folgende Arbeitsschritte: Anreicherung der Bakterien auf einem Membranfilter, Auflösen des Filters inklusive in der Membranstruktur gefangener Mikroorganismen, Zellaufschluss, Isolierung und Fällung der DNA und quantitative Analyse mit einem DNA-basierten Schnelltest. Speziell für den Auflöseschritt des Membranfilters wurde eigens eine Einweg-Plastikeinheit entworfen, die ein kontaminationsfreies Aufnehmen, Auflösen und Überführen in ein 2 ml Reaktionsgefäß des Membranfilters erlaubt.

Außerdem konnte ein neuartiges Verfahren zur Lebend-Tot-Differenzierung von Mikroorganismen in wässrigen Proben entwickelt werden. Dieses basiert auf einer niedrigtemperierten isothermalen DNA-Amplifikation.

Schlagworte: PCR, Chloroform, isothermal

Abstract (English)

Development of a System consisting of Sample Preparation and Real-time PCR for Diagnostics of aqueous Samples using different Model organisms

Clean water is a valuable asset which has to be protected and tested on a regularly basis. Currently microbiological routine tests are done by growth-based methods for the main part. These methods detect different microorganisms with selective cultivation steps and require up to seven days of incubation until a contamination of the tested sample can be excluded. But especially when running final release tests with process water for industrial applications a several days long break is not tolerable and results in high costs.

Because of this demand a new method was developed which is able to detect microorganisms in large aqueous sample volumes within hours instead of days. The new process involves the following steps: Bacteria enrichment on a membrane filter by filtration, dissolving of the filter with all retained microorganisms, cell lysis, DNA isolation and precipitation and quantitative analysis with a DNA-based rapid test. Especially for the dissolving step of the filter a special plastic disposables was designed which allows to pick up, dissolve and transfer the filter material without any risk of contamination into a 2 ml reaction tube.

Furthermore a new method for differentiation between live and dead cells in aqueous samples was found. This method is based on a low temperature isothermal DNA amplification.

Keywords: PCR, chloroform, isothermal

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Zielsetzung	10
3	Theoretischer Teil	12
3.1	Überblick zu den Methoden der mikrobiellen Wasseranalyse sowie deren Vor- und Nachteile.....	12
3.2	Membranbasierte Probenvorbereitungssysteme in der mikrobiellen Wasseranalyse	15
3.3	Stand der Technik: Probenvorbereitung inkl. PCR für die mikrobielle Wasseranalyse	16
3.4	Funktionsprinzip der im Rahmen der Arbeit verwendeten DNA-Amplifikations-Assays.....	20
3.4.1	Realtime PCR mit interkalierenden Farbstoffen	20
3.4.2	Realtime PCR mit Scorpion-Sonden.....	21
3.4.3	Rekombinase-Polymerase-Amplifikation	22
3.5	Relevanz eines DNA-freien Prozessablaufs sowie von DNA-freien Reagenzien und Verbrauchsartikeln	23
4	Experimenteller Teil	26
4.1	Auswahl bzw. Entwicklung geeigneter Assays für die Detektion bestimmter Modellorganismen.....	26
4.1.1	Herstellung quantifizierter genomischer DNA-Standards	31
4.2	Membranfiltration und die vollständige Überführung der zurückgehaltenen Mikroorganismen in ein Reaktionsgefäß	32
4.2.1	Untersuchungen zum Elutions-/Abspülverhalten, der in der Membranstruktur zurückgehaltenen Mikroorganismen	32
4.2.1.1	Überprüfung der Elutionseffizienz mittels Rasterelektronenmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und qPCR.....	32
4.2.1.2	Einfluss von Ultraschall auf die Elutionseffizienz von Mikroorganismen.....	43
4.2.2	Untersuchungen zur mechanischen Zerstörung von Membranfiltern inklusive zurückgehaltener Mikroorganismen.....	47
4.2.3	Untersuchungen zum Auflösen verschiedener Membrantypen	51
4.2.3.1	Auflösen von Membranfiltern mithilfe von organischen Lösungsmitteln.....	52
4.2.3.2	Auflösen von Membranfiltern mithilfe von Enzymen.....	58
4.3	Untersuchungen zur Effektivität verschiedener Zellaufschlussmethoden	62
4.4	Untersuchungen zur Effektivität verschiedener Methoden zur DNA-Isolierung	70

4.5	Neuer Ansatz zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen unter Verwendung der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation	74
4.6	Untersuchungen zur DNA-Abreicherung von Verbrauchsartikeln und Reagenzien	87
5	Zusammenfassung und Diskussion	99
6	Verzeichnisse	CIII
6.1	Abkürzungen	CIII
6.2	Abbildungsverzeichnis	CV
6.3	Tabellenverzeichnis	CVII
6.4	Literaturverzeichnis	CIX
7	Anhang	CXV
7.1	Material und Methoden	CXV
7.1.1	Arbeitsvorschriften	CXV
7.1.1.1	SYBR Green PCR für die Detektion von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	CXV
7.1.1.2	UniTOOL Resolight Assay	CXVI
7.1.1.3	Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese	CXVII
7.1.1.4	Microsart Amp Extraction Kit	CXVII
7.1.1.5	Protokoll der Sartorius Sample Prep	CXVIII
7.1.1.6	RPA-Assay mit dem Kit TwistAmp fpg	CXX
7.1.1.7	Probenvorbereitung mit dem SeptiFast Prep Kit	CXXI
7.1.2	Verwendete Chemikalien	CXXII
7.1.3	Verwendete Lösungen/Puffer	CXXIII
7.1.4	Verwendete Kits	CXXIV
7.1.5	Verwendete Enzyme	CXXV
7.1.6	Verwendete bakterielle Stämme	CXXV
7.1.7	Verwendetes Laborequipment	CXXV
7.1.8	Verwendete Verbrauchsmaterialien	CXXVIII
7.2	Technische Zeichnungen der Membrantransfer- und Auflösungseinheit	CXXX

1 Einleitung

Sauberes Wasser durch sichere Analysen

Sauberes Wasser ist ein wertvolles Gut, das geschützt und regelmäßig kontrolliert werden muss. Bakterielle Verunreinigungen müssen schnell, sicher und empfindlich nachgewiesen werden, egal ob in der Pharmaindustrie, Lebensmittelindustrie oder im Trinkwasser. Jeder Bereich ist reguliert und hat seine eigenen Normen und Grenzwerte.

Purified water, das beispielsweise bei der Herstellung von Medikamenten, Chips in der Halbleiterindustrie, Solarzellen oder als Speisewasser im Kraftwerksbereich Anwendung findet, darf den Grenzwert von 100 Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter (100 KBE/ml) nicht überschreiten. Bei Wasser für Injektionszwecke liegt der Grenzwert sogar bei 10 KBE/100 ml. (Wirz 2008)

Auch der Trinkwasserbereich hat strikte Vorschriften. Vor allem in den vergangenen Jahren geriet die Legionellose, eine durch Tröpfcheninfektion bakteriell hervorgerufene Lungenentzündung, in Teilen Deutschlands in die Schlagzeilen. *Legionella pneumophila*, der häufigste Erreger der Legionellose, lebt vielfach in Kühltürmen, Klimaanlage, Warmwasserspeichern oder Whirlpoolbecken (Madigan et al. 2003). Der größte Ausbruch einer Legionellen-Epidemie in Deutschland ereignete sich vor kurzem, August/September 2013, in Warstein mit drei Toten und 165 Infizierten (Siegmond-Schultze 2013). Bereits Anfang 2010 kam es im Ulmer Raum zu 64 Legionelleninfektionen mit fünf Todesfällen (Hübner-Schroll 2010). Ein Resultat der Epidemie in der Region Ulm war die Überarbeitung der Trinkwasserverordnung. Diese schreibt die regelmäßige Kontrolle von Großanlagen vor, mit einem Maßnahmenwert von 100 KBE/100 ml (Bundesminister für Gesundheit i. A. Ilka 2013).

Hinsichtlich Normen und Vorschriften für den Nachweis von Legionellen hat sich in den letzten Jahren viel getan: Die ISO 12869 befindet sich seit November 2012 in einer dreijährigen Testphase. Wenn sie akzeptiert wird, werden Legionellen-Tests mit qPCR (quantitative *realtime* PCR) erlaubt sein. In Frankreich ist die Legionellen-Diagnostik mittels qPCR bereits seit 2006 entsprechend der AFNOR-Norm akzeptiert.

Die genannten Beispiele stellen nur einen kleinen Auszug aus dem weiten Feld der Wasserdiagnostik dar und verdeutlichen somit den großen Bedarf an effizienten Tests.

Derzeit werden für Routineuntersuchungen hauptsächlich mikrobiologische Methoden angewandt, welche einzelne Mikroorganismen mithilfe von selektiven Kultivierungsschritten nachweisen. Diese Methoden benötigen jedoch mehrere Tage, bis eine Kontamination des

Wassers nachgewiesen werden kann. Allerdings gerade, wenn es um die Freigabe von Prozesswasser für industrielle Anwendungen geht, zum Beispiel bei der Herstellung von Medikamenten, ist eine mehrtägige Unterbrechung aufgrund von langsamen und veralteten Analysemethoden mit hohen Kosten verbunden und daher zu vermeiden. Angestrebt hingegen sind effiziente Methoden zur Probenvorbereitung für eine anschließende Bestimmung der Gesamtkeimzahl mithilfe eines molekularbiologischen Schnelltests, der im Idealfall auch eine Lebend-/Tot-Differenzierung ermöglichen sollte.

2 Zielsetzung

In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass PCR-Methoden aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität einen schnellen und effektiven Ersatz für die bisher eingesetzten Nachweisverfahren darstellen. Die Probenvorbereitung im Vorfeld der molekularbiologischen Analyse stellt hierbei meist den limitierenden Schritt mit zu niedriger Effizienz und Ausbeute dar. Bisher ist im Bereich der Wasserdiagnostik kein Verfahren bekannt, das eine Komplettlösung bietet hinsichtlich Geschwindigkeit, Sensitivität, Quantifizierbarkeit, Lebend-/Tot-Differenzierung, *convenience* und Kosten.

Bisher durchgeführte Arbeiten wie beispielsweise „Development of a sample preparation kit for the detection of *Legionella pneumophila* from water samples via qPCR“ haben bestätigt, dass die Aufkonzentrierung der Wasserkeime mit anschließender quantitativ vollständiger Lyse und Überführung in die PCR keinesfalls trivial ist. Lemare beschreibt, dass mithilfe der Membranfiltrationsmethode und darauf folgendem Elutionsschritt der Legionellen von dem Membranfilter lediglich eine DNA-Wiederfindung in der qPCR von etwa 10 % erreicht werden konnte. (Lemare 2010)

Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung eines effizienten Verfahrens zur Probenkonzentrierung und Probenvorbereitung für die mikrobiologische Analyse von wässrigen Proben via qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion). Es soll eine geeignete Probenkonzentrierungsmethode gefunden werden, die einerseits die zügige Filtrierbarkeit von Wasserproben gewährleistet und andererseits die quantitative Gewinnung der in den Keimen enthaltenen DNA erlaubt. Während dieser Promotion soll mit verschiedenen Modellorganismen gearbeitet werden, um auch die Problematik des vom Zelltyp abhängigen Zellaufschlusses zu adressieren. Hierfür sind Versuche sowohl mit gramnegativen und grampositiven Bakterien geplant als auch mit potentiellen Sporenbildnern, die besonders hohe Anforderungen an den Zellaufschluss stellen.

Zielsetzung

Es soll eine geeignete Zellyse- und DNA-Isolierungsmethode gefunden werden, die idealer Weise universell einsetzbar ist.

Im Vorfeld ist es notwendig, entsprechende PCR-Assays als geeignete Analysewerkzeuge zu evaluieren. Auch wenn das Fernziel eine Gesamtkeim-PCR inklusive Probevorbereitung ist, erscheint es sinnvoll, in der Entwicklungsphase mit keimspezifischen PCR-Tests zu arbeiten, da bakterielle DNA allgegenwärtig ist. Dieses ubiquitäre bakterielle DNA-Vorkommen birgt andernfalls bei der Verwendung universeller Primer ein hohes Risiko an falsch positiven Ergebnissen in sich.

Nach Erarbeitung der notwendigen Grundlagen gilt es, die Schritte Probenkonzentrierung, Zellaufschluss und vollständige Probenüberführung in ein PCR-Gefäß mit minimiertem Kontaminationsrisiko in einer Einheit zusammenzufassen.

Um der klassischen, wachstumsbasierten Membranfiltrationsmethode in nichts nachzustehen, ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Implementierung einer Methode zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Keimen.

Die vorliegende Arbeit lässt sich somit in fünf Hauptziele unterteilen:

1. Quantitativ vollständige Überführung der aufkonzentrierten Mikroorganismen in ein 1,5 bzw. 2 ml Standard-Reaktionsgefäß
2. Quantitativ vollständiger Zellaufschluss
3. Quantitativ vollständige DNA-Isolierung
4. Quantitative Detektion mit Lebend-/Tot-Differenzierung
5. Kontaminationsfreie Durchführung des Gesamtprozesses

3 Theoretischer Teil

Der theoretische Teil der vorliegenden Dissertation soll einen Einblick in drei Themengebiete geben, die relevant für das Verständnis dieser Arbeit sind. In den Kapiteln 3.1 bis 3.3 soll ein Überblick über bereits existierende Methoden der mikrobiellen Wasseranalyse inklusive Probenvorbereitungssysteme gegeben werden. Auch soll auf den aktuellen Stand der Technik mit all seinen Nachteilen eingegangen werden, die es gilt, durch Entwicklungen im Zuge dieser Arbeit zu überwinden. Im zweiten Themenkomplex (Abschnitt 3.4) werden die Funktionsprinzipien der DNA-Amplifikations-Assays erklärt, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Abschließend soll auf die Relevanz eines DNA-freien Prozessablaufs sowie von DNA-freien Reagenzien und Verbrauchsartikeln eingegangen werden (Abschnitt 3.5).

3.1 Überblick zu den Methoden der mikrobiellen Wasseranalyse sowie deren Vor- und Nachteile

Eine effiziente Wasseranalyse-Methode muss im Idealfall eine große Vielzahl an verschiedenen Mikroorganismen nachweisen können. Leider ist eine Untersuchung des Wassers auf diese zahlreichen verschiedenen Keime, die darin vorhanden sein könnten, mit den meisten Verfahren nicht durchführbar aufgrund der sehr unterschiedlichen Kultivierungsansprüche. Daher finden häufig spezifische Indikatororganismen Anwendung, um den Kontaminationsgrad abzuschätzen. Am häufigsten dienen Vertreter der Coliformen Bakterien als Indikatoren. Diese können z.B. mithilfe von Fest- oder Flüssigmedien mit Farbindikatoren für den Nachweis der Verstoffwechselung von Lactose oder der Enzymaktivität von β -D-Galactosidase und β -D-Glucuronidase nachgewiesen werden. (Madigan et al. 2003)

Betrachtet man das große Feld der mikrobiellen Analyse großvolumiger wässriger Proben, so lassen sich die hier angewendeten Methoden im Allgemeinen in wachstumsbasierte und Wachstums-unabhängige Verfahren einteilen. Die wachstumsbasierten Methoden sind wiederum in *presence/absence*-Tests, MPN-Tests (MPN – *most probable number*) und Koloniezähl-Verfahren unterteilbar. Quantitative Koloniezahlen können durch Membranfiltration und Auflegen der Membran auf einen Nährboden, durch Ausplattieren oder durch Immobilisierung der nachzuweisenden Keime innerhalb eines Gels gewonnen werden. (Bain et al. 2012)

Das MPN-Verfahren, auch Verfahren der „Wahrscheinlichsten Anzahl“ genannt, ist eine statistisch abgesicherte Variante des Titerverfahrens und wird in der Mikrobiologie oft zum

Bestimmen von Mikroorganismenkonzentrationen in wässrigen Flüssigkeiten verwendet. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe der Probe hergestellt und in geeignetem Kulturmedium inkubiert. Anschließend wird die am stärksten verdünnte Probe ermittelt, die noch Wachstum bzw. Stoffwechselaktivität zeigt, um die entsprechende Keimzahl zu berechnen. Häufig werden drei Verdünnungsstufen mit jeweils fünf oder mehr Replikaten verwendet, um die Sicherheit der ermittelten Konzentration zu erhöhen. (Feuerpfeil & Botzenhart 2008)

Nichtsdestotrotz bleibt stets eine relativ hohe Ungenauigkeit bestehen, da lediglich geringe Probenvolumina getestet werden können. Gleiches gilt z.B. für die Bestimmung der Zellzahl mittels Ausplattieren oder für *presence/absence*-Tests. Theoretisch lassen sich unter Verwendung des MPN-Prinzips auch mit jedem *presence/absence*-Test quantitative Ergebnisse erzielen, wenn ausreichend viele Replikate in den entsprechenden Verdünnungen kultiviert/getestet werden. (Bain et al. 2012)

Der entscheidende Vorteil der wachstumsbasierten Tests ist, dass die Lebendzellzahl erfasst wird und der eigentlich uninteressante Anteil toter Zellen nicht berücksichtigt wird. Genauer betrachtet ist jedoch die Bezeichnung „Lebend“-Zellzahl nicht korrekt, da lediglich die Fähigkeit sich zu vermehren erfasst wird. Gestresste Zellen, die sich beispielsweise in einem VBNC-Stadium (*viable but nonculturable*) befinden, werden nicht detektiert. Des Weiteren ist laut zahlreichen Publikationen nur ein geringer Prozentsatz überhaupt kultivierbar. Nach Schätzungen von Schrank lassen sich maximal 12 % aller Bakterien im Labor vermehren und bei Mikroorganismen, die aus aquatischen Biotopen stammen sogar nur 0,01 bis 10 % (Schrank 2000). Bei den aquatischen Bakterien liegt laut Ferguson et al. die Kultivierbarkeit sogar lediglich bei < 0,1 % (Ferguson et al. 1984). Strebt man das Ziel an, einen größtmöglichen Anteil der Bakterien- und Pilzgemeinschaft einer Probe nachzuweisen, sind zahlreiche Medien und Inkubationsbedingungen notwendig, was den Kosten-, Platz-, Zeit- und Arbeitsaufwand stark ansteigen lässt. Aufgrund der langsam wachsenden Mikroorganismen sind Inkubationszeiten von sieben Tagen notwendig. Möchte man Mykoplasmen mittels Kultivierung nachweisen, ist sogar eine Inkubationszeit von mindestens 28 Tagen vorgeschrieben, bis eine Mykoplasmen-Infektion sicher ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren muss davon ausgegangen werden, dass vor allem bei Bakterien, die zur Agglomeratbildung neigen, die Koloniezahl nicht mit der tatsächlichen Lebendzellzahl übereinstimmt. *Staphylococcus aureus* beispielsweise bildet häufig Zell-Cluster aus mehreren Einzelzellen, die aber nur zu einer einzigen gemeinsamen Kolonie heranwachsen (Jepras et al. 1995). Auch in der Literatur können zahlreiche Nachweise gefunden werden, dass die kultivierungsbasierten Tests, vor allem die Koloniezähl-Verfahren, die tatsächliche Konzentration

lebender Bakterien um Dimensionen unterschätzen aufgrund von gestressten Zellen oder der Bildung von Zellagglomeraten. (Davey 2011; Auty et al. 2001; Hoefel et al. 2003)

Viele der genannten Nachteile können mit molekularen Methoden umgangen werden. Die meisten molekularen Techniken sind Wachstums-unabhängig und funktionieren auf Basis der Biochemie, Genetik oder Immunologie. Da die meisten molekularbiologischen Tests auf wenige Milliliter, teilweise sogar auf den Mikroliter-Maßstab, limitiert sind und Mikroorganismen selbst dann noch nachweisbar sein sollten, wenn sie in extrem geringer Anzahl in einer Probe vorkommen (weniger als ein Organismus bzw. Partikel pro 100 ml), ist eine Probenvorbehandlung unumgänglich. Hierfür existieren verschiedene Möglichkeiten: Konzentrierung der Probe durch Filtration, Zentrifugation, Fällung oder Immun-Präzipitation sowie durch Anreicherung des Zielorganismus. Zu den „modernen“ Methoden in der mikrobiellen Wasseranalytik zählen u.a. die folgenden Techniken: PCR (Polymerasekettenreaktion), RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR), FACS (*fluorescence-activated cell sorting*), FISH (Fluoreszenz in-situ Hybridisierung), DNA *chip array* und Biosensoren. Bei der PCR werden einzelne DNA-Abschnitte in vitro exponentiell vervielfältigt. Gleiches gilt für die RT-PCR, wobei bei dieser Methode zuerst ein Umschreiben der RNA in DNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase erfolgt. FACS oder auch Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von mehr als 1.000 Zellen pro Sekunde, die einzeln an einem Lichtstrahl vorbei strömen. Bei der FISH-Methode binden spezifische Fluoreszenz-Sonden an bestimmte DNA/RNA-Abschnitte und ermöglichen somit die Detektion und Lokalisierung der Zielsequenzen. Zur Herstellung von DNA *chip arrays* werden Oligonukleotide auf einer festen Oberfläche fixiert. Nach Zugabe einer Oligonukleotid-haltigen Probe kommt es bei Vorhandensein komplementärer Sequenzen zu Hybridisierungsereignissen, welche im Anschluss detektiert werden können. Biosensoren enthalten ein immobilisiertes biologisches System, das mit dem Analyten in Wechselwirkung tritt. Hierbei entstehen physikalische oder chemische Veränderungen, die gemessen werden können. (Köster & Egli 2002)

Doch auch diese „modernen“ Methoden haben ihre Schwächen und vollführen in vielen Fällen einen wahren Balance-Akt zwischen Sensitivität und Spezifität.

Die Basismethode der PCR beispielsweise kann nicht zwischen vitalen und toten Organismen oder gar freier DNA unterscheiden. Erst durch Kombination mit geeigneten DNA-interkalierenden Stoffen ist eine Differenzierung möglich.

Weiterhin nennenswert und häufig eingesetzt sind auch die biochemischen Reaktionen. Es sind zahlreiche Kits, die verschiedene Stoffwechselaktivitäten der Mikroorganismen nachweisen, kommerziell erhältlich, wie z.B. die ATP-Messung mit dem Biolumineszenz-Test.

Das Vorhandensein von ATP in den Proben zeigt hierbei eine Verunreinigung durch Mikroorganismen an. Nachteilig bei den Stoffwechselaktivität nachweisenden Kits ist allerdings, dass Mikroorganismen, die sich im VBNC-Stadium befinden und ihr Stoffwechsel stark herabgesetzt ist, nicht nachgewiesen werden.

Eine sehr vielfältig beispielsweise mit Färbungen kombinierbare Methode stellt die Mikroskopie dar. Allerdings muss mit relativ hohen Ungenauigkeiten und geringen Sensitivitäten gerechnet werden, da meist nur wenige Mikroliter betrachtet und analysiert werden können.

MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of flight*) erlaubt die Identifizierung von Mikroorganismen bis auf die Subspezies-Ebene. Dabei wird die zu analysierende Probe mit einer organischen Matrix gemischt und mit einem Laser beschossen. Die erhaltenen Peptid-Massenspektren werden als Peak-Diagramm visualisiert und mit einer Datenbank abgeglichen (Tholey 2006). Quantitative Ergebnisse können bisher aber nicht generiert werden und auch Mischproben mit geringen Zellkonzentrationen stellen ein Problem dar.

Innerhalb des großen Themenkomplexes der mikrobiellen Wasseranalyse ist es nicht möglich, die eine perfekte Methode zu definieren. Der Anwender muss stets für sich Applikations-spezifisch die beste Methode finden. Oft ist es sinnvoll, eine Kombination verschiedener Nachweismethoden zu wählen, da sowohl die traditionellen kultivierungsbasierten Tests als auch die "Schnelltests" ihre Vor- bzw. Nachteile aufweisen.

3.2 Membranbasierte Probenvorbereitungssysteme in der mikrobiellen Wasseranalyse

Beschränkt man sich bei der Betrachtung auf die verfügbaren Tests, die mit membranbasierten Probenvorbereitungssystemen kombinierbar sind, fällt das Methoden-Spektrum deutlich geringer aus. Nichtsdestotrotz ist die klassische Membranfiltration mit einigen Modifikationen mit einigen Methoden kombinierbar. Möchte man die Membranfilter anschließend auf einem Nähragar inkubieren, um die Koloniezahl zu bestimmen, muss bei der Filterauswahl ein geeigneter Kompromiss zwischen Bakterien-Rückhaltung und Nährstoffdiffusion aus dem Nähragar in die Membranporenstruktur gefunden werden. Die Koloniezählung kann im Anschluss visuell durch den Anwender erfolgen oder automatisiert, da bereits erste Systeme verfügbar sind, die beispielsweise über Autofluoreszenz der lebenden Zellen bereits Mikrokolonien quantitativ erfassen können und somit frühzeitiger als das menschliche Auge zu einem Ergebnis führen (London et al. 2010). Kombiniert man die

Membranfiltration mit einer Nukleinsäure-Amplifikation oder mit Fluoreszenzmikroskopie, sind andere Schwerpunkte bei der Filterauswahl zu setzen. Hierfür eignen sich möglichst engporige Membranen, die eine vollständige Oberflächenabscheidung der Mikroorganismen ermöglichen, ohne dass diese in die Membranporen eindringen können. Allerdings können nicht beliebig enge Porengrößen zum Einsatz kommen, da dies zu unverhältnismäßig langen Filtrationszeiten führen würde. Speziell in Kombination mit Nukleinsäure-Nachweisen ist darauf zu achten, dass das verwendete Membranfiltermaterial möglichst geringe unspezifische Bindungen eingeht, um ein im Idealfall vollständiges Abspülen der Keime von der Membran zu ermöglichen. Bei Fluoreszenzmikroskopie-Anwendungen hingegen ist neben der vollständigen Oberflächenabscheidung der Keime die geringe Eigenfluoreszenz der Membran wichtig. Daher kommen in der Praxis hauptsächlich schwarze Polycarbonat-Membranen zum Einsatz (Hobbie et al. 1977). Die mikroskopische Auswertung hat jedoch einen ganz entscheidenden Nachteil: Es können meist nur sehr kleine Membranausschnitte quantitativ ausgewertet werden, so dass valide Ergebnisse kaum generierbar sind.

Die bereits im vorherigen Abschnitt aufgeführte Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) kann ebenfalls mit der Filtration einer Wasserprobe durch eine Membran kombiniert werden. Anschließend werden die zurückgehaltenen Mikroorganismen auf der Membran fixiert. Es folgt die Permeabilisierung der Zellhülle, so dass die markierten Sonden in die Zelle eindringen können und an die spezifischen Zielmoleküle binden (Köster & Egli 2002).

3.3 Stand der Technik: Probenvorbereitung inkl. PCR für die mikrobielle Wasseranalyse

Da in einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion nur wenige Mikroliter prozessiert werden können, ist es notwendig, große Volumina aufzukonzentrieren, um eine hohe Sensitivität zu erreichen. Nach der Filtration, wenn die Mikroorganismen auf der Membran konzentriert vorliegen, können die Membran-gebundenen Keime aufgrund der Membrangröße von meist 47 mm Durchmesser nicht direkt der Analytik zugeführt werden. Zuvor müssen die zurückgehaltenen Mikroorganismen in ein Probenvolumen überführt werden, das idealerweise 1 ml nicht überschreiten sollte, um eine Probenvorbereitung für die anschließende Analytik in 1,5 bzw. 2 ml Standard-Reaktionsgefäßen zu ermöglichen. Zu dieser Problematik lassen sich zahlreiche Publikationen finden, die den aktuellen Stand der Technik widerspiegeln.

Aus der Patentanmeldung WO2011057707A2 ist eine Kunststoff-Einweeinheit inkl. Verfahren bekannt, das zur Überführung von zurückgehaltenen Keimen aus einem Filter

durch Rückspülen in ein 1,5 bzw. 2 ml Auffanggefäß dient (Pflanz 2010). Nachteilig ist hierbei, dass vermutlich aufgrund der Porengrößenverteilung der meisten Membranfilter zahlreiche Bakterien nicht auf der Membranoberfläche abgeschieden werden, sondern in tieferen Schichten, so dass keine quantitativ vollständige Rückspülung der Partikel möglich ist. Es ist anzunehmen, dass unspezifische Adsorptionseignisse zwischen zurückgehaltenen Mikroorganismen und der Membran dieses Problem zusätzlich verstärken.

Durch Auflösen des Membranfilters dieser Problematik zu begegnen, ist aus zahlreichen Veröffentlichungen bekannt (Kawamoto & Motoyama 2010; DiMichele & Lewis 1993; Nakamura 2003; Stärk et al. 1998). Bei jedem dieser beschriebenen Verfahren wird jedoch der Membranfilter nach erfolgter Filtration mit einer Pinzette aufgenommen, umständlich gefaltet und in ein Reaktionsgefäß (meist 1,5 bis 2 ml Gefäß) überführt. Dieses Vorgehen bringt ein großes Kontaminationsrisiko mit sich und verlangt dem Anwender viel Geschicklichkeit beim Falten der Membran ab. Auch aus einem Artikel von Sen et al. ist die Methode bekannt, den Membranfilter mit einer Pinzette zu falten und in ein Reaktionsgefäß zu überführen. Es folgt kein Auflöseschritt der Membran, sondern lediglich ein Abspülen mit beispielsweise einem Lysepuffer oder eine mechanische Beanspruchung der Membran mithilfe eines Vortex-Mixers in Anwesenheit von Mahlkugeln (Sen et al. 2007). Dieser chemische bzw. mechanische Bearbeitungsschritt dient sowohl dem Herauslösen der in der Membranstruktur gefangenen Keime als auch deren Zellaufschluss. Wie bereits erwähnt, ist aufgrund der vielschichtigen Struktur zahlreicher Membranen (Dicke meist $> 100 \mu\text{m}$) und wegen auftretenden unspezifischen Adsorptionseffekten, eine vollständige Wiederfindung sämtlicher Keime durch einen einfachen Spülschritt nicht möglich. Erschwerend kommt noch hinzu, dass bei einer klein zusammengefalteten Membran in einem engen Reaktionsgefäß keine gezielte reverse Spülung des Membranfilters erfolgen kann. Es ist lediglich ein ungerichtetes Mixen bzw. Vortexen von Membran und Spüllösung möglich.

Aus der Patentanmeldung WO2012031156A1 ist eine verschließbare Filtrationsvorrichtung mit einer 13 mm-Filtrationsfläche ($\varnothing 13 \text{ mm}$) bekannt. Der Membranfilter verbleibt nach der Filtration in der Einheit, und die Zellyse erfolgt direkt auf der Membranoberfläche mithilfe von Mahlkugeln und einem Vortex-Mixer. Die freie DNA der lysierten Zellen soll dann in einem darauf folgenden Filtrationsschritt den Membranfilter passieren (Hacker et al. 2011). Auch dieses Verfahren ist mit Nachteilen behaftet, da ein Großteil der Mahlkugel-Stöße durch den Membranfilter abgefangen wird und somit die Mikroorganismen in den tieferen Membranschichten unversehrt bleiben. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass der anschließende Filtrationsschritt der Nukleinsäuren durch den Membranfilter nur eine

geringe Effizienz aufweist, da Nukleinsäuren dazu neigen, unspezifische Bindungen mit dem Membranmaterial einzugehen. Hinzu kommt außerdem, dass der Durchmesser der Filtrationsfläche bei dieser Art von Vorrichtung auf 13 mm limitiert ist, aufgrund der Kompatibilität zu gängigen Zentrifugenmodellen und –adaptoren. Ein 13 mm Filterdurchmesser führt aber bei größeren Probevolumina zu deutlich längeren Filtrationszeiten.

Die verschiedenen in der Stand-der-Technik-Analyse aufgeführten Verfahren können trotz ihrer Mängel auch in kommerziell erhältlichen Produkten wiedergefunden werden. So arbeitet z.B. das *Aquadien Kit* von Bio-Rad nach folgendem bekannten Prinzip: Membranfiltration (47 mm Ø; 0,4 µm, Polycarbonat-Membran), Überführen des Membranfilters mithilfe einer Pinzette in ein Reaktionsgefäß (siehe Abb. 1; Rechts: Variante II), Zugabe von Lysepuffer, Zellaufschluss mittels Hitzelyse, Reinigung des Lysats unter Verwendung kleiner Zentrifugenröhrchen, die nach dem Prinzip der Ultrafiltration funktionieren. Eigene Tests haben Wiederfindungsraten von < 10 % mit *Legionella pneumophila* ergeben.

Das *GeneDisc DNA Extractor* Protokoll von PALL soll laut Herstellerangaben zu Bakterien-Wiederfindungsraten von > 50 % führen. Das Protokoll beginnt mit einer Membranfiltration (0,4 µm, Polycarbonat-Membran). Anschließend wird die Membran ebenfalls in ein Reaktionsgefäß mit Lysepuffer überführt und zur Zellyse acht Minuten im Ultraschallbad sonifiziert und 19 Minuten auf 100 °C erhitzt. Die DNA-Reinigung erfolgt mittels Silica-basierten Zentrifugenröhrchen.

Unter Verwendung des *AquaScreen Fast Extract Kits* der Minerva Biolabs GmbH wird der Membranfilter (47 mm Polyethersulfon-Membran) nach erfolgter Membranfiltration mit einer Pinzette mit der Filtrationsfläche nach unten in eine Petrischale überführt und 2 ml Lysepuffer hinzugefügt (siehe Abb. 1; Links: Variante I). Mehrmaliges Schwenken und Inkubationsschritte bei 37 °C und bei 56 °C dienen dem Zellaufschluss. Die DNA-Isolierung erfolgt anschließend mithilfe von Silica-basierten Zentrifugenröhrchen, wobei lediglich ¼ des Gesamtvolumens des Lysats im Zuge der DNA-Isolierung weiter prozessiert werden. Hierbei wird ein weiteres Hauptproblem des aktuellen Stands der Technik deutlich. Da die gängigen Silica-Zentrifugenröhrchen auf 500 µl bis 700 µl Fassungsvermögen begrenzt sind, dieses Volumen aber nicht zum Spülen eines Membranfilters ausreicht, können meist nur Aliquots prozessiert werden. Dies kann zu erheblichen Sensitivitätsverlusten führen.

Auch das *MilliPrep System* von Millipore ist ein membranbasiertes Probenvorbereitungssystem. Es handelt sich hierbei um ein geschlossenes System, so dass das Kontaminationsrisiko während der Probenvorbereitung gering ist. Es funktioniert ebenfalls nach einem bereits in der Stand-der-Technik-Analyse beschriebenen Prinzip, wobei die Zellyse unter Anwesen-

heit von Lysepuffer auf der Membran passiert. In einem nachgeschalteten Zentrifugations-schritt sollen sämtliche Nukleinsäuren der lysierten Zellen die Membran passieren (Poren-durchmesser 0,1 µm). Dieses System ist bisher lediglich für Mykoplasmen anwendbar.

Der aktuelle Stand der Technik lässt vermuten, dass keines der beschriebenen Verfahren die angestrebten Kriterien vollständig erfüllt. Daher soll im Rahmen dieser Promotion eine Methode gefunden werden, die es ermöglicht, einen Membranfilter (47 mm Ø) einschließlich zurückgehaltener Mikroorganismen kontaminationsfrei, einfach und sicher in ein Auffang-gefäß zu überführen, um die Probe quantitativ vollständig für eine DNA-Extraktion und molekularbiologische Analysemethoden zugänglich zu machen.

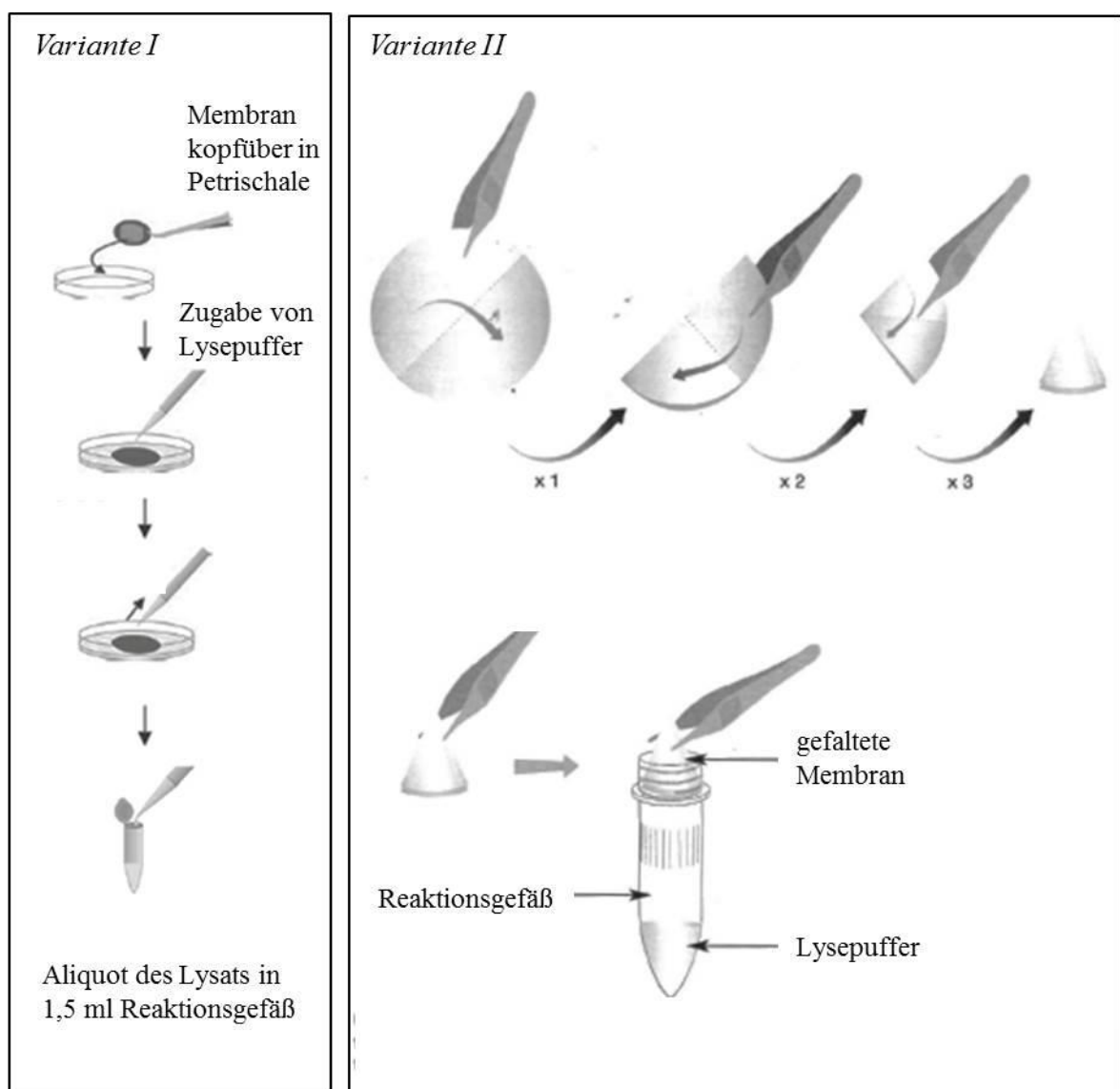


Abb. 1: Methoden nach aktuellem Stand der Technik; *AquaScreen Fast Extract* arbeitet nach Variante I (Minerva Biolabs GmbH 2012) und *Aquadien* unter Verwendung von Variante II (Bio-Rad Laboratories GmbH 2006)

3.4 Funktionsprinzip der im Rahmen der Arbeit verwendeten DNA-Amplifikations-Assays

Dieses Kapitel (Abschnitt 3.4) soll die Funktionsprinzipien der DNA-Amplifikations-Assays erläutern, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen und für das Verständnis der vorliegenden Dissertation relevant sind.

Mittlerweile geht der Trend immer mehr zu weniger zeitintensiven *realtime* Amplifikationsmethoden, wobei die gelelektrophoretische Auswertung entfällt. Neben dem Zeitgewinn spricht auch der Sensitivitätsgewinn für sich: Die Nachweisgrenze von Amplikon-DNA im Agarose-Gel liegt bei etwa 2-4 ng, während beispielsweise in der *realtime* PCR sogar 2-20 pg nachgewiesen werden können (Grimm 2008). Daher kamen im Zuge dieser Arbeit nur Amplifikations-Assays zum Einsatz, die eine Echtzeit-Fluoreszenzmessung sowie eine Quantifizierung ermöglichen. Die Fluoreszenzzunahme verläuft hierbei proportional zur Zunahme an amplifizierter DNA. Parallel amplifizierte DNA Standards mit bekannter Konzentration erlauben eine Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Genomeinheiten.

3.4.1 Realtime PCR mit interkalierenden Farbstoffen

Die einfachste Methode der quantitativen *realtime* PCR arbeitet unter Verwendung von interkalierenden DNA-Farbstoffen, wie beispielsweise Ethidiumbromid oder SYBR Green I. DNA-interkalierende Farbstoffe emittieren Fluoreszenz, sobald sie an dsDNA (doppelsträngige DNA) gebunden vorliegen (Abb. 2, links). (Mülhardt 2009)

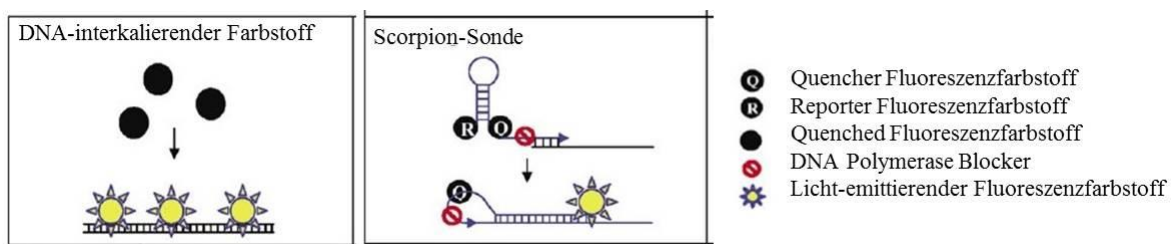


Abb. 2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips von interkalierenden Farbstoffen und Scorpion-Sonden; Primer sind als horizontale Pfeile dargestellt (modifiziert nach Wong & Medrano 2005)

Da sich doppelsträngige DNA-Produkte von Amplifikationszyklus zu Amplifikationszyklus anreichern, können stetig mehr Farbmoleküle binden und Fluoreszenzsignale generieren. Somit korreliert die Fluoreszenzintensität proportional mit der Konzentration an dsDNA. Diese Technik ist sehr flexibel, da ein Fluoreszenzfarbstoff, im Gegensatz zu spezifischen Sonden, für verschiedene Assays eingesetzt werden kann. Dieser Vorteil bringt auch einen Nachteil mit sich: Multiplex-Reaktionen sind nicht möglich, da diese Farbstoffe nicht

Sequenz-spezifisch binden. Aus diesem Grund ist diese Art von Assays recht anfällig für falsch positive Signale. Da sowohl das Zielamplikon als auch z.B. Primerdimere zu einem Fluoreszenzanstieg führen können, sollte nach Beendigung der Amplifikationsphase, meist nach 40 Zyklen, daher eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Abhängig von der Länge und von der Basenzusammensetzung hat jede doppelsträngige DNA ihre eigene spezifische Schmelztemperatur, die dadurch definiert ist, dass mindestens 50 % der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen gegenüberliegenden Basenpaaren gespalten vorliegen. So liegt z.B. die Schmelztemperatur eines Primerdimers aufgrund der geringen Länge zwischen etwa 20 und 30 Basenpaaren sehr weit unterhalb der eines 200 Basenpaar-langen Produktes. (Wong & Medrano 2005)

3.4.2 Realtime PCR mit Scorpion-Sonden

Scorpion-Sonden basieren auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET). Jede Sonde weist zwei Fluorochrome auf, einen FRET-Donor und einen FRET-Akzeptor, die in einer Nähe von etwa 1 bis 10 nm zu einem FRET-Ereignis führen (Didenko 2001).

Scorpion-Sonden sind eine Kombination aus Detektionssonde und Primer. Ein Ende des Oligonukleotids wird durch ein Fluorophor begrenzt, gefolgt von einer komplementären Haarnadel-Struktur, einem Quencher Farbstoff, einem DNA-Polymerase Blocker und einem PCR-Primer (siehe Abb. 2). Der DNA-Polymerase Blocker, auch Spacer genannt, besteht meist aus Hexaethylenglycol und verhindert ein Durchlesen der Sonde, was andernfalls die Primer- bzw. Sonden-Region doppelsträngig werden ließe. Die ersten fünf bis sechs Basen der Haarnadel-Struktur sind meist komplementär, wodurch es zu der Ausbildung dieser charakteristischen Sekundärstruktur kommt, die ebenfalls die spezifische Sondensequenz enthält. Liegt diese geschlossene Haarnadelstruktur vor, kann aufgrund der räumlichen Nähe von Reporter und Quencher kein Fluoreszenzanstieg detektiert werden. In Anwesenheit der Zielsequenz während des *thermocyclings* kommt es zur Anlagerung der Haarnadel-Region an diese komplementäre Zielsequenz, so dass der Abstand zwischen Quencher und Reporter Fluorophor vergrößert wird und ein Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden kann. Die hohe Spezifität der Scorpion-Sonden rührt daher, dass nur dann ein Signal entstehen kann, wenn in räumlicher Nähe zum angelagerten Primer auch die passende Sondensequenz gefunden werden kann. Daher führt die zufällige Amplifikation eines ungewünschten Produktes nicht automatisch zum Fluoreszenzanstieg. (Wong & Medrano 2005)

3.4.3 Rekombinase-Polymerase-Amplifikation

Die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) nach Piepenburg et al. zählt zu den isothermalen Amplifikationsverfahren. Unabhängig von der Amplifikationsmethode ist ein entscheidender Schritt bei der selektiven Vermehrung der Ziel-DNA die Primer- bzw. Sonden-Anlagerung. Dieser Schritt ist im Normalfall kinetisch getrieben und setzt somit eine hohe Primer- und Sonden-Konzentration sowie eine Anlagerungstemperatur von etwa 65 °C voraus. Dies gilt z.B. für die *strand displacement amplification*, *loop-mediated isothermal amplification*, *helicase-dependent amplification* und *rolling circle amplification*. Die Entwicklung der RPA revolutionierte das Prinzip der Primer-Hybridisierung. Die Rekombinase bindet die Primer und bildet mit ihnen einen Nukleoprotein-Komplex. Die Reaktionstemperatur beträgt konstant ~ 37 °C. Bei dieser Temperatur scannt die Rekombinase die dsDNA und führt bei erkannter Zielsequenz unter Einbau des passenden Primers zum Strangaustausch. Die DNA-Polymerase I aus *Bacillus subtilis*, die eine starke *strand displacement* Aktivität besitzt, verlängert anschließend den hybridisierten Primer in Richtung des 3'-Endes. Sogenannte Einzelstrang-Bindeproteine (*single strand binding proteins* – SSB) lagern sich an die Einzelstränge an und stabilisieren somit die Trennung der beiden Stränge des DNA *templates*. Der beschriebene Ablauf eines typischen RPA-Zyklus ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Der Reaktionsverlauf ähnelt dem einer PCR, so dass die DNA exponentiell amplifiziert wird. Die Echtzeit-Beobachtung des Amplifikationsansatzes mithilfe von Fluoreszenzsonden oder DNA-interkalierenden Farbstoffen ist ebenfalls möglich. Da weder eine initiale DNA-Denaturierung noch eine hohe Reaktionstemperatur während der Amplifikation notwendig ist, weist diese Methode ein hohes Potential für den DNA-Nachweis in *point of care* Systemen auf. Des Weiteren entfallen die bei der PCR notwendigen, meist zeitkritischen, Heiz- und Kühlphasen des PCR-Gerätes, so dass eine RPA-Reaktion bereits nach 10 bis 20 min zu den gewünschten Ergebnissen führt. (Piepenburg et al. 2006; Kim & Easley 2011)

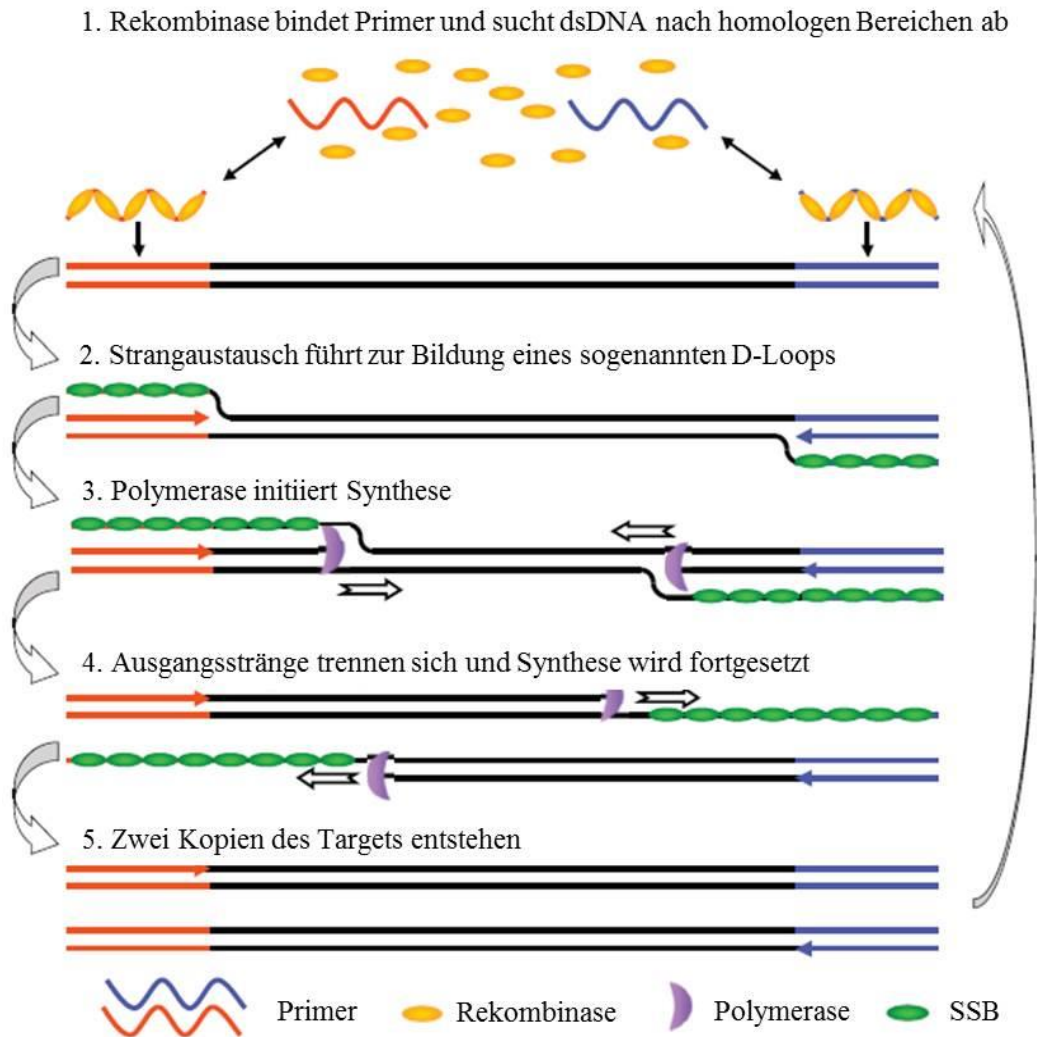


Abb. 3: Schematische Darstellung eines RPA-Zyklus, Temperaturoptimum 37°C (modifiziert nach TwistDx 2012)

3.5 Relevanz eines DNA-freien Prozessablaufs sowie von DNA-freien Reagenzien und Verbrauchsartikeln

Eine effiziente DNA-Abreicherung des Gesamtprozesses, bestehend aus Probenvorbereitung und Analyseverfahren, ist notwendig, um hochsensitive Analyseverfahren nutzen zu können und valide Ergebnisse zu produzieren. Falsch positive Ergebnisse durch kontaminierende Nukleinsäuremoleküle können schwerwiegende Folgen in der medizinischen Diagnostik, Kriminalistik, bei wissenschaftlichen Analysen oder auch bei Produktfreigaben mit sich bringen. Eine der Hauptquellen für DNA-Kontaminationen ist die Raumlüftung, die mit ihrem permanent zirkulierenden Luftstrom Mikroorganismen oder Staubpartikel mit gebundener DNA frei im Raum verteilt. DNA-Moleküle weisen eine hohe Stabilität auf, wenn sie beispielsweise gebunden an Oberflächen oder eingetrocknet an Staubpartikeln vorliegen. Als

weitere Kontaminationsquellen können z.B. Autoklaven, Laborwasser, Anwender, Zentrifugen und Reagenzien bzw. Kit-Bestandteile genannt werden. Da die Analyse mittels PCR heute so empfindlich ist, dass schon Kontaminationen durch einzelne DNA-Fragmente zu falsch positiven Signalen führen können, ist die nachhaltige Dekontamination besonders wichtig. (AppliChem 2007).

Auch in diversen Publikationen ist immer wieder die Rede von falsch positiven Ergebnissen aufgrund von kontaminierten Kit-Bestandteilen, was verdeutlicht, dass dieses Thema äußerst komplex und keinesfalls trivial ist. 2003 zeigten Mohammadi et al., dass die Sensitivität eines *realtime* PCR-Assays zur Detektion des eubakteriellen 16S rRNA Gens durch DNA-Kontamination der PCR-Reagenzien beeinträchtigt werden kann (Mohammadi et al. 2003). Laut Mohammadi et al. und Peters et al. wurden auch DNA-Kontaminationen in kommerziell erhältlichen DNA-Extraktions-Reagenzien nachgewiesen, die zu falsch positiven Signalen führten, wenn bei der Auswertung universelle Primer Anwendung fanden, die das bakterielle 16S rRNA Gen detektieren. Diese Kontaminationen zeigten eine Lot zu Lot Schwankung. Bei den Kontaminationen handelte es sich vorwiegend um DNA von Bakterien, die Wasser als Habitat bevorzugen, wie *Burkholderia* spp., *Pseudomonas saccharophilia*, *Ralstonia* spp., *Alcaligenes* spp. *Bradyrhizobium* spp. und andere verwandte Keime. Es ist möglich, dass die Kontaminationen aus den Reinstwasseranlagen der Reagenzienhersteller stammen. (Mohammadi et al. 2004; Peters et al. 2004)

Andere Autoren hatten vorab gezeigt, dass die genannten bakteriellen Spezies regelmäßig in industriellen Reinstwasseranlagen auftreten und dass es sich hierbei hauptsächlich um gram-negative Stämme handelt (Kulakow et al. 2002).

Corless et al. berichten, dass unabhängig von der verwendeten Taq-Polymerase stets falsch positive Signale generiert wurden unter Verwendung eines sensitiven TaqMan PCR-Assays mit universellen bakteriellen Primern. *AmpliTaQ Gold DNA Polymerase* von Applied Biosystems wird als *low DNA* Polymerase beworben, enthält aber trotzdem ≤ 10 Kopien des bakteriellen 16S rRNA Gens pro 5 unit Aliquot (Corless et al. 2000). Trotz aufwendiger Reinigungsschritte sind dies vermutlich Verunreinigungen bedingt durch das verwendete Expressionssystem, *E. coli*.

Eine weitere mögliche Kontaminationsquelle stellt die Uracil-N-Glykosylase (UNG) dar, die der Vermeidung einer *carry over* Kontamination von vorherigen PCR-Läufen dient. Auch bei der UNG-Herstellung kommt häufig *E. coli* als Expressionssystem zum Einsatz, so dass trotz aufwendiger Produktaufreinigung noch amplifizierbare DNA des Expressionswirts nachweisbar ist (Corless et al. 2000).

In kommerziell erhältlichen Silica-basierten Zentrifugenröhrchen wurden bereits Legionellen-Kontaminationen detektiert. Während der Kitherstellung werden die Zentrifugenröhrchen mit Wasser gespült, was zur DNA-Kontamination bzw. Verunreinigung mit bakteriellen Zellen geführt haben kann (van der Zee et al. 2002). Evans et al. machten parallel die gleiche Entdeckung und vermuteten ebenfalls, dass es während des Spülschrittes bei der Herstellung der Silica-Zentrifugenröhrchen zur Kontamination mit Legionellen Spezies oder mit LLAPs (*Legionella-like amoebal pathogens*) kommen kann. Während dieses Prozesses kann es ebenfalls zur Verunreinigung mit anderen Umweltkeimen kommen. So zeigte die Arbeitsgruppe auch unter Verwendung eines Aspergillen-PCR-Assays, dass gelegentlich Fungi DNA nachweisbar ist (Evans et al. 2003).

Anhand der zahlreichen publizierten Kontaminationsereignisse wird deutlich, wie relevant ein DNA-freier Gesamtprozess für das finale Ergebnis ist. Ohne die Sicherheit, dass ausschließlich DNA-freie Reagenzien und Verbrauchsartikel eingesetzt werden, kann sich kein Anwender auf seine Endergebnisse verlassen. Es ist selbst dann kein Verlass auf die Ergebnisse, wenn ein PCR-Assay zum Einsatz kommt, dass für nur einen Keim spezifisch ist. Denn es ist nicht auszuschließen, dass die zur Analyse verwendeten Probenvorbereitungs- und PCR-Kits nicht gerade mit diesem Keim bzw. dessen DNA kontaminiert sind.

Die Relevanz dieser Thematik ist somit klar. Wie eine vollständige Abreicherung des Gesamtprozesses erzielt werden kann und in welchem Maße, dies tatsächlich umsetzbar ist, soll im Kapitel 4.6 experimentell geklärt werden.

4 Experimenteller Teil

Zu den Anforderungen an ein mikrobiologisches Untersuchungsverfahren gehören der quantitative und reproduzierbare Nachweis von geringsten Kontaminationen sowie die effiziente und wirtschaftliche Durchführbarkeit eines solchen Verfahrens unter Alltagsbedingungen.

Die traditionelle Membranfiltermethode wird diesen Ansprüchen gerecht, wenn man die recht langen Inkubationszeiten vernachlässigt bis eine visuelle Auswertung durch Auszählen der Kolonien möglich ist.

Gesamtziel dieser Arbeit sollte es daher sein, eine schnelle Alternative zum kulturellen Nachweis der im Membranfilter zurückgehaltenen Mikroorganismen zu schaffen.

Thematisch erschien es daher zu Beginn dieser Arbeit sinnvoll, diese Aufgabenstellung in folgende fünf Hauptarbeitspakete zu unterteilen:

- Quantitativ vollständige Überführung der im Membranfilter zurückgehaltenen Mikroorganismen in ein 1,5 bzw. 2 ml Standard-Reaktionsgefäß
- Quantitativ vollständiger Zellaufschluss
- Quantitativ vollständige DNA-Isolierung
- Quantitative Detektion mit Lebend-/Tot-Differenzierung
- Kontaminationsfreie Durchführung des Gesamtprozesses

Die Bearbeitung der Arbeitspakete erfolgte nicht chronologisch, da bereits für die Tests zur Probenvorbereitung ein geeignetes Analysewerkzeug notwendig war, um die Qualität der Probenvorbereitungsmethode zu beurteilen, so dass in einem ersten Schritt bereits quantitative Detektions-Assays für ausgewählte Modellorganismen ermittelt bzw. entwickelt wurden.

4.1 Auswahl bzw. Entwicklung geeigneter Assays für die Detektion bestimmter Modellorganismen

Um die Problematik des vom Zelltyp abhängigen Zellaufschlusses zu adressieren und idealerweise eine Zelllysemethode zu finden, die universell einsetzbar ist, fanden verschiedene bakterielle Spezies im Rahmen der Arbeit Anwendung.

Escherichia coli, ein gramnegatives nicht-sporulierendes Bakterium der Klasse der Gamma-Proteobacteria, zählt zu den weltweit am besten untersuchten Organismen und gilt außerdem

als Indikatorkeim für das mögliche Vorhandensein von Krankheitserregern in der Wasserdiagnostik. Weitere Gründe für die Wahl dieses Modellorganismus sind die einfache Kultivierung und Anzucht sowie die hohe Teilungsrate, die unter optimalen Bedingungen lediglich 20 min beträgt. (Madigan et al. 2003)

Bacillus subtilis, ein Bakterium der Klasse Bacilli, wurde aufgrund seiner Fähigkeit zur Bildung von Endosporen als Vertreter der grampositiven Bakterien gewählt. In experimentellen Versuchen kam sowohl die vegetative Form als auch Sporen zum Einsatz. Grampositive Bakterien lassen sich aufgrund ihrer deutlich dickeren Mureinschicht schwerer aufschließen als gramnegative Bakterien. Einen nochmals deutlich erhöhten Schwierigkeitsgrad hinsichtlich Zellaufschluss stellen bakterielle Sporen dar, die aus einem Exosporium, mehreren Sporenhüllen, einem Sporencortex und dem Sporenprotoplast aufgebaut sind. (Madigan et al. 2003)

Bis zu 40 Gigapascal und schockartige Temperaturanstiege bis auf 350 °C überleben *Bacillus subtilis* Sporen und zählen damit zu den stabilsten Sporen der Welt. Im Vergleich dazu können beispielsweise freie Nukleinsäuren bereits bei 400 bis 600 Megapascal geschädigt werden, so dass man sich gut überlegen sollte, ob bei einer DNA-Extraktion aus bakteriellen Sporen der alleinige Einsatz von Hochdruck Sinn macht oder doch besser eine enzymatische, chemische oder mechanische Vorbehandlung ratsam wäre (Vogel & Ehrmann 2011).

Legionella pneumophila, ein gramnegativer klassischer Wasserkeim, ebenfalls der Klasse der Gamma-Proteobacteria zugehörig, wurde aufgrund seiner aktuellen Bedeutung für die Trinkwasserdiagnostik ausgewählt (Hübner-Schroll 2010). Auch die Tatsache, dass bereits diverse Kits, bestehend aus Probenvorbereitung und *realtime* PCR, zur Testung großvolumiger Wasserproben auf dem Markt erhältlich sind, führte zur Wahl dieses Modellorganismus. Somit wäre ein direkter Vergleich eines während dieser Arbeit entwickelten Probenaufbereitungsverfahrens mit bereits bestehenden Produkten möglich. Hingegen sind Komplettlösungen zur Gesamtkeimdetektion, d.h. Probenvorbereitung plus universelle *realtime* PCR, noch nicht bekannt.

Eine Liste mit den verwendeten bakteriellen Stämmen ist im Anhang (Abschnitt 7.1.6) zu finden. Für die drei Modellorganismen wurde im Folgenden ein geeignetes *realtime* PCR-Assay entwickelt bzw. ausgewählt. Da aufgrund einer bereits bestehenden Kooperation mit der Minerva Biolabs GmbH guter Zugang zu sensitiven kommerziell erhältlichen *realtime*

PCR-Kits zur Detektion von Legionellen bestand, wurde auf die Etablierung eines neuen Legionellen-Assays verzichtet. Abhängig von der Lieferverfügbarkeit wurden die Legionellen Versuche mit dem *AquaScreen Legionella species* oder *Legionella pneumophila qPCR Detection Kit* bzw. mit dem Kit *OnarLp* durchgeführt. Diese drei Legionellen Kits basieren auf der Detektion mithilfe von Scorpion-Sonden (Abschnitt 3.4.2).

Für den Nachweis von *E. coli* und *B. subtilis* wurden sowohl neue *realtime* Assays etabliert, als auch ein nicht kommerziell erhältliches *realtime* PCR Kit für die universelle Detektion von grampositiven und gramnegativen Bakterien verwendet. Diese Assays basieren auf den Fluoreszenzfarbstoffen SYBR-Green oder Resolight, die unspezifisch doppelsträngige DNA nachweisen (Abschnitt 3.4.1). Inwieweit es sich um die gewünschten spezifischen Amplikons des Targets handelt, kann im Anschluss mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse der Amplifikationsprodukte überprüft werden. Für die Erstellung eigener Assays wurden sowohl Primersequenzen aus diversen Publikationen als auch selbst entworfene Oligonukleotide getestet. Sämtliche Sequenzen sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Primer-Sequenzen: *E. coli* und *B. subtilis*; EB – universeller bakterieller Primer, B – spezifischer Primer für *B. subtilis*, E – spezifischer Primer für *E. coli*, F – Vorwärts-Primer, R – Rückwärts-Primer

Bezeichnung und Referenz	5'-3'-Sequenz	Anzahl nt	GC [%]	Tm [°C]	Amplikon
B_FI (Bsub5F) (Wattiau et al. 2001)	AAGTCGAGCGGACAGATGG	19	57,9	57,1	FI+RI 135 bp, FI+RII 595 bp
B_RI Eigene Sequenz	TGCGGTTCAAACAACCATCCG	21	52,4	58,6	
B_RII (Bsub3R) (Wattiau et al. 2001)	CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC	22	59,1	60,0	
E_FI Eigene Sequenz	GAACGGTAACAGGAAGCAGC	20	55,0	56,2	147 bp
E_RI Eigene Sequenz	TAAGGTCCCCCTCTTTGTGC	20	55,0	56,9	
E_FII (dnaK) <i>realtimeprimers.org</i> *	TCGTATGCCAATGGTTCAGA	20	45,0	53,9	72 bp
E_RII (dnaK) <i>realtimeprimers.org</i> *	TCCGGGTTAACGTCTTTACG	20	50,0	54,5	

*vollständige Internetadresse:

<http://www.realtimeprimers.org/SYBR%20Green/Other%20SYBR%20Green%20Primers/UNK-2.html>

Der Großteil der in Tab. 1 aufgeführten Sequenzen verwendet das 16S rRNA Gen als Target. Bei dem 16S rRNA Gen handelt es sich bei den meisten Bakterien um ein *multicopy* Gen, das

mehrfach pro Genom vorhanden ist, was eine sensitivere Detektion ermöglicht als unter Verwendung eines *singlecopy* Gens. Das *E. coli* Genom enthält 7 Kopien des 16S rRNA Gens, bei *B. subtilis* sind es 10 Kopien (Stevenson & Schmidt 2004).

Das Erstellen der eigenen Primersequenzen erfolgte mithilfe des *online tools* „*Mult Alin*“ (*multiple sequence alignment by* Florence Corpet). Unter Verwendung dieses *online* Hilfsmittels wurde die 16S rRNA Gensequenz von *B. subtilis* bzw. *E. coli* mit zahlreichen Sequenzen anderer Mikroorganismen abgeglichen und nach variablen Bereichen gesucht, die spezifisch für *B. subtilis* bzw. *E. coli* sind, um dort, unter Einhaltung allgemeingültiger Regeln für das Entwerfen von Primern, die entsprechenden Primer zu platzieren.

Beispielhaft ist in Abb. 4 ein Sequenzvergleich (*engl.: alignment*) des 16S rRNA Gens von *B. subtilis* und *E. coli* dargestellt. Geeignete universelle, bakterielle Primer (338f: 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3' (Lane 1991); 518r: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (Muyzer et al. 1993)) wurden in blauer Schrift eingezeichnet.

	241		320
Bacillus.s	GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT CACCAAGGCA ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCCACTG		
Escherichi	TGGGATTAGC TAGTAGGTGG GGTAACGGCT CACCTAGGCG ACGATCCCTA GCTGGTCTGA GAGGATGACC AGCAACACTG		
Forward-Pr			
Reverse-Pr			
Consensus			
	321		400
Bacillus.s	GGACTGAGAC ACGGCCAGG CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG ACGGAGCAAC		
Escherichi	GAAGTACGAC ACGGTCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCCTG ATGCAGCCAT		
Forward-Pr		A CTCCTACGGG AGGCAGCAG	
Reverse-Pr			
Consensus	a ctccctacggg aggcagcag.		
	401		480
Bacillus.s	GCCGCGTGAG TGATGAAGGT TTTCGGATCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA AGAACA-AGT ACCGTTTCGAA TAGGGCGGTA		
Escherichi	GCNGCGTGTA TGAAGAAGGC CTTCGGGTTG TAAAGTACTT TCAGCGGGGA GGAAGGGAGT AAAGTT--AA TACCTTTGCT		
Forward-Pr			
Reverse-Pr			
Consensus			
	481		560
Bacillus.s	CCTTGACGGT ACCTAACCAG AAAGCCACGG CTAAGTACGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGTGGCA AGCGTTGTCC		
Escherichi	CATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCAG CTAAGTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTTAATC		
Forward-Pr			
Reverse-Pr		CCAGCAGCC GCGGTAAT	
Consensus		.ccagcagcc gcggtaat..	
	561		640
Bacillus.s	GGAATTATTG GCGGTAAAGG GCTCGCAGGC GGTTCCTTAA GTCTGATGTG AAAGCCCCG GCTCAACCGG GGAGGGTCAT		
Escherichi	GGAATTACTG GCGGTAAAGC GCACGCAGGC GGTTCCTTAA GTCTGATGTG AAATCCCCG GCTCAACCTG GGAAGTGCAT		
Forward-Pr			

Abb. 4: Sequenzvergleich des 16S rRNA Gens von *B. subtilis* (Ribosomal Database Project, S000003473, DSM10) und *E. coli* (Ribosomal Database Project, S000013881, ATCC 25922); universelle bakterielle Primer sind blau markiert; *online tool* „*Mult Alin*“ (*multiple sequence alignment by* Florence Corpet)

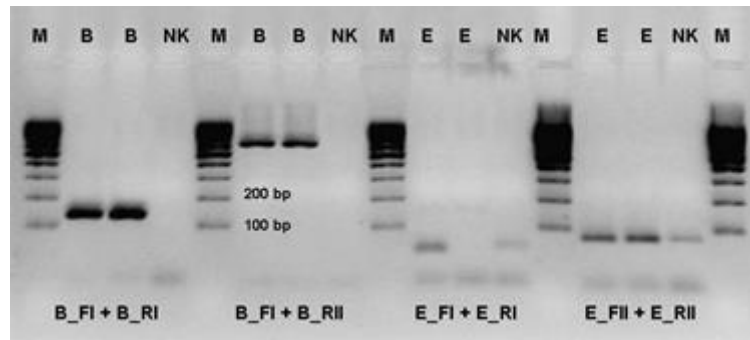


Abb. 5: Test der bestellten Primer mit genomischer *B. subtilis* und *E. coli* DNA; E – *E. coli*, B – *B. subtilis*, M – 100 bp DNA-Leiter (Bioron), NK – PCR-Negativkontrolle, F – Vorwärts-Primer, R – Rückwärts-Primer

Abb. 5 zeigt den ersten Testlauf der selbst entworfenen sowie recherchierten Primer mit genomischer *E. coli* bzw. *B. subtilis* DNA. Unter Verwendung der Primer E_FI + E_RI kommt es vermutlich aufgrund der zu langen Abfolge von Cytosin (CCCCC) im Rückwärts-Primer zu unspezifischen Bindungen (Heterodimer- oder Homodimerbildung) der Primer ohne eine effiziente Amplifikation. Es sind nur unspezifische Banden im Größenbereich <100 bp zu erkennen. Das Primerpaar B_FI + B_RI hingegen führt zu einem spezifischen Amplikon von 135 bp (siehe Tab. 1). Generell ist es üblich die ersten PCR-Läufe mit neuen Primern mithilfe einer Gelelektrophorese auszuwerten, da diese Methode klare Aussagen darüber zulässt, ob ein Primerpaar spezifisch die Ziel-DNA amplifiziert oder es ebenfalls zur Ausbildung von beispielsweise Primer-Artefakten kommt. Die Durchführung der Gelelektrophorese ist im Anhang (Abschnitt 7.1.1.3) beschrieben. Basierend auf der Gelauswertung fiel die Wahl auf die spezifischen Primer B_FI+B_RI für die Detektion von *B. subtilis* und E_FII+E_RII für *E. coli*. Die Zusammensetzung des Mastermixes sowie das Temperaturprofil für die etablierte SYBR Green PCR für die spezifischen PCR-Assays zur Detektion von *E. coli* bzw. *B. subtilis* sind im Anhang zu finden (siehe Abschnitt 7.1.1.1).

Die Produkte *AquaScreen Legionella species qPCR Detection Kit* bzw. *AquaScreen Legionella pneumophila qPCR Detection Kit* (Minerva Biolabs) wurden laut Herstellerangaben verwendet. Die Handbücher sind frei verfügbar und können von der *homepage* des Herstellers herunter geladen werden. Der Ansatz des *UniTOOL Resolight Assays* (Roche Diagnostics) erfolgte ebenfalls wie vom Hersteller empfohlen, aber aufgrund der Verwendung eines anderen PCR *cyclers* mit Abweichungen im Temperaturprofil. Das während dieser Arbeit verwendete Protokoll ist im Anhang (Abschnitt 7.1.1.2) zu finden.

4.1.1 Herstellung quantifizierter genomischer DNA-Standards

Nach Etablierung bzw. Auswahl der spezifischen Assays für *L. pneumophila*, *E. coli* und *B. subtilis* bzw. des Assays *UniTOOL* zur universellen Detektion von Bakterien war der nächste Schritt die Herstellung von quantitativen DNA-Standards.

Um im Rahmen folgender Arbeitspakete beispielsweise die Zellaufschlusseffizienz einer Methode quantitativ beurteilen zu können, ist es hilfreich, parallel zu den unbekannten PCR-Proben eine Verdünnungsreihe mit bekannter DNA-Konzentration des jeweiligen Testkeims amplifizieren zu lassen. Mithilfe der ermittelten Ct-Werte der Standardkurve/Verdünnungsreihe lassen sich die Genomkopiekonzentrationen der unbekannten Proben berechnen, so dass eine absolute Quantifizierung möglich wird.

Ein quantifizierter DNA-Standard ist für *Legionella pneumophila* in der Konzentration 1×10^6 GE/ μ l (Genomeinheiten pro μ l) bei Minerva Biolabs erhältlich. Auf dessen eigene Herstellung wurde daher verzichtet. Des Weiteren sind in dem universellen Kit *UniTOOL Resolight* quantifizierte Plasmid-DNA-Standards für grampositive bzw. gramnegative Bakterien enthalten. Im Gegensatz zu genomischer DNA enthält ein Plasmid nur eine Kopie des jeweiligen Zielgens. Die im Kit enthaltenen Standards weisen jeweils eine Konzentration von 1×10^3 Plasmidkopien/ μ l auf. Laut Herstellerangaben entsprechen etwa 100 Plasmide einer Genomeinheit.

Für die Erstellung der quantifizierten genomischen DNA-Standards von *E. coli* und *B. subtilis* wurden zuerst Vorkulturen beider Spezies angesetzt. Zur Herstellung von Vorkulturen wurden 10 ml CASO-Bouillon (30 g/l CASO von Merck in RO-H₂O, autoklaviert) mit zwei Kryokügelchen des jeweiligen Bakteriums inokuliert und bei 37 °C für mindestens 24 Stunden inkubiert. Diese Kulturen wurden maximal eine Woche aufbewahrt und für Versuche oder weitere Bakterienanzuchten als Vorkultur genutzt. Im nächsten Schritt zur Herstellung von DNA-Standards wurde je eine Über-Nacht-Kultur mit 1/100 Volumen einer Vorkultur in CASO-Bouillon angesetzt und über Nacht inkubiert, anschließend bei 1.500 x g pelletiert und in 2,8 ml Lysepuffer (*E. coli*: Puffer T1 Macherey-Nagel; *B. subtilis*: 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, pH 8, 20 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C, die für die enzymatische Aktivität des Lysozyms notwendig ist. Nach Zugabe von 200 μ l Proteinase K wurden die Reaktionsansätze 3 h bei 56 °C inkubiert. Danach wurde die genomische DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (Sambrook & Russell 2000) gereinigt und unter Verwendung eines Spektralphotometers die DNA-Konzentration ermittelt. Zur Berechnung der Genomkopienzahl wurde folgende Gleichung verwendet:

$$c \left[\frac{\text{Kopien}}{l} \right] = \frac{\text{DNA-Konzentration} \left[\frac{g}{l} \right] \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \left[\frac{1}{mol} \right]}{\text{Produktgröße} \left[\frac{bp}{\text{Kopie}} \right] \cdot 660 \left[\frac{g}{mol} \cdot bp \right]}$$

$6,022 \cdot 10^{23}$ pro mol entspricht der Avogadro-Konstante. Für diese Gleichung wurde eine Molekülmasse von 660 Dalton pro Basenpaar angenommen, was einer molaren Masse von 660 g pro mol entspricht (McMaster & Carmichael 1977).

Für *E. coli* und *B. subtilis* wurden folgende Konzentrationen ermittelt:

E. coli: $E_{260} = 0,529$ ($E = 1$ bei 50 µg/ml) $c = 26,45$ µg/ml $5,19 \times 10^6$ GE/µl

B. sub.: $E_{260} = 0,319$ ($E = 1$ bei 50 µg/ml) $c = 15,95$ µg/ml $3,47 \cdot 10^6$ GE/µl

Die quantifizierte DNA wurde mit 10 mM Tris-Puffer auf 1×10^6 GE/µl verdünnt und danach in Aliquots bei -20 °C gelagert, um mehrfaches Einfrieren und Auftauen zu vermeiden.

4.2 Membranfiltration und die vollständige Überführung der zurückgehaltenen Mikroorganismen in ein Reaktionsgefäß

Wie ist es möglich, die auf bzw. in der Membranstruktur zurückgehaltenen Mikroorganismen vollständig in ein Standard 1,5 bzw. 2 ml Reaktionsgefäß zu überführen, so dass im Anschluss gängige Methoden für den Zellaufschluss und die DNA-Isolierung angewendet werden können? Diese Fragestellung stellt das Hauptproblem dar, das in Kapitel 4.2 analysiert und diskutiert werden sollte.

4.2.1 Untersuchungen zum Elutions-/Abspülverhalten, der in der Membranstruktur zurückgehaltenen Mikroorganismen

Nach Entwicklung bzw. Auswahl geeigneter Assays sollte die Frage geklärt werden, inwieweit eine quantitativ vollständige Wiederfindung von Mikroorganismen durch Rückspülung nach erfolgter Membranfiltration möglich ist.

4.2.1.1 Überprüfung der Elutionseffizienz mittels Rasterelektronenmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und qPCR

Zur Beurteilung der Elutionseffizienz von Membranen wurden drei verschiedene Methoden etabliert, wobei stets mit eigenhändig assemblierten Vivacon 500 Einheiten (siehe Abb. 6) gearbeitet wurde, die den Filtrationsschritt mithilfe einer Zentrifugation und die Elution

mithilfe eines reversen Zentrifugationsschrittes (siehe Abb. 6 rechts, *reverse spinning*) simulieren sollten.

Methode I: Überprüfung der Elutionseffizienz mit Rasterelektronenmikroskopie.

Methode II: DNA-Extraktion der eluierten Bakterien und Quantifizierung mit qPCR.

Methode III: Anfärben der Bakterien mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 auf der Membran und quantitativer Vergleich zwischen Proben mit und ohne Elutionsschritt mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie.



Abb. 6: Vivacon 500 Einheiten zur Simulation von Filtrations- und Elutionsschritt (Sartorius Stedim Biotech GmbH 2012)

Vivacon 500 sind Zentrifugalkonzentratoren für die Konzentrierung von DNA, die normalerweise mit Hydrosart-Membranen ausgestattet sind, für diese Versuche aber mit verschiedenen Membrantypen bestückt wurden. Methode I wurde mit *E. coli* als gramnegatives Bakterium und mit *B. subtilis* als grampositiven Vertreter durchgeführt. Zusätzlich kam eine *B. subtilis* Sporenlösung zum Einsatz, da sich Sporen sowohl durch ihre geringere Größe als auch durch ihre Oberflächenbeschaffenheit von vegetativen Zellen erheblich unterscheiden können (Madigan et al. 2003). Für Methode II und III wurde ausschließlich das Bakterium *E. coli* verwendet, da es der wichtigste bakterielle Modellorganismus ist und bereits sehr effiziente Protokolle sowohl für die DNA-Extraktion als auch für die Fluoreszenzfärbung der Zellen existieren.

Es wurde stets eine für die jeweilige Methode geeignete Verdünnung einer Vorkultur oder einer Über-Nacht-Kultur in DNA-freiem Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) hergestellt, um die Vivacon 500 Einheiten anschließend mit dieser Lösung zu beaufschlagen.

Inwieweit unter Verwendung der Vivacon 500 Einheiten der Filtrationsschritt der Membranfiltrationsmethode mithilfe einer Zentrifugation simuliert werden kann, soll die folgende vereinfachte mathematische Betrachtung klären. Im Idealfall, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, sollte während der Vakuumfiltration und während der Zentrifugation die gleiche Kraft auf die Mikroorganismen wirken, damit diese ähnlich tief bzw. fest in die Membranstruktur gedrückt werden. Während einer Standard-Vakuumfiltration wirken folgende Kräfte (F in Newton [N]) auf die in der Probe enthaltenen Mikroorganismen:

$$F = p \cdot A = 3,9 \cdot 10^{-8} \text{ N.}$$

Der Druck p entspricht in diesem Fall der während der Vakuumfiltration aufgebauten Druckdifferenz von beispielsweise $\Delta p = 0,5 \text{ bar} = 50.000 \text{ kg}/(\text{m} \cdot \text{s}^2)$. Die Druckdifferenz kann abhängig von der verwendeten Vorrichtung sogar Werte $> 0,9 \text{ bar}$ annehmen. Als Fläche A wird die *E. coli* Zelle als ideale Kreisfläche mit $7,9 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$ angenommen.

Die auf die *E. coli* Zellen wirkende Zentrifugalkraft F_z berechnet sich wie folgt:

$$F_z = m \cdot \omega^2 \cdot r = 1,3 \cdot 10^{-6} \text{ N.}$$

Die für diese Gleichung verwendeten Werte sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Verwendete Gleichungen und Werte zur Berechnung der Zentrifugalkraft, die auf eine *E. coli* Zelle wirkt

Größe	Wert und Einheit
m (Masse Wassersäule + <i>E. coli</i>)	$8 \cdot 10^{-12} \text{ kg}$
Zu filtrierendes Volumen V	$2 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3$
Membranfläche A	$2 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$
Höhe der Wassersäule h ($h = V / A$)	$1 \cdot 10^{-2} \text{ m}$
Masse Wassersäule M ($M = V \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}}$) mit $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1.000 \text{ kg}/\text{m}^3$	$8 \cdot 10^{-12} \text{ kg}$
mit $V = h_{\text{Wassersäule}} \cdot A_{\text{E. coli Kreisfläche}}$ Masse einer <i>E. coli</i> Zelle	$1 \cdot 10^{-15} \text{ kg}$
r (Rotationsradius)	$0,075 \text{ m}$
w (Winkelgeschwindigkeit)	$1466,1 \text{ 1/s}$

Zur Vereinfachung der Berechnung wurde angenommen, dass die kreisrunde *E. coli* Zelle auf der Membranoberfläche liegt, und sich das gesamte zu filtrierende Volumen oberhalb der Membranfläche befindet, und auf dem Mikroorganismus lastet.

Anhand dieser Berechnungen wurde ermittelt, dass unter Verwendung der Zentrifugation 33mal höhere Kräfte auf dem einzelnen Mikroorganismus zu Beginn des Prozesses lasten als bei der Filtrationsmethode:

$$F_{\text{Zentrifugation}} / F_{\text{Filtration}} = 1,3 \cdot 10^{-6} \text{ N} / 3,9 \cdot 10^{-8} \text{ N} \approx 33.$$

Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich Mikroorganismen nach erfolgter Vakuumfiltration leichter von einem Membranfilter eluieren/abspülen lassen als nach einem Zentrifugationsschritt. Allerdings wurden diese Werte unter Verwendung der maximalen Zentrifugengeschwindigkeit der hier verwendeten Mikrozentrifuge von 14.000 upm (Umdrehungen pro Minute) ermittelt. Durch die Wahl eines niedrigeren upm-Wertes kann die Zentrifugationskraft relativ einfach auf den Wert der Vakuumfiltration angepasst werden. Dieses Zentrifugenmodell muss den Berechnungen nach mit 2.500 upm betrieben werden, damit $F_{\text{Zentrifugation}} = 4,1 \cdot 10^{-8} \text{ N}$ beträgt und somit nah an dem Wert von $F_{\text{Filtration}} = 3,9 \cdot 10^{-8} \text{ N}$ liegt. Es muss auch angemerkt werden, dass die vereinfachte Annahme, die der Berechnung zugrunde liegt, nicht berücksichtigt, dass die realen Abläufe eigentlich Dichte- bzw. Masseabhängige Prozesse sind, die sich mit dem Flüssigkeitsstand ändern.

In der Literatur findet man maximale Wiederfindungswerte durch Abspülen von Membranfiltern von 66 % unter Verwendung von 0,2 µm Nuclepore Polycarbonat-Membranen von Whatman (Smith et al. 1992). In den folgenden Versuchsreihen soll überprüft werden, ob diese Werte bestätigt werden können.

Methode I: Überprüfung der Elutionseffizienz mit Rasterelektronenmikroskopie

Um das Größenverhältnis zwischen Mikroorganismus und Membranpore unter Betrachtung verschiedener Membrantypen und Mikroorganismen besser abschätzen zu können, kam die Rasterelektronenmikroskopie zum Einsatz. Es wurden die in Abb. 7 und Abb. 8 aufgeführten bakteriellen Spezies und Membrantypen getestet. In einem ersten Schritt wurden Membranzlinge hergestellt und diese in Vivacon 500 Einheiten assembliert und mit einem O-Ring abgedichtet. Anschließend wurden entweder 500 µl einer 1:10 verdünnten Vorkultur der vegetativen *E. coli* bzw. *B. subtilis* Zellen oder 500 µl einer unverdünnten Sporensuspension (*B. subtilis* Sporensuspension 1×10^7 KBE/ml, Merck Millipore) auf die Membranoberseite der Vivacon 500 Einheiten pipettiert. Es folgte ein einminütiger Zentrifugationsschritt bei 2.500 upm, der eine Standard-Membranfiltration simulieren sollte. Im Anschluss wurden die

Einheiten zerlegt und die Membranstanzlinge etwa 7 min auf Zellstoff im 50 °C-Trockenschrank getrocknet. Die trockenen Membranen wurden dann auf Probentellern fixiert und mit Gold bespattert, um eine elektrisch leitende Oberfläche für die Rasterelektronenmikroskopie zu schaffen. Die mikroskopische Auswertung erfolgte bei 15.000facher Vergrößerung im Hochvakuum. In Abb. 7 und Abb. 8 ist zu erkennen, dass nur unter Verwendung der Polycarbonat-Membranen, 0,2 und 0,4 µm, eine vollständige Oberflächenabscheidung der Bakterien vorliegt. Die drei anderen Membrantypen, sowohl 0,45 als auch 0,2 µm, erlauben ein Eindringen der Mikroorganismen in die Membranstruktur aufgrund der breiten Porengrößenstreuung. Es sind im Oberflächenbereich zahlreiche Poren zu erkennen, deren Durchmesser deutlich die Größe der verwendeten Modellorganismen übersteigt, was ein Vordringen in tiefere Membranschichten erlaubt und somit ein quantitativ vollständiges Abspülen der Zellen von der Membran deutlich erschwert oder sogar nicht realisierbar macht. Auffällig ist, dass das eigentlich stäbchenförmige Bakterium *E. coli* in beiden Abbildungen (Abb. 7 und Abb. 8) eine kugelförmige Gestalt einnimmt. Dies ist nicht ungewöhnlich, wenn sich die Umweltbedingungen drastisch verschlechtern und die Vermehrung eingestellt wird (Hemschemeier, S. K. 2013). Die Zellgeometrie von *E. coli* deutet demnach daraufhin, dass die Wachstumsphase in der Vorkultur beendet war und die Kultur in die stationäre oder bereits in die Absterbephase übergegangen ist.

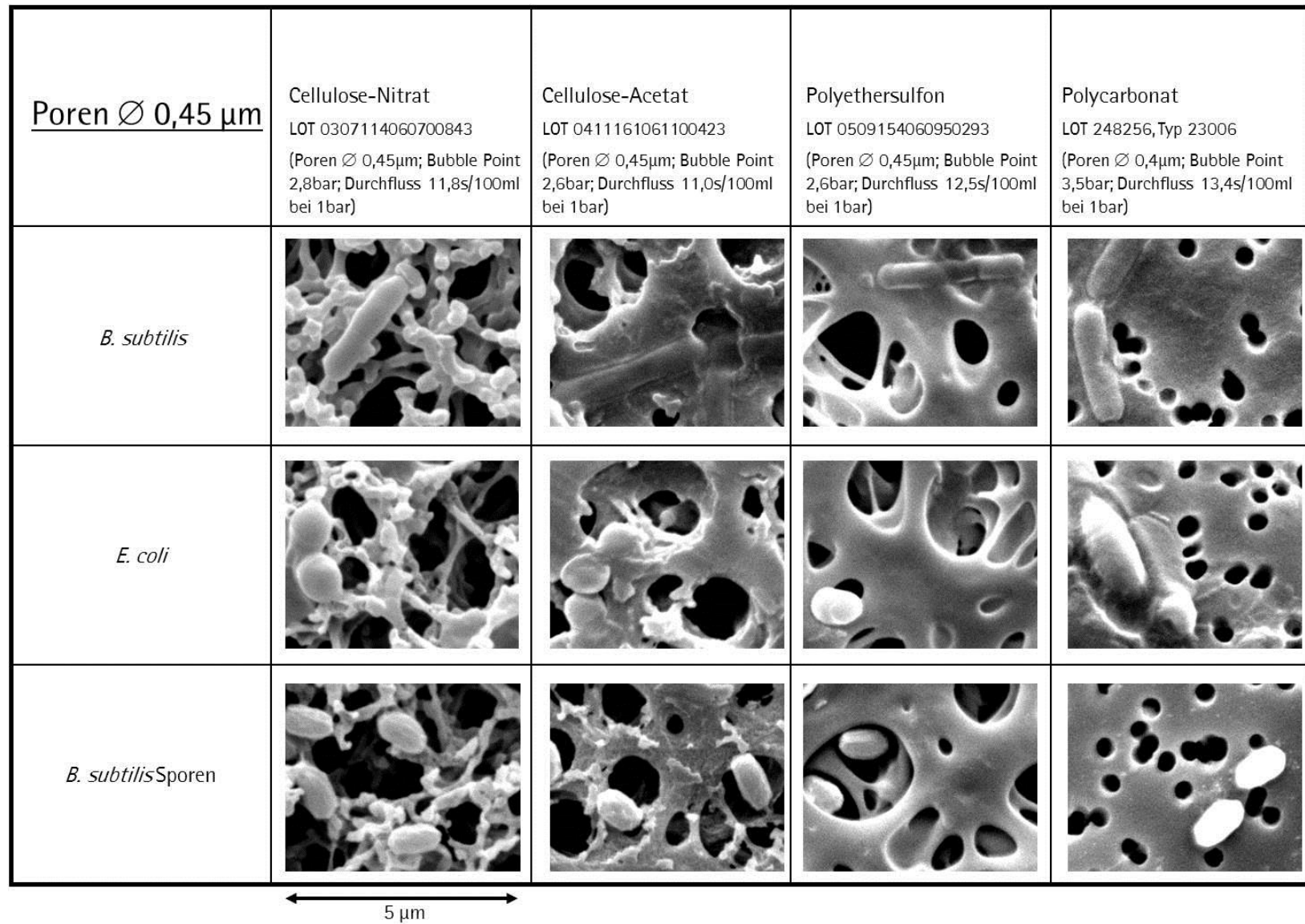


Abb. 7: REM-Aufnahmen, 15.000fach vergrößert; Bakterien auf verschiedenen Membrantypen mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,45 µm, mit Gold besputtert

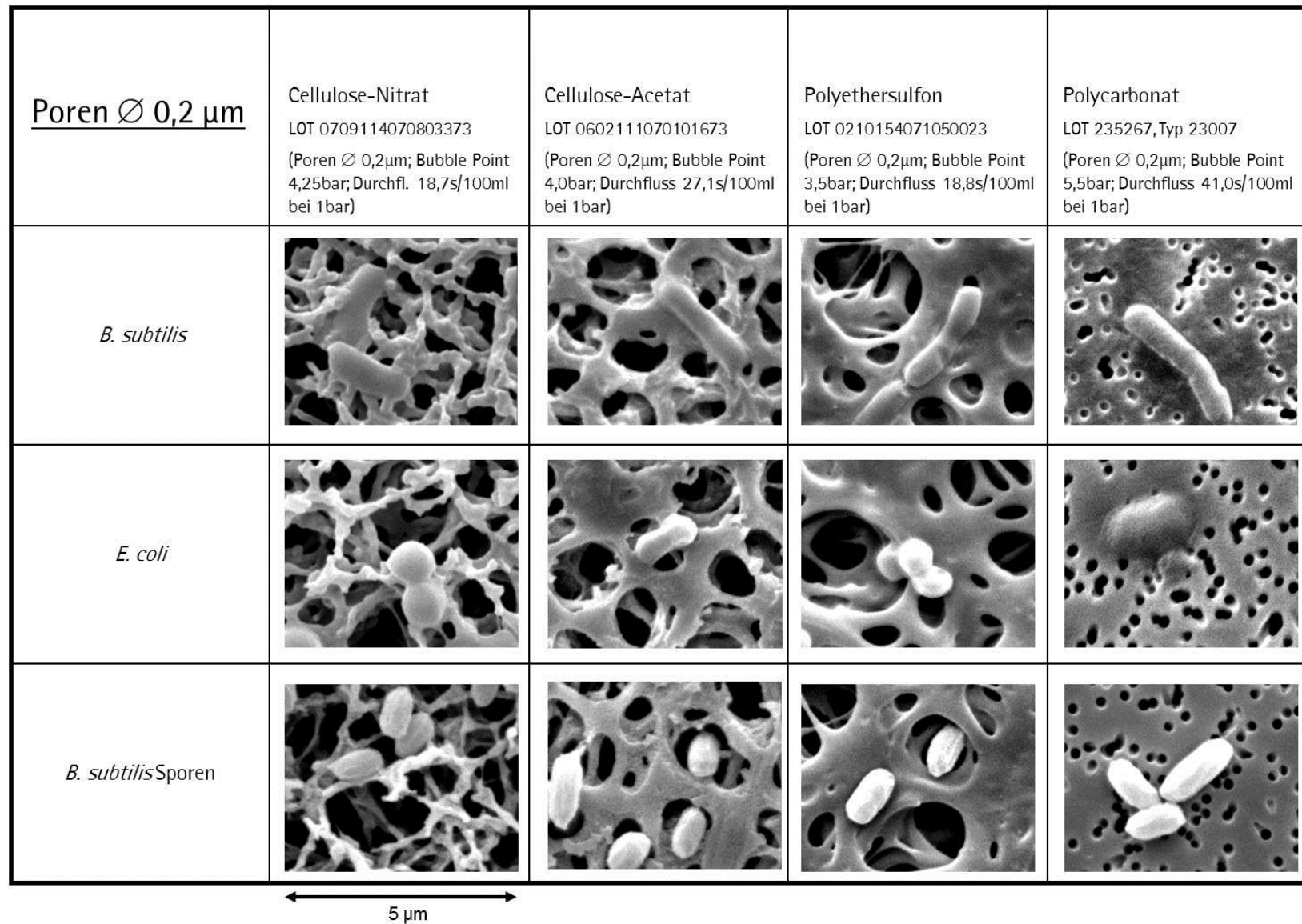


Abb. 8: REM-Aufnahmen, 15.000fach vergrößert; Bakterien auf verschiedenen Membrantypen mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,2 µm, mit Gold bespartet

Methode II: DNA-Extraktion der eluierten Bakterien und Quantifizierung mit qPCR

Anhand der durch Methode I generierten Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass ein quantitativ vollständiges Abspülen von den Membrantypen Zellulosenitrat, Zelluloseacetat und Polyethersulfon nicht möglich ist, da Mikroorganismen während der Filtration auch in tiefere Membranschichten vordringen. Diese Hypothese wurde anschließend mithilfe von *realtime* PCR-Ergebnissen untermauert.

Hierfür wurden analog zu Methode I Membranstanzlinge aus den Materialien Zellulosenitrat, Zelluloseacetat, Polyethersulfon und Polycarbonat mit den Porengrößen 0,2 µm und 0,45 µm hergestellt und diese in Vivacon 500 Einheiten eingebaut. Zur Auswahl der Porengrößen ist anzumerken, dass Porengrößen < 0,2 µm für die Filtration von größeren Probenvolumina bzw. trüben Proben mit hoher Partikelkonzentration aufgrund von zu langen Filtrationszeiten keinen Sinn machen und Porengrößen > 0,45 µm hingegen keine ausreichende Rückhaltung der Mikroorganismen gewährleisten. Die assemblierten Vivacon 500 Einheiten wurden mit 100 µl einer in Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) verdünnten Über-Nacht-Kultur (Verdünnung 1:10 bis 1:1.000) beladen und eine Minute bei 2.500 upm zentrifugiert. Nach dem Umstecken der Einsätze in neue Auffanggefäße erfolgte ein einminütiger reverser Zentrifugationsschritt bei 10.000 upm unter Verwendung von 100 µl Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius), um die *E. coli* Zellen von der Membran herunter zu spülen und im neuen Auffanggefäß zu sammeln. Im Anschluss erfolgte die DNA-Extraktion mithilfe des Macherey-Nagel Kits NucleoSpin Tissue laut Handbuch nach dem Protokoll für Bakterien. Das Kit-Handbuch kann auf der *homepage* des Herstellers herunter geladen werden. Um bei der Auswertung die prozentuale Wiederfindung der Zellen bestimmen zu können, wurden parallel stets drei 100 %-Kontrollen während der DNA-Extraktion mitgeführt. Hierfür wurden immer 100 µl der verdünnten Ausgangsprobe direkt in die DNA-Extraktion eingesetzt. Die *realtime* PCR wurde wie in Tab. 15 und Tab. 16 in Abschnitt 7.1.1.1 beschrieben unter Verwendung des Primerpaares E_FII und E_RII angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. Da während der Auswertung festgestellt wurde, dass zwischen den Ergebnissen von Proben verschiedener Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1.000 verdünnt) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich prozentualer Wiederfindung erkennbar sind, wurden die Ergebnisse der drei Verdünnungsstufen in Abb. 9 zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst dargestellt. Es lässt sich der Trend erkennen, dass zum einen Polyethersulfon, das eine sehr geringe unspezifische Adsorption aufweist und zum anderen Polycarbonat, welches als einziger Membrantyp eine Oberflächenabscheidung der Bakterien ermöglicht, geringfügig bessere Wiederfindungswerte aufweisen als die anderen

Membrantypen. Die unspezifische Adsorption der verwendeten Zellulosenitrat-Membranen liegt bei etwa 125 μg γ -Globulin pro cm^2 Membranfläche. Bei Zelluloseacetat sind es etwa 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, ermittelt unter Verwendung von Bovine Serum Albumin (BSA). Polyethersulfon weist Werte von etwa 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für γ -Globulin und $< 8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für BSA auf. Polycarbonat zeigt mit $< 5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für BSA die geringste unspezifische Adsorption. (Sartorius Stedim Biotech GmbH 2010)

Allein unter Berücksichtigung dieser Adsorptionswerte ergibt sich folgendes Ranking in Bezug auf Zellwiederfindung: Polycarbonat $>$ Polyethersulfon $>$ Zelluloseacetat $>$ Zellulosenitrat. Dieser Trend lässt sich ansatzweise auch in den dargestellten Ergebnissen erkennen. Die teilweise erheblichen Standardabweichungen von bis zu 14 % sind vermutlich ein Resultat der Varianz der DNA-Extraktion, da auch die 100 %-Kontrollen eine hohe Standardabweichung aufweisen. Als Fazit dieser Versuchsreihe kann zusammengefasst werden, dass stets mindestens 30 bis 40 % der Mikroorganismen nach einem Spülschritt der Membran noch auf bzw. in der Membranstruktur verbleiben. Somit kann die auf Basis der REM-Daten aufgestellte Hypothese, dass ein quantitativ vollständiges Abspülen von den Membrantypen Zellulosenitrat, Zelluloseacetat und Polyethersulfon nicht möglich ist, vorerst bestätigt werden. Ergänzt werden muss an dieser Stelle, dass auch unter Verwendung von Polycarbonat-Membranen, wo die Bakterien nur auf der Oberfläche zurückgehalten werden, keine quantitative Wiederfindung erzielt werden kann. Es wird daher vermutet, dass zusätzlich zu den sterischen Ursachen auch adsorptive Effekte eine Rolle spielen. Diese Annahme soll im Folgenden mithilfe einer dritten Methode verifiziert werden.

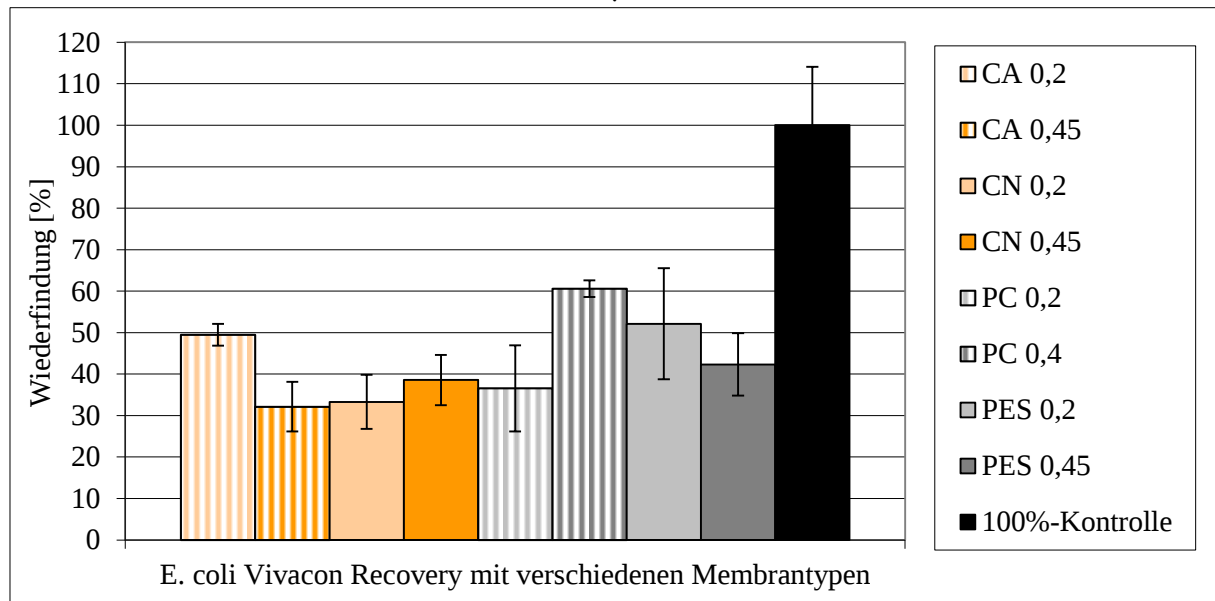


Abb. 9: 100 µl verdünnte *E. coli*-Kultur in Vivacon 500 → reverser Spülschritt mit 100 µl H₂O, n > 6; 100 %-Kontrolle: DNA extrahiert aus 100 µl Probe, n = 3, CA – Zelluloseacetat, CN – Zellulosenitrat, PC – Polycarbonat, PES – Polyethersulfon

Methode III: Mikroorganismen mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 auf der Membran färben und mittels Fluoreszenzmikroskopie quantitativer Vergleich zwischen Proben mit und ohne Elutionsschritt

SYTO9 ist ein DNA-Interkalator, der aufgrund seiner Größe und neutralen Ladung sowohl in lebende als auch in tote bzw. beschädigte Zellen eindringen kann und somit die Gesamtheit aller Zellen erfasst. Für diese Methode kamen ausschließlich Vivacon 500 Einheiten mit schwarzen Polycarbonat-Membranen (Cyclopore von Whatman) zum Einsatz. Dieser Membrantyp weist die geringste Hintergrundfluoreszenz auf und ist somit bestens für Fluoreszenzmikroskopie geeignet. Des Weiteren werden die Mikroorganismen unter Verwendung dieses Membrantyps ausschließlich auf der Oberfläche abgeschieden, was ein quantitatives Auswerten ermöglicht und Aussagen hinsichtlich adsorptiver Effekte zulässt.

Es wurden 500 µl einer in H₂O 1:1.000 verdünnten Über-Nacht-Kultur von *E. coli* auf die Membran der Vivacon 500 Einheiten pipettiert und eine Minute bei 2.500 upm zentrifugiert. Dann wurde mit der Hälfte der Proben sofort ein reverser Spülschritt mit entweder 100 µl Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) oder 100 µl 6M Guanidinhydrochlorid, einem gängigen Zellyse-Reagenz, bei 10.000 upm für eine Minute durchgeführt. Guanidinhydrochlorid ist unter anderem dazu in Lage, Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und so ggf. die Elutionseffizienz zu verbessern. Die Versuchsreihe wurde auch durch zwei hintereinander geschaltete Elutionsschritte ergänzt, um so ggf. eine Verbesserung der

Wiederfindung zu erreichen. Im nächsten Schritt wurden sämtliche Auffanggefäße gegen unbenutzte ausgetauscht und 200 µl verdünnte SYTO9-Lösung (1,5 µl 3,34 mM SYTO9 mit Reinstwasser, Arium Pro VF System von Sartorius, auf 1 ml aufgefüllt) auf jede Membranoberseite der Vivacon 500 Einheiten pipettiert. Es folgte ein 30minütiger Inkubationsschritt bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 2.500 upm für eine Minute. Bestimmte Ausschnitte der demontierten Membranstanzlinge wurden dann bei 40facher Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop (BX51, Olympus) mithilfe einer Schwarz-Weiß-Kamera (AxioCam MRN, Carl Zeiss) fotografiert und nach Schwarz-Weiß-Konvertierung mit dem Programm ImageJ die Fläche der schwarzen Pixel, was der Fläche der gefärbten Zellen entspricht, mit und ohne reverser Spülung quantitativ verglichen (siehe Abb. 10). Die Histogrammauswertung der mit ImageJ konvertierten Bilder führte zu dem Ergebnis, dass $29 \pm 12 \%$ ($n = 20$) der Zellen auch nach einem reversen Spülschritt auf der Membran verbleiben. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob die Membran einfach oder doppelt gespült wird und ob Wasser oder Guanidinhydrochlorid zur Elution zum Einsatz kommt. Während dieser Versuchsreihe wurden jeweils 20 Proben mit und ohne Elutionsschritt prozessiert. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, ist der Filtrationsfluss bzw. Spülfluss auf die ausgesparten Dreiecke der Vivacon 500 Einheiten begrenzt. Daher wurde die Auswertung nur auf diese Ausschnitte beschränkt. Der ermittelte Wert der auf der Membran verbleibenden Zellen von $29 \pm 12 \%$, zeigt auch eine Korrelation mit den Ergebnissen der *realtime* PCR (Methode II), wo maximale Wiederfindungen zwischen 60 und 70 % ermittelt wurden, was einen Verbleib von Zellen auf der Membran von 30 bis 40 % impliziert.

Es ist allerdings anzunehmen, dass der tatsächliche prozentuale Wert der auf der Membran verbliebenen Zellen bei dieser Methode geringfügig niedriger liegt. Ursache hierfür ist die verwendete optische Analyse-Methode, die keine übereinander liegenden Zellen erfasst. Diese traten vermutlich zu einem größeren Anteil bei den Proben ohne reversen Spülschritt auf, so dass die absolute Zellzahl der Proben ohne reverse Zentrifugation und somit die 100 %-Kontrolle stets etwas zu niedrig lag. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass der reale prozentuale Wert der nach dem Spülschritt aufgrund adsorptiver Effekte auf der Membran verbleibenden Zellen geringfügig niedriger ausfallen müsste als $29 \pm 12 \%$. Basierend auf diesem Ergebnis kann daher die im vorherigen Abschnitt aufgestellte Hypothese bestätigt werden, dass zusätzlich zu den sterischen Ursachen auch adsorptive Effekte eine Ursache für die schlechte Wiederfindung sind.

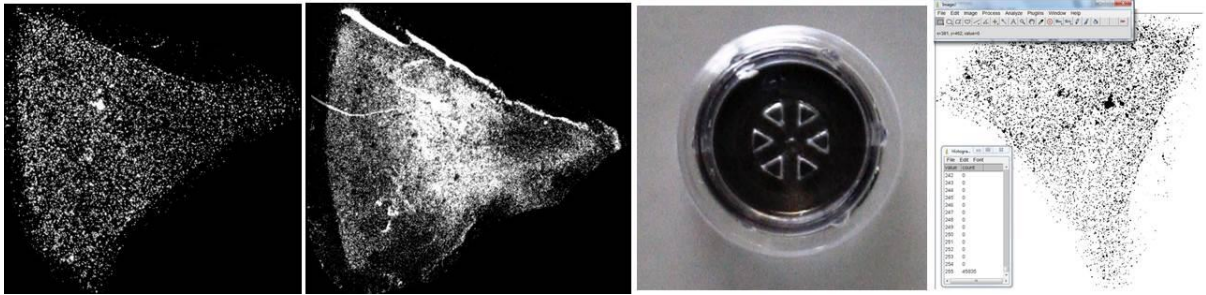


Abb. 10: Mit SYTO9 gefärbte Zellen mit bzw. ohne reversen Spülschritt; Vivacon 500 Einheit von unten hinein fotografiert; mit der Software ImageJ invertiertes Schwarz-Weiß-Bild für die quantitative Auswertung

4.2.1.2 Einfluss von Ultraschall auf die Elutionseffizienz von Mikroorganismen

Ein Ansatz, die Zellwiederfindung von Membranfiltern zu verbessern, stellt der Einsatz von Ultraschall dar. Die Abreinigungswirkung von Ultraschall beruht auf verschiedenen Mechanismen, die entweder auf Kavitation oder auf Ultraschallwellen basieren, wobei die durch Kavitation hervorgerufenen Effekte eine deutlich größere Wirkung zeigen. Ultraschallwellen tragen durch Schallwechseldrücke und durch die durch Oszillation verursachte Durchmischung des Mediums zur Abreinigung von Partikeln bei. Stoßwellen und Flüssigkeitsjets sollen hier nur beispielhaft als mögliche Resultate von Kavitation genannt werden, wobei der Flüssigkeitsjet mit seinem hohen Druck vermutlich die stärkste abreinigende Wirkung mit sich bringt. (Kahlen 2012)

Bevor der ggf. positive Einfluss von Ultraschall auf die Elutionseffizienz von Mikroorganismen von Membranfiltern näher analysiert wurde, sollte sichergestellt werden, dass Ultraschall keinen negativen Nebeneffekt auf die anschließende Analyse mittels PCR hat. Ultraschall wird unter anderem als Probenvorbereitungsmethode für die Pyrosequenzierung verwendet, um die DNA im Vorfeld der Sequenzierung zu fragmentieren. Auch wurden bereits häufig die vermuteten Zerstörungsmechanismen publiziert, die bei einer Ultraschallbehandlung einer DNA-Lösung wirken (Elsner & Lindblad 1989; Rageh et al. 2009). Basierend auf dieser Kenntnis sollte gezeigt werden, wie stark Ultraschall genomische DNA fragmentiert und ob diese DNA noch für eine PCR-Analyse geeignet ist und identische Ergebnisse liefert wie unbehandelte DNA.

Im Rahmen der Versuche wurde hochmolekulare genomische DNA (gDNA) der Firma Bioline in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und versucht, mithilfe von Ultraschall bzw. mit Auf- und Ab-Pipettieren die DNA zu fragmentieren. Der Versuch, die DNA mittels Auf- und Abpipettieren zu scheren, wurde parallel durchgeführt, um einen Eindruck über die Stabilität von gDNA zu bekommen und existierende Vorurteile zu be- oder widerlegen, dass gDNA

bereits durch extensives Pipettieren erheblichen Schaden nimmt. 100 ng gDNA (20 ng/µl) wurden nach mechanischer Beanspruchung, wie in Abb. 11 aufgeführt, pro Spur im Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese ist im Anhang (Abschnitt 7.1.1.3) beschrieben. In Abb. 11 ist ersichtlich, dass 0,5 bis 1 min Pipettieren keinen erkennbaren Effekt auf die DNA hat, jedoch Ultraschall zur Fragmentierung der DNA führt. Je länger die Beschallung, desto kleiner ist der Großteil der generierten DNA-Fragmente und desto weniger hochmolekulare DNA ist nachweisbar. Pro Probe wurden jeweils zwei Replikate prozessiert.

Gleiche Beschallungsbedingungen mit einer Dauer von 2 min wurden ebenfalls für eine Verdünnungsreihe mit quantifizierter *Legionella pneumophila* DNA gewählt und im Vergleich zu unbeschallter DNA mittels *realtime* PCR analysiert (*OnarLp realtime PCR* Kit). Es wurde keine Verschiebung der Ct-Werte (*threshold cycle*, Schwellenwert-Zyklus) festgestellt (siehe Abb. 12), so dass Ultraschall im Rahmen der Probenvorbereitung zur Unterstützung der Elutionseffizienz durchaus Einsatz finden kann. Generell kommen bei *realtime* PCR-Reaktionen relativ kurze Amplikons zum Einsatz, meist < 200 bp, so dass selbst fragmentierte DNA problemlos amplifiziert werden kann.

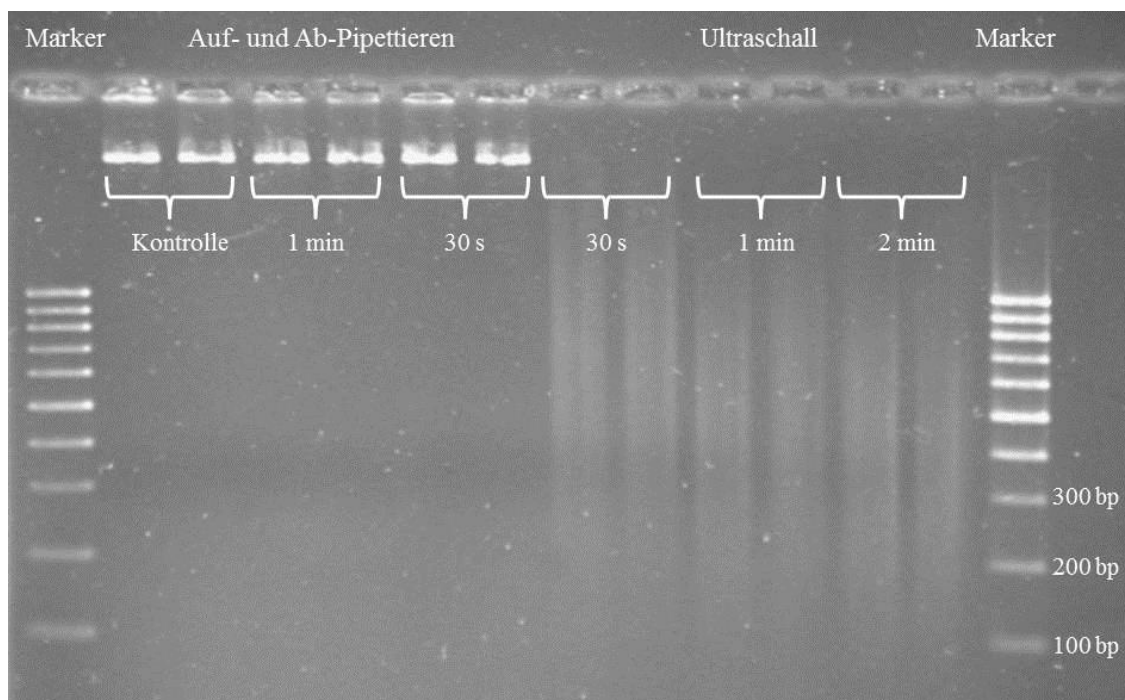


Abb. 11: 100 ng gDNA (Bioline) pro Spur (20 ng/µl); Ultraschall-Gerät: Vibra Cell 5020 AT 50 Watt 20 kHz Amplitude 400 (Hersteller: Sonics)

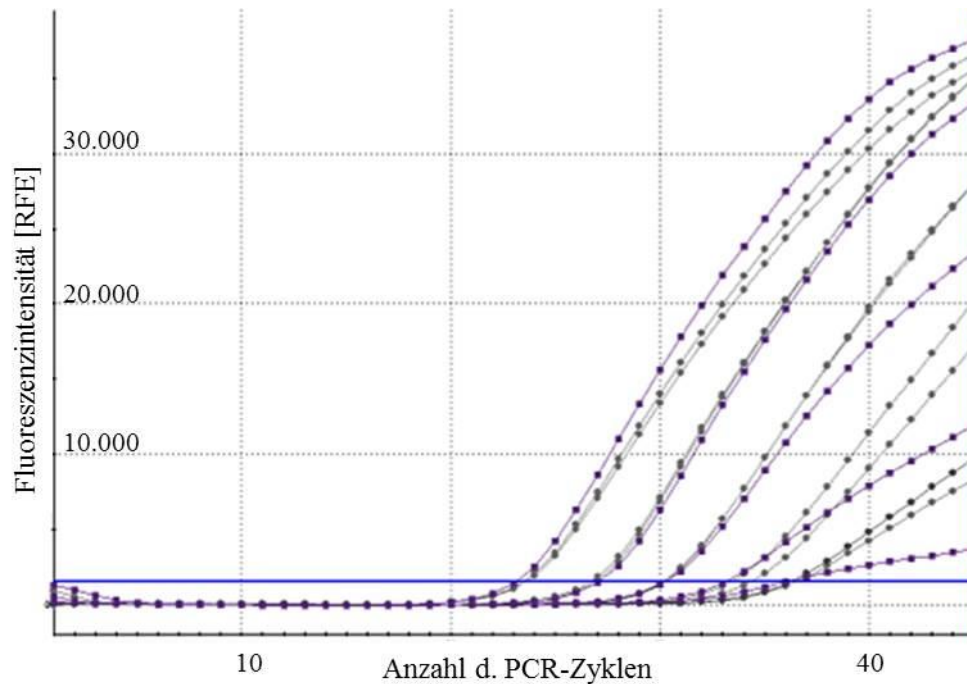


Abb. 12: Amplifikationskurven; Lila: ohne Ultraschallbehandlung; Grau: mit Ultraschallbehandlung; 2 min 20 kHz Sonics-Sonde; Probenmaterial: Verdünnungsreihe genomischer *L. pneumophila* DNA

Nachdem unter Verwendung des *realtime* PCR Kits *OnarLp* gezeigt wurde, dass Ultraschall keinen Einfluss auf dieses Assay hat und somit vermutlich auch keinen Einfluss auf Assays mit ähnlichen Amplikonlängen zeigt, galt es im nächsten Schritt, wenn möglich, das Abspülen von Mikroorganismen von Membranen mithilfe von Ultraschall zu verbessern.

Es wurde eine hochfrequente 40 kHz Ultraschallsonde von Sonics eingesetzt, da für Reinigungsprozesse mittels Ultraschall gilt, dass je höher die Schallfrequenz, desto kleiner sind die Partikel, die von einer Oberfläche mithilfe von Ultraschall abgelöst werden können (Lauterborn 2012). Da es sich bei Bakterien um Partikel im Mikrometermaßstab handelt, sprach dies direkt für den Einsatz einer hochfrequenten Sonde.

Es wurden 1,5 ml 6 M Guanidinhydrochlorid in eine Petrischale mit 5 cm Durchmesser pipettiert und der Membranfilter mit den zurückgehaltenen Mikroorganismen mit der Filtrationsfläche nach unten ebenfalls in die Schale überführt. Anschließend wurde der Sondenkopf, eine kreisrunde Fläche mit einem Durchmesser von 24 mm, auf die Flüssigkeitsbedeckte Außenunterseite der Petrischale angedrückt (siehe Abb. 13) und im Anschluss die eluierten Mikroorganismen samt Lysepuffer in ein Reaktionsgefäß überführt. Darin wurde zunächst der Zellaufschluss durchgeführt, gefolgt von einer Silicamembran-basierten DNA-Extraktion von Macherey-Nagel (NucleoSpin Tissue, Handbuch *online* verfügbar). Die Beschallung erfolgte über eine Dauer von einer Minute. Eine längere Beschallungszeit wäre bei einem hohen Probendurchsatz nicht praktikabel, da jede Probe einzeln prozessiert werden

muss und zusätzlich das Gerät eine hohe Geräuschbelastung mit sich bringt. Als Probenmaterial kam eine verdünnte *E. coli* Kultur zum Einsatz aufgrund der gut etablierten DNA-Extraktionsmethoden mit hoher Extraktionseffizienz für vor allem gramnegative Keime. Nach erfolgter Probenfiltration wurden die Membranfilter entweder mit oder ohne Ultraschallbehandlung (jeweils $n = 8$) wie beschrieben weiter prozessiert und mittels *realtime* PCR analysiert, um den direkten Vergleich mit/ohne Ultraschall zu haben.



Abb. 13: Versuchsaufbau: Ultraschallsonde, Petrischale mit 6 M Guanidinhydrochlorid und 0,45 μm Polyethersulfon-Membran mit zurückgehaltenen *E. coli* Zellen

Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Der mittlere Ct-Wert der Ultraschall-behandelten Proben liegt 0,6 Ct-Einheiten niedriger als der Mittelwert der Proben ohne Einsatz von Ultraschall. Da man im Idealfall von einer Amplikonverdopplung pro PCR-Zyklus ausgeht, ergibt sich somit ein Faktor von $2^{(0,6)}=1,5$. Das bedeutet, dass die Unterstützung einer 40 kHz Sonde beim Abspülen der Zellen vom Membranfilter letztendlich zu einer um den Faktor 1,5 höheren DNA-Ausbeute geführt hat, was einer geringen Verbesserung entspricht. Aufgrund der hohen Standardabweichungen kann nicht von einem signifikanten Ergebnis die Rede sein, sondern lediglich ein Trend erkannt werden.

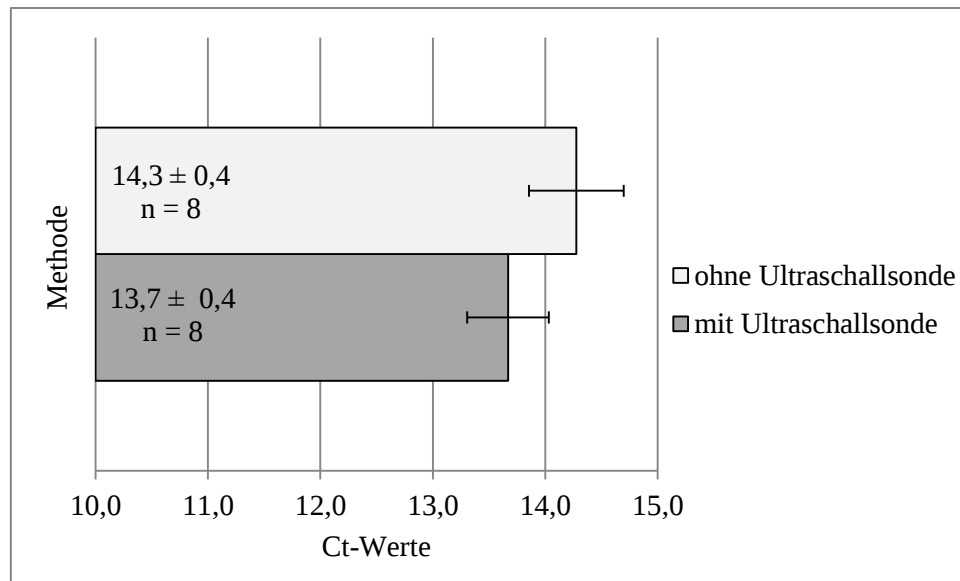


Abb. 14: Einfluss von Ultraschall hinsichtlich Effizienz der Zellwiederfindung von *E. coli* nach erfolgter Membranfiltration

Der Einfluss von Ultraschall auf die Elutionseffizienz lässt sich daher wie folgt zusammenfassen: Hochfrequente Ultraschallsonden können unterstützend zur Verbesserung der Zellwiederfindung eingesetzt werden. Allerdings ist die Sonden-basierte Ultraschallbehandlung mit einer großen Probenanzahl langwierig und mit einer starken Lärmbelastung verbunden. Ultraschallbäder hingegen bilden ungleichmäßige Schallfelder aus und sind daher weniger effizient.

4.2.2 Untersuchungen zur mechanischen Zerstörung von Membranfiltern inklusive zurückgehaltener Mikroorganismen

Eine weitere Möglichkeit sämtliche zurückgehaltene Mikroorganismen vollständig aus der Membranstruktur zurückzugewinnen, ist die vollständige mechanische Zerstörung des Membranfilters. Im Idealfall erfolgt die Zerstörung in so kleine Bruchstücke, dass diese das anschließende Analyseverfahren nicht stören. Positiver Begleiteffekt dieser Methode ist, dass die mechanische Zerstörung des Membranfilters gleichzeitig zum Zellaufschluss der zurückgehaltenen Mikroorganismen beitragen kann.

Es wurden folgende Versuchsbedingungen für die mechanische Zerstörung von Membranen mithilfe von Mahlkugeln getestet:

- Verschiedene vorbenetzte Membrantypen : Zelluloseacetat
Zellulosenitrat
Polyethersulfon
Polycarbonat

- Mit bzw. ohne Eintauchen des Probengefäßes in flüssigen Stickstoff vor dem Homogenisator-Schritt
- mit Metallkugel (Ø 3 mm)
- mit Metallkugel (Ø 3 mm) + Silica-Mahlkugeln (Ø 0,1 mm)
- mit Keramikugel (Ø 3 mm), um DNA-Adsorption an die Metalloberfläche als mögliche Fehlerquelle auszuschließen

Es wurden vorbenetzte Membranstanzlinge (Ø 25 mm) mit 6×10^5 *B. subtilis* Sporen beaufschlagt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel und vorgelegten Mahlkugeln mithilfe einer Pinzette überführt. Jede Probe wurde 40 s bei Maximalgeschwindigkeit (6,5 m/s) unter Verwendung des Homogenisators FastPrep-24 prozessiert, wobei gleichzeitig der Zellaufschluss und die Zerstörung des Membranfilters erfolgen sollten. Die DNA-Isolierung wurde im nächsten Schritt mit der Aussalzungs-/Alkoholpräzipitations-Methode von 5Prime durchgeführt (Archive Pure DNA Kit, Handbuch *online* verfügbar). Die *realtime* PCR wurde wie in Tab. 15 und Tab. 16 in Abschnitt 7.1.1.1 beschrieben angesetzt, unter Verwendung des Primerpaares B_FI und B_RI. In Abb. 15 sind Fotos von prozessierten Zelluloseacetat-Membranen zu sehen, sowohl mit als auch ohne Vorbehandlung mit flüssigem Stickstoff. Die Bilder zeigen die Auswirkung des Homogenisierens einer gefrorenen Probe. Die mittels Flüssig-Stickstoff gefrorene Probe ließ sich durch den Mahlschritt vollständig in winzige Bruchstücke zermahlen, wohingegen die feuchte Membran (Raumtemperatur) nach dem Homogenisierschritt nahezu unverändert aussah. Dieses rein optische Ergebnis legt die Annahme nahe, dass bei Verzicht auf eine Flüssig-Stickstoff-Vorbehandlung nahezu kein Zellaufschluss erreicht werden kann, da die zurückgehaltenen Mikroorganismen von den umgebenen Membranstrukturen vor der mechanischen Beanspruchung durch die Mahlkugel geschützt sind.

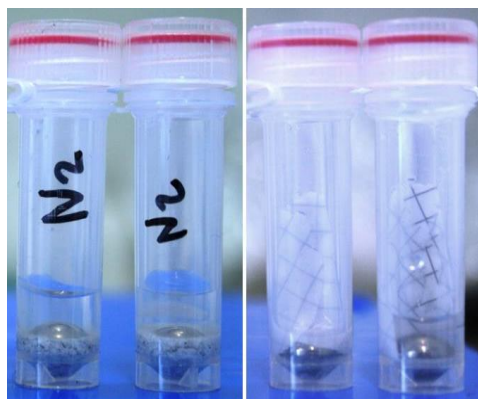


Abb. 15: Zelluloseacetat-Membran mit Metallkugel mit FastPrep-24 prozessiert; Links: Mit Flüssig-Stickstoff-Vorbehandlung; Rechts: Ohne Flüssig-Stickstoff-Vorbehandlung; anschließend Zugabe von Lysepuffer (5Prime)

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Zellaufschlusseffizienz für unterschiedliche Versuchsbedingungen mit *realtime* PCR überprüft. Innerhalb dieser Versuchsreihe wurde ausschließlich mit Membranstanzlingen aus Polycarbonat oder Zelluloseacetat gearbeitet, da sich bereits in Vorversuchen gezeigt hatte, dass sich Zellulosenitrat- und Polyethersulfon-Membranen unabhängig von den Versuchsbedingungen äußerst schlecht bis überhaupt nicht in kleinere Bruchstücke zerstören lassen. Generell ist eine Zelluloseacetat-Membran deutlich spröder als alle anderen Membrantypen und lässt sich daher einfacher und vollständig in Pulver zermahlen.

Es wurde jeweils ein *spike* mit 6×10^5 *B. subtilis* Sporen auf 25 mm-Membranstanzlinge pipettiert. Diese Stanzlinge wurden anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, die Metall- und/oder Glas-Mahlkugeln enthielten. Der Zellaufschluss erfolgte über 40 s bei 6,5 m/s im FastPrep-24 System. Um die Zellyse zu unterstützen, wurden die Proben entweder zuvor mit Lysepuffer versetzt oder die verschlossenen Reaktionsgefäße wenige Sekunden in Flüssig-Stickstoff getaucht. Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem Archive Pure DNA Kit (5Prime; Handbuch *online* verfügbar) gefolgt von der Auswertung mittels *realtime* PCR wie in Tab. 15 und Tab. 16 mit B_FI und B_RI beschrieben.

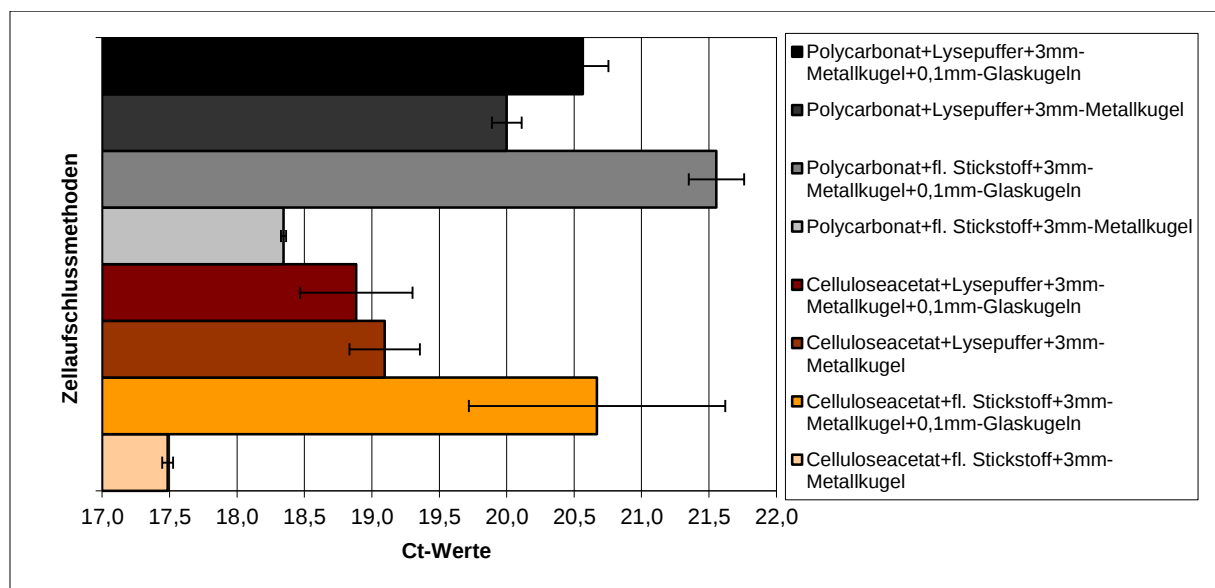


Abb. 16: 25 mm-Membranstanzlinge mit jeweils 6×10^5 *B. subtilis* Sporen; 40 s bei 6,5 m/s FastPrep-24 Mahlkugel-Aufschluss; DNA-Isolierung mit Archive Pure DNA Kit (5 Prime GmbH); *realtime* PCR wie in Tab. 15 und Tab. 16 mit B_FI und B_RI

In Abb. 16 ist ersichtlich, dass das beste Aufschlussresultat unter Verwendung eines Zelluloseacetat-Stanzlings mit einer 3 mm-Metallkugel und Flüssig-Stickstoff erzielt werden konnte, gefolgt von Polycarbonat-Membranen, die unter gleichen Versuchsbedingungen prozessiert wurden. Vermutlich haben sowohl der Einsatz einer wässrigen Lösung, hier Lysepuffer, als auch die Verwendung von 0,1 mm-Silica-Mahlkugeln eine Art Dämpfer-

wirkung, so dass der Zellaufschluss der Sporen weniger effizient abläuft. Die höchsten Ct-Werte und somit die schlechtesten DNA-Wiederfindungsergebnisse wurden für beide Membrantypen mit der Kombination Flüssig-Stickstoff + Metallkugel + Silica-Mahlkugeln ermittelt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Metallkugel die Silica-Mahlkugeln anstatt die Sporen zermahlen hat. Weiterhin liegt basierend auf den Ergebnissen die Annahme nahe, dass die DNA der aufgeschlossenen Zellen verstärkt an die Silica-Mahlkugeln bindet. Dies sollte eigentlich nur dann der Fall sein, wenn im Lysepuffer chaotrope Salze enthalten sind, die zu einer positiven Ladung der Glasoberfläche führen, so dass die negativ geladene DNA bindet. Somit führen sowohl die optische Auswertung als auch die DNA-Wiederfindungswerte zu dem Resultat, dass die Kombination aus Zelluloseacetat-Membran, Flüssig-Stickstoff und einer 3 mm-Metallkugel die besten Ergebnisse ermöglicht. Es ist zu berücksichtigen, dass sich die bei dieser Methode entstehenden feinen Membranstückchen relativ gut mit der Aussalzuungs-/Alkoholpräzipitations-Methode im Rahmen der DNA-Isolierung handhaben lassen. Allerdings ist eine Übertragung geringer Membranreste bis hin zur PCR-Reaktion nicht auszuschließen. Daher muss zusätzlich sichergestellt und überprüft werden, ob Membranreste die PCR-Reaktion stören. Hierfür wurde ein *B. subtilis* DNA-Extrakt wie in Tab. 15 und Tab. 16 beschrieben amplifiziert, wobei jedes PCR-Reaktionsgefäß zusätzlich zermahlene Membranfragmente enthielt. Nach der Amplifikation erfolgte die Beurteilung, ob Membranreste die PCR-Reaktion stören, mithilfe einer Gelelektrophorese, die wie in Kapitel 7.1.1.3 beschrieben durchgeführt wurde.

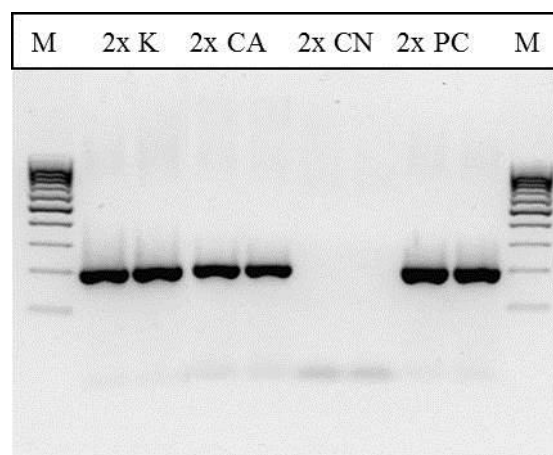


Abb. 17: Agarosegel mit *B. subtilis* Amplikons, wobei die Amplifikation unter Anwesenheit von Membranfragmenten durchgeführt wurde; M - 100 bp DNA-Leiter (Bioron); K – Kontrolle ohne Membranfragmente; CA – Zelluloseacetat-Fragment in PCR-Reaktion; CN – Zellulosenitrat-Fragment in PCR-Reaktion; PC – Polycarbonat-Fragment in PCR-Reaktion

Zelluloseacetat- und Polycarbonat-Membranfragmente führen in der PCR zu keiner Inhibition. Zellulosenitrat hingegen führte zu einer Totalinhibition. Zellulosenitrat-Membranen weisen eine vergleichsweise hohe unspezifische Bindung von Proteinen auf. Daher liegt die Vermu-

tung nahe, dass die Polymerase während der PCR an Zellulosenitrat bindet und somit nicht mehr für die Amplifikation zur Verfügung steht. Abhilfe könnte ein BSA-basierter Blockierungspuffer verschaffen.

Die besten DNA-Wiederfindungsergebnisse wurden zuvor mit zermahlenen Zelluloseacetat-Membranen erzielt. Dieser Membran-Typ zeigt nur eine geringe Inhibierung der Amplifikation, im Falle dass Membranreste in die PCR-Reaktion verschleppt werden. Dies ist an den geringfügig dünneren DNA-Banden bei den Spuren „CA“ im Vergleich zu den Spuren „K“ und „PC“ ersichtlich (siehe Abb. 17). Da Polycarbonat-Membranen generell die niedrigste Tendenz zu unspezifischen Bindungen aufweisen, führen diese Membranfragmente in der PCR-Reaktion zu keinerlei Inhibierung.

Als Fazit von Kapitel 4.2.2 kann formuliert werden, dass sich Zelluloseacetat-Membranen in Kombination mit Flüssig-Stickstoff und Metallschleifkugeln vollständig zermahlen lassen und vergleichsweise die beste Sporenaufschlusseffizienz bieten. Allerdings können überführte Membranreste eine Teilinhibierung der PCR verursachen, so dass anhand der PCR-Ergebnisse keine quantitativen Aussagen getroffen werden können, da die PCR-Effizienz nicht nahe 100 % liegt. Des Weiteren ist die Methode des mechanischen Zerstörens von Membranfiltern nur für Stanzlinge mit einem Durchmesser 25 mm geeignet, da eine größere Menge an zermahlenen Membranfragmenten nur schwer während der darauf folgenden DNA-Isolierung prozessiert werden kann. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass nicht jedes Labor über Flüssig-Stickstoff verfügt, was allerdings für die Durchführung dieses Verfahrens unbedingt notwendig ist.

Diese genannten Nachteile sprechen für sich und verlangen nach einer eleganteren Methode, um die Gesamtheit aller mit der Membran zurückgehaltenen Mikroorganismen in ein Reaktionsgefäß zu überführen. Daher wird im folgenden Abschnitt das Auflösen von Membranfiltern genauer betrachtet. Es wurden sowohl chemische als auch enzymatische Lösungen gefunden.

4.2.3 Untersuchungen zum Auflösen verschiedener Membrantypen

Da bereits in den vorherigen Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 gezeigt wurde, dass sowohl ein quantitativ vollständiges Abspülen als auch das mechanische Zerstören des Membranfilters nicht zu den gewünschten Ergebnissen führt, soll im Abschnitt 4.2.3 der Ansatz betrachtet werden, den Filter aufzulösen, um diese Lösung im Anschluss einer geeigneten Zellaufschluss- und DNA-Isolierungs-Methode zu unterziehen. Gesucht wurde nach einem Filtermaterial, das im Wässrigen stabil ist und sich somit für Standardfiltrationen eignet, sich

jedoch unter Kontakt mit beispielsweise organischen Lösungsmitteln oder bestimmten Enzymen spalten bzw. lösen lässt.

4.2.3.1 Auflösen von Membranfiltern mithilfe von organischen Lösungsmitteln

Entscheidende Kriterien bei der Auswahl der geeigneten Membranfilter-Lösemittel-Kombination waren ein rasches Auflösen des Filters, ein möglichst niedriger Dampfdruck des Lösemittels, um sämtliche Prozessschritte problemlos in geschlossenen Reaktionsgefäßen durchführen zu können und eine nicht zu starke Toxizität, so dass routinemäßig damit in Laboren gearbeitet werden kann. In Tab. 3 sind die getesteten Membranfilter-Lösemittel-Kombinationen aufgeführt, die innerhalb eines vertretbaren Zeitrahmens (< 1 min) zu einem Auflösen der Membran geführt haben.

Tab. 3: Membranfiltermaterial und Lösemittel, das zum Auflösen des jeweiligen Materials führt

<i>Filtermaterial</i>	<i>Lösemittel</i>
Polyethersulfon	Methylenchlorid
Polyethersulfon	Chloroform
Polyethersulfon	Dimethylsulfoxid
Zelluloseacetat	Chloroform
Zelluloseacetat	Dimethylsulfoxid
Polycarbonat	Methylenchlorid
Polycarbonat	Chloroform
Zellulosenitrat	Dimethylsulfoxid

Für erste Versuche zum Löseverhalten wurden Membranstanzlinge mit 47 mm Durchmesser zusammengefaltet in 2 ml-Polypropylen-Reaktionsgefäße überführt und, wie in Tab. 3 aufgeführt, 1 ml des entsprechenden Lösungsmittels hinzu pipettiert. Bei sämtlichen Kombinationen konnte durch zusätzliches Vortexen ein rasches Lösen beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der späteren Anwendung sollte die Lösemittelmenge 1 ml im Idealfall nicht überschreiten, da sämtliche Folgeschritte nach dem Auflösen der Membran, wie Zellaufschluss und DNA-Isolierung, in einem Standard-2 ml-Reaktionsgefäß stattfinden sollen.

Im nächsten Schritt wurde ein realitätsnäherer Versuchsaufbau gewählt, wobei vor dem Überführen der Membranen in 2 ml-Reaktionsgefäße ein Filtrationsschritt mit Wasser erfolgte, so dass für das Auflösen vorbenetzte Membranen verwendet wurden. Erwartungsgemäß enthielten die vorbenetzten Membranen, mit Ausnahme von Polycarbonat, noch eine beträcht-

liche Menge an Restwasser, die dazu führte, dass sich die jeweilige Membran schlechter löste und teilweise als weißes Präzipitat ausfiel. Dieses ungewollte Präzipitat konnte sowohl bei Polyethersulfon als auch bei Zelluloseacetat vor allem unter Verwendung des Lösungsmittels Chloroform beobachtet werden. Ursache hierfür ist einerseits die Membrandicke, die bei Zelluloseacetat (ca. 120 μm), Zellulosenitrat (115 – 145 μm) und Polyethersulfon (ca. 150 μm) zu einer großen Flüssigkeitsrestmenge nach erfolgter Filtration in der Porenstruktur führt. Andererseits trägt auch die Wahl des Lösungsmittels zur ungewünschten Präzipitatbildung bei. Dimethylsulfoxid ist im Gegensatz zu den anderen hier genannten Lösungsmitteln mit Wasser mischbar, so dass der Membranfilter trotz des Restwassers in Lösung bleibt und nicht ausfällt. Polycarbonat-Membranen hingegen sind mit 6 – 11 μm deutlich dünner und haben im Gegensatz zu den dickeren Membrantypen nur eine einschichtige Membran-/Poren-Lage. Dies führt dazu, dass nach erfolgter Filtration kaum Restflüssigkeit in der Porenstruktur verbleiben kann und somit die Membran nicht aufgrund von zu viel Wasser präzipitiert.

Wie bereits erwähnt, kann durch den Einsatz von Dimethylsulfoxid ein Ausfällen der Membran vermieden werden. Nichtsdestotrotz ist Dimethylsulfoxid prinzipiell für die angedachte Anwendung ungeeignet, da es mit Wasser mischbar ist. Ziel ist allerdings ein Zweiphasen-Gemisch, wobei die Membran im Idealfall vollständig gelöst in der organischen Phase vorliegt. Die wässrige Phase kann beispielsweise ein geeigneter Lysepuffer sein, der zum Zellaufschluss beiträgt. Alternativ kann der Zellaufschluss auch mechanisch mithilfe von Mahlkugeln in der organischen Phase stattfinden. Die wasserlösliche DNA der Mikroorganismen mit gestörter Membranintegrität reichert sich dann in der wässrigen Phase mit dem Lysepuffer an und kann mittels Alkoholpräzipitation gefällt werden.

Betrachtet man allein die Membrandicke, spricht schon diese eindeutig für die Verwendung von Polycarbonat-Membranen. Denn aufgrund der bis zu 15mal geringeren Dicke im Vergleich zu den anderen Membrantypen ist sehr viel weniger Membranmaterial im Gesamtprozess involviert und kann diesen somit auch weniger negativ beeinflussen, was sich positiv auf die Effizienz der DNA-Isolierung auswirken sollte.

Des Weiteren handelt es sich bei fast allen Membrantypen, außer bei Polycarbonat, um keine Reinstoffe sondern Stoffgemische, denen unter anderem Benetzungsmittel während der Produktion zugegeben werden. So enthält beispielsweise die bei Sartorius im Fällbadverfahren hergestellte Polyethersulfon-Membran relativ viel Polyvinylpyrrolidon (PVP) als Benetzungsmittel. PVP ist im Unterschied zu Polyethersulfon wasserlöslich, was ein vollständiges Auflösen der Membran in einem einzigen Lösungsmittel verhindert. Vergleichbares gilt für Zellulosenitrat, wobei hier noch erschwerend hinzu kommt, dass Zellulosenitrat

sehr stark zu unspezifischen Bindungen neigt, was bei einer Präzipitatbildung der Membran dazu führen könnte, dass zurückgehaltene Mikroorganismen unspezifisch an der ausgefällten Membran binden und somit von der DNA-Isolierung ausgeschlossen bleiben.

Somit sprechen die Fakten für Polycarbonat, einerseits aufgrund der sehr geringen Dicke und andererseits da es sich um einen Reinstoff handelt, der sich schnell vollständig auflösen lässt. Bleibt noch die Frage zu klären, welches der getesteten Lösungsmittel (Tab. 3) besser geeignet ist. Da Chloroform sowohl einen niedrigeren Dampfdruck als Methylenchlorid aufweist (Vergleich: 209 hPa vs. 470 hPa bei 20°C) als auch eine geringere Löslichkeit in Wasser besitzt (Vergleich: 8,2 g/l vs. 20 g/l bei 20°C), ist Chloroform aufgrund der Handhabung und der vermutlich besseren DNA-Extraktions-Effizienz Methylenchlorid vorzuziehen. Außerdem handelt es sich bei der Phenol-/Chloroform-Extraktion um eine seit vielen Jahren erprobte Methode, um DNA zu reinigen.

In Abb. 18 sind Amplifikationskurven dargestellt, die zeigen, dass eine quantitativ vollständige Extraktion eines DNA *spikes* aus einer in Chloroform gelösten Polycarbonat-Membran möglich ist. Als 100 %-Kontrolle wurde die gleiche Menge an *E. coli* DNA direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Ct-Werte der Proben und Kontrollreaktionen liegen mit Ct-Mittelwerten von $12,5 \pm 0,1$ und $12,8 \pm 0,2$ nah beieinander, so dass bei den Proben mit gelöster Membran von einer 100 %igen Extraktionseffizienz gesprochen werden kann.

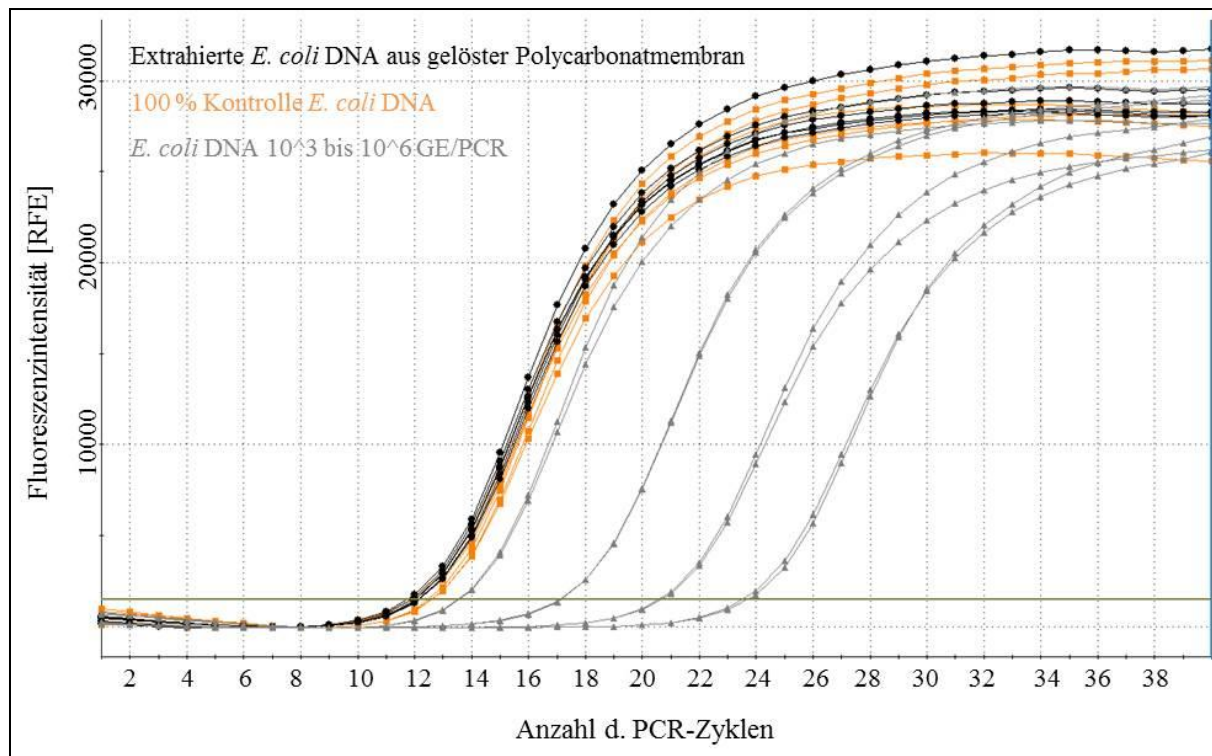


Abb. 18: Polycarbonat-Membranen mit *E. coli* DNA beaufschlagt und in Chloroform gelöst, DNA-Extraktion in die wässrige Phase mit anschließender Alkoholpräzipitation, PCR laut Tab. 15 und Tab. 16 mit E_FII + E_RII, n = 6

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte nun ein Gesamtprozess entwickelt werden, bei dem ein Membranstanzling kontaminationsfrei aufgelöst und in ein 2 ml Probengefäß überführt werden kann. Für diese Anwendung wurden spezielle Prototypen-Drehteile (siehe Abb. 19) aus Polystone angefertigt, einem Polypropylen mit besonders geringer Oberflächenrauigkeit. Ein weiterer Grund für die Wahl eines Polypropylen war die chemische Stabilität. Im Gegensatz zu beispielsweise Polystyrol wird Polypropylen nicht durch Chloroform gelöst.

Die entwickelte Membrantransfer- und –Auflöseinheit besteht aus einem Oberteil zum Aufnehmen des Membranfilters mithilfe eines PSA (*pressure sensitive adhesive*) und einem Unterteil mit Auslass zum Herausspülen der gelösten Membran inkl. Mikroorganismen. Die Innenseiten des Ober- und Unterteils wurden zusätzlich poliert, um ein vollständiges Abspülen von Mikroorganismen zu ermöglichen. Entscheidend ist außerdem, dass Ober- und Unterteil dicht und irreversibel mithilfe einer Schnappverbindung verschließbar sind, so dass kein Chloroform aus der Einheit entweichen kann. Ein weiteres Augenmerk beim Entwerfen dieser Einheit wurde auf den Auslass des Unterteils gelegt. Dieser läuft konisch zu, so dass die Innendurchmesser der Auffanggefäße, die am Auslass befestigt werden, Varianzen aufweisen dürfen.

Mit dieser Plastikeinheit ist es möglich, die Membran aufzunehmen, aufzulösen und die Lösung in ein Reaktionsgefäß zu überführen. Die exakten Zeichnungen sind im Anhang (Abschnitt 7.2) zu finden. Abb. 21 zeigt eine schematische Darstellung des Verfahrens. Beides, sowohl die Membrantransfer- und –Auflöseeinheit als auch das Verfahren für deren Anwendung wurden als Patentanmeldung beim Deutschen Patentamt eingereicht. Eine entsprechende Gebrauchsmusterschrift zu dieser Plastikeinheit kann bereits seit Oktober 2012 unter folgender Nummer DE202012007324U1 eingesehen werden.

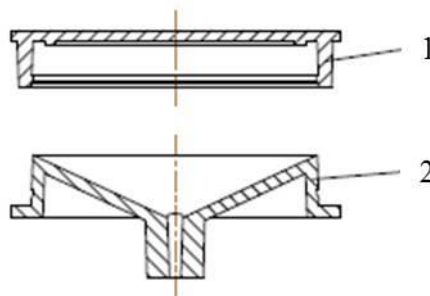


Abb. 19: Membrantransfer- und –Auflöseeinheit bestehend aus Oberteil (1) zum Aufnehmen der Membran mithilfe eines PSA (*pressure sensitive adhesive*) und einem Unterteil (2) mit Auslass zum Herausspülen der gelösten Membran; (1) und (2) werden nach Aufnahme der Membran mithilfe einer Schnappverbindung irreversibel und dicht verschlossen

Die Membrantransfer- und –Auflöseeinheit ermöglicht ein kontaminationsfreies Aufnehmen und Auflösen eines Membranstanzlings ohne die Benutzung einer Pinzette. Ober- und Unterteil der Plastikeinheit werden nach Aufnahme der Membran dicht verschlossen. Anschließend wird ein 2 ml-Schraubgefäß, welches bereits 750 µl Chloroform vorgefüllt enthält, an den konisch verlaufenden Auslass gesteckt. Durch eine Kopfüber-Drehung um 180° läuft das Chloroform in die Plastikeinheit und löst die Membran in wenigen Sekunden vollständig auf. Nach kurzem Schwenken wird die Plastikeinheit wieder in ihre Ausgangsposition gedreht und in einen speziellen Zentrifugenadapter (siehe Abb. 20) platziert. Es folgt ein einminütiger Zentrifugationsschritt bei etwa 3.400 x g, um die gelöste Membran samt aller zurückgehaltenen Mikroorganismen vollständig in das 2 ml-Schraubgefäß zu überführen. Für den Zellaufschluss werden 500 µl eines wässrigen Lysepuffers hinzu pipettiert, so dass sich eine organische Phase mit der gelösten Membran und eine obere wässrige Phase mit dem Lysepuffer bilden. Im nächsten Schritt erfolgt eine 10minütige Extraktion durch Schütteln in einem Thermomixer bei 950 upm und 37 °C, so dass die Mikroorganismen durch den Lysepuffer aufgeschlossen werden und sich die DNA in der wässrigen Phase anreichert. Der gesamte Inhalt wird im nächsten Schritt in ein 2 ml Gefäß mit vorgelegtem Silikongel (Bayer

Silicon, hochviskos) überführt und drei bis fünf Minuten bei etwa 16.000 x g zentrifugiert, so dass sich das gesamte Silikongel als feste Trennschicht zwischen die organische und die wässrige Phase setzt und somit eine saubere und quantitative Überführung der wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml-Standardreaktionsgefäß möglich ist. Nach Zugabe von 600 µl Isopropanol und wenigen Microlitern eines Co-Präzipitators (z.B. 2 µl Glycogen von 5Prime) wird die Probe mehrfach invertiert und drei Minuten bei etwa 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 600 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend kurz getrocknet. Die Rehydratisierung der DNA kann unter Verwendung von mindestens 50 µl 10 mM Tris-Puffer bei 65 °C für 1 h im Thermoblock erfolgen.

Optional können bereits mit dem Chloroform vorgelegte Mahlkugeln für den Zellaufschluss von beispielsweise bakteriellen Sporen genutzt werden. In diesem Fall erfolgt vor der Zweiphasenextraktion ein Homogenisatorschritt (z.B. im FastPrep-24 System bei 6,5 m/s für 1 bis 2 min). Entscheidend bei diesem Schritt ist die Verwendung von 3 mm-Stahlkugeln, da die Membrantransfer- und –Auflöseeinheit so entwickelt wurde, dass der Spalt am Auslass eine Breite von < 3mm aufweist und somit ein Übertreten der Mahlkugeln aus dem Reaktionsgefäß in die Plastikeinheit bei der 180°-Drehung unterbunden wird.



Abb. 20: Zentrifugenbecher und –Adapter für die Zentrifugation der Membrantransfer- und –Auflöseeinheit (Sigma)

Auf gewonnene Ergebnisse mit diesem neu entwickelten Verfahren hinsichtlich Sensitivität im direkten Vergleich zum aktuellen Stand der Technik wird ausführlich in Kapitel 4.6 eingegangen.

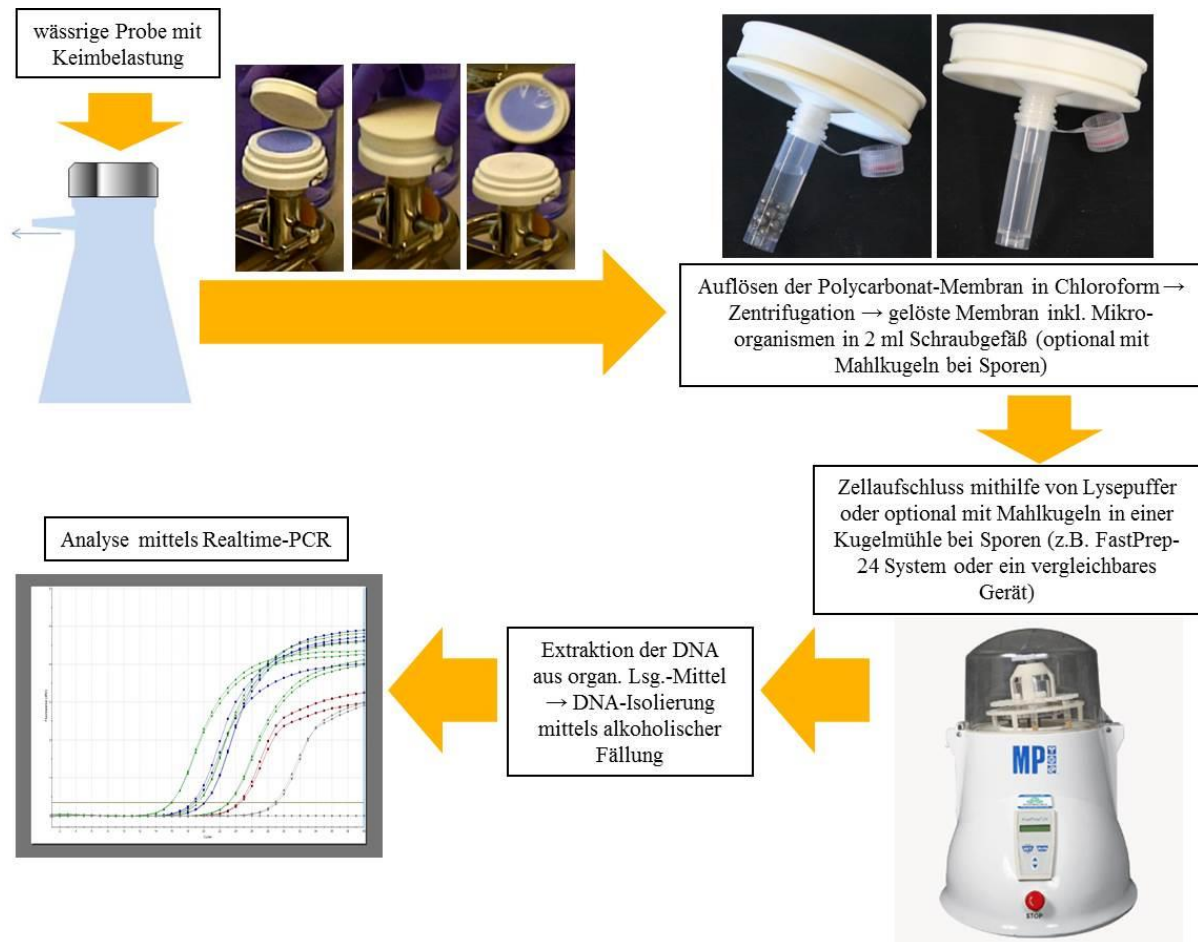


Abb. 21: Schematische Darstellung des entwickelten Verfahrens: Kontaminationsfreier Transfer und Auflösen des Membranfilters und quantitative DNA-Isolierung

4.2.3.2 Auflösen von Membranfiltern mithilfe von Enzymen

Im vorherigen Kapitel konnte eine adäquate Methode gefunden werden, um einen Membranzüchtling kontaminationsfrei aufzulösen und in ein 2 ml Probengefäß zu überführen. Nachteilig an dieser Methode ist die Verwendung eines organischen Lösungsmittels. Hätte der Anwender die Wahl zwischen einem Verfahren, das mit Enzymen arbeitet anstatt mit einem organischen Lösungsmittel, würde die Wahl aus gesundheitlichen Gründen auf die enzymatische Reaktion fallen.

Die Suche nach einem geeigneten Filtermaterial erwies sich aufgrund der hohen Anforderungen als schwierig. Dieses Material muss im Wässrigen stabil sein und eine geeignete Porenstruktur aufweisen, um für Standardfiltrationen geeignet zu sein. Unter Kontakt mit einem bestimmten Enzym muss sich dieses Material innerhalb eines vertretbaren Zeitrahmens spalten lassen.

In Vorversuchen zur enzymatischen Lyse kamen drei verschiedene Materialien als mögliche Kandidaten zum Einsatz, Kollagen, Alginat sowie bereits bestehende Membranfilter aus

regenerierter Zellulose. Bei diesen drei Materialien handelt es sich um nicht wasserlösliche Polymere, die enzymatisch spaltbar sind.

Kollagen: Es wurden drei verschiedene Kollagenprodukte getestet: Matristypt, eine etwa 2 mm dicke poröse Matrix der Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, eine stärker vernetzte Version der Matristypt-Matrix (Spezialanfertigung) sowie eine nicht poröse Kollagenfolie der Firma RESORBA mit einer Dicke von etwa 30 µm. Zur enzymatischen Spaltung dieser drei Produkte wurde die Kollagenase NB 4 Standard Grade von SERVA Electrophoresis GmbH (aus *Clostridium histolyticum*) verwendet. 10 mg/ml Kollagenase (0,12 Wunsch-Unit/mg) wurden in 1x PBS (Zusammensetzung siehe Anhang, Abschnitt 7.1.3) mit 3 mM CaCl₂ (pH 7,7) gelöst. Ein Kollagenstanzling (Ø 47 mm) in Form einer unporösen Folie oder einer porösen Matrix wurde mit 3 ml der Enzymlösung bei 37 °C innerhalb von 30 min vollständig aufgelöst.

Regenerierte Zellulose: Während des enzymatischen Verdaus des Stanzlings aus regenerierter Zellulose, konnte selbst bei einer Zellulase-Konzentration von 150 mg/ml (0,2 Unit/mg) über einen Zeitraum von 24 h keine Veränderung beobachtet werden. Als Zellulase-Puffer kam auf 40 °C temperierte 0,1 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,5) zum Einsatz. Die Zellulase (aus *Trichoderma viride*) wurde ebenfalls von der SERVA Electrophoresis GmbH bezogen.

Alginat: Die enzymatische Spaltung von Alginat mithilfe einer Alginat-Lyase (Sigma-Aldrich; 10 Units/mg) erfolgte mit einer Enzymkonzentration von 40 mg/ml in 30 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 30 mM MgCl₂ bei 37 °C. Innerhalb von 1,5 h konnte die poröse Alginat-Matrix (Ø47 mm Stanzling; von Advanced Medical Solutions) vollständig gelöst werden.

Im Zuge der folgenden Bakterien-Rückhalteversuche konnte die Alginat-Matrix nicht überzeugen. Hierbei wurden Stanzlinge der verschiedenen porösen Kollagen- und Alginat-Matrices in die bereits in Kapitel 4.2.1.1 vorgestellten Vivacon 500 Einheiten thermisch eingesiegelt (3 s bei 220-230 °C), vorbenetzt und mit einer definierten Konzentration an *E. coli* Zellen (~ 500 Zellen/100 µl) beaufschlagt und anschließend die Filtration durch einen einminütigen Zentrifugationsschritt bei 2.500 upm simuliert. Ein Filtratvolumen von 50 µl wurde jedem Auffanggefäß entnommen und auf Sartorius Nähragar (Petrischale Ø 50 mm) mithilfe des Spatelverfahrens verteilt und 24 h bei 37 °C inkubiert, um die Koloniebildenden Einheiten (KBE) und somit das Potential zur Bakterienrückhaltung der verschiedenen Matrices zu ermitteln. Als 100 %-Kontrolle wurden stets 50 µl der *E. coli*-Lösung ohne Filtrationsschritt ausplattiert und nach Inkubation die Kolonien gezählt. Die zusammengefassten Ergebnisse sind im direkten Vergleich zu den 100 %-Kontrollen und den

Zellulosenitrat-Membranen (mittlerer Porendurchmesser 0,45 μm), die in Routine-Anwendungen bei Standard-Membranfiltrationen eine 100 %ige Rückhaltung ermöglichen, in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Rückhaltung von *E. coli* Zellen durch verschiedene Matrices; KBE in Filtrat/Kontrolle nach Ausspateln

	<i>Matristypt, stärker vernetzte Version</i> (n = 15)	<i>Zellulosenitrat-Membran, 0,45 μm</i> (n = 15)	<i>Alginate-Matrix</i> (n = 10)	<i>100 % Kontrolle ohne Filtration</i> (n = 15)
KBE ohne Filtration, 100 % Kontrolle	-	-	-	228
KBE im Filtrat nach Filtration	10	9	183	-
Nicht zurückgehaltene KBE [%]	4	4	80	-
Standardabweichung	11	11	65	75

Alginate bietet eine unzureichende Rückhaltung, da etwa 80 % der Keime die Matrix passierten. Die Rückhaltungsergebnisse zeigen, dass die Performance der Kollagenmatrix (stärker vernetzte Matristypt) vergleichbar ist mit einer Standardmembran für die Membranfiltrationsmethode (Zellulosenitrat 0,45 μm , Typ 11406; Sartorius). Eigentlich müsste die Zellulosenitrat-Membran eine sichere und vollständige Rückhaltung zeigen, ohne den Durchtritt eines einzigen Keimes. Es ist daher anzunehmen, dass der hier gewählte Versuchsaufbau, speziell die selbst-assemblierte Vivacon 500 Einheit, geringe Undichtigkeiten aufweist, die das vorliegende Ergebnis erklären. Auch wurde der Versuch unternommen, die Matristypt-Stanzlinge aus Kollagen in Standard-Membranfiltrationsequipment einzubauen, doch auch dieser Versuchsaufbau zeigte Undichtigkeiten. Vergleicht man rein optisch die Porengrößen der betrachteten Matrices, wird deutlich, dass die Porengrößen der Zellulosenitrat-Membran (siehe Abb. 23 rechts) um Größenordnungen kleiner sind als die der hier verwendeten Kollagen- (siehe Abb. 22 Mitte) und Alginatematrix (siehe Abb. 23 Mitte). Daher würde man sowohl für Kollagen als auch für Alginate deutlich schlechtere Rückhaltungswerte erwarten. Dies kann aber nur bei Alginate beobachtet werden kann. Im Gegensatz zu Standard-Filtrationsmedien verändert sich die Kollagenmatrix nach erfolgter Benetzung in ein aufgequollenes Hydrogel (siehe Abb. 23 links), das trotzdem seine Stabilität beibehält und erst auf diesem Wege seine erwünschten Filtriereigenschaften ausbildet. Bisher kann bei der Herstellung von Kollagen-Matrices keine definierte Porengrößenverteilung erreicht werden, da es sich um natives Kollagen tierischen Ursprungs handelt und nicht um einen exakt gesteuerten Herstellungsprozess. Daher ist dieses Material als Filtermedium nur bedingt

geeignet. Bisher sind die Porengrößen nur über eine etwas stärkere und eine weniger stark vernetzte Kollagenstruktur (siehe Abb. 22 links und Mitte) definiert, die auch schnell an ihre Grenzen hinsichtlich Bakterien-Rückhaltung stößt. Alternativ könnte man versuchen, die bereits im Zuge der Tests zur enzymatischen Spaltbarkeit verwendete nicht-poröse Kollagenfolie (siehe Abb. 22 rechts) mit definierten Porengrößen zu versehen. Die Verfolgung dieses Lösungsansatzes kann ein Thema einer zukünftigen wissenschaftlichen Arbeit darstellen.

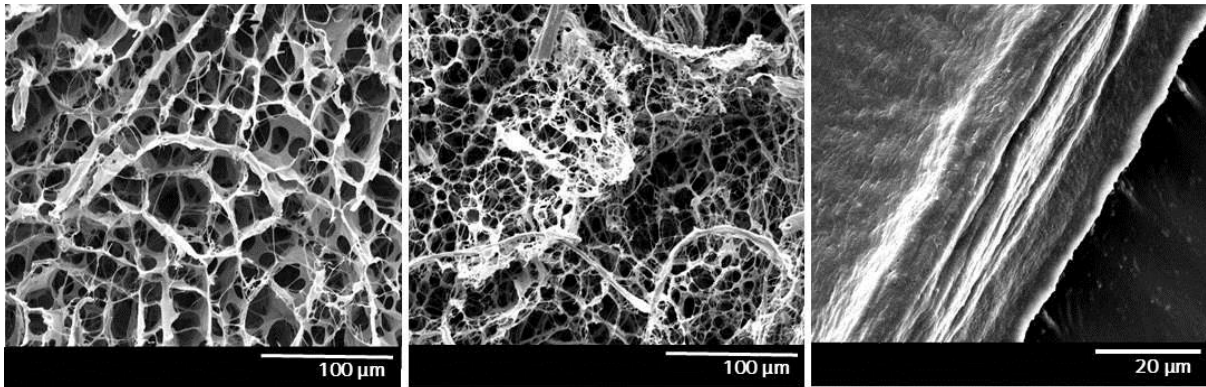


Abb. 22: REM-Aufnahmen, Links: Kollagenmembran, 1.000 x; Mitte: Kollagenmembran stärker vernetzt, 1000 x; Rechts: Kollagenfolie unporös, 4.000 x

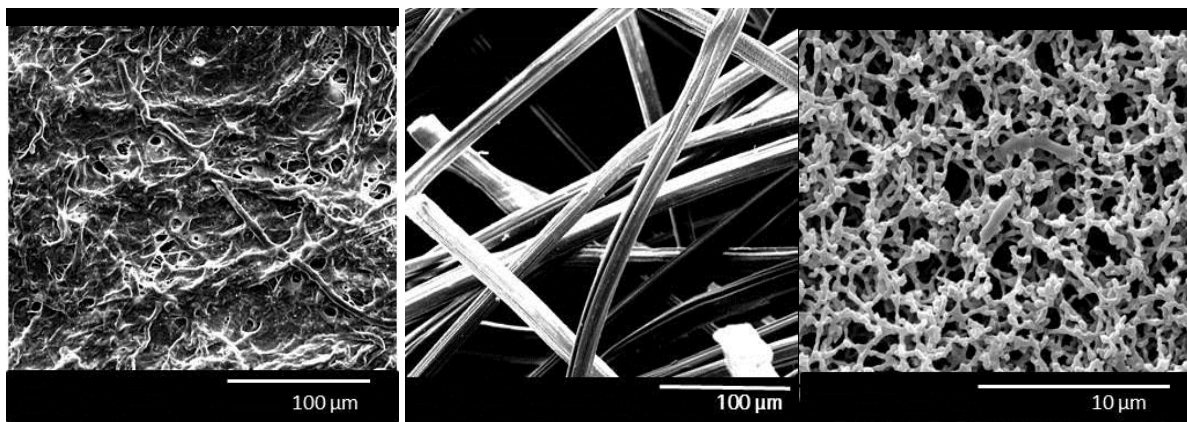


Abb. 23: REM-Aufnahmen, Links: Kollagenmembran stärker vernetzt, gequollen nach Benetzung, 1.000 x; Mitte: Alginat, 1.000 x; Rechts: Zellulosenitrat-Membran, 0,45 µm Porengröße, 15.000 x

4.3 Untersuchungen zur Effektivität verschiedener Zellaufschlussmethoden

Das Fernziel, die Entwicklung eines universellen *tools* zur Probenvorbereitung und Analyse großvolumiger filtrierbarer Proben, erfordert eine universelle Zelllyse-methode, die es ermöglicht, sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien und sogar bakterielle oder Fungi Sporen aufzuschließen.

Zur Adressierung dieses Problems wurde mit dem *worst case* Organismus *B. subtilis* gearbeitet, dessen Sporen zu den stabilsten der Welt zählen (40 GPa, 350 °C) (Vogel & Ehrmann 2011). Bei den experimentellen Versuchen kamen sowohl die vegetative Form als auch Sporen zum Einsatz. Um ebenfalls ein Gefühl für die Stabilität der vegetativen Form eines gramnegativen und grampositiven Bakteriums zu bekommen, sollen an dieser Stelle zwei Literaturwerte genannt werden: Die DNA-Freisetzung bei *E. coli* erfolgt laut Tum unterhalb von 0,1 GPa (1000 bar). Bei vegetativen *B. subtilis* Zellen sind 0,27 GPa (2700 bar) für den vollständigen Zellaufschluss notwendig (Tum 2013). In Kapitel 4.1 wurde bereits erwähnt, dass freie Nukleinsäuren ab 0,4 bis 0,6 GPa geschädigt werden können (Vogel & Ehrmann 2011). Demnach wäre der Hochdruckaufschluss als alleinige Methode für vegetative Zellen möglich. Für bakterielle Sporen könnten kombinierte Verfahren, bestehend aus enzymatischer oder chemischer Vorbehandlung mit anschließendem Druckaufschluss, Anwendung finden, um Werte von bis zu 40 GPa zu umgehen und die DNA nicht zu schädigen.

Laut zahlreichen Publikationen ist der vollständige Zellaufschluss von bakteriellen Sporen mithilfe chemischer oder enzymatischer Lyseschnitte alleine nicht möglich, auch die Hitzelyse stößt bei Sporen schnell an ihre Grenzen. Immer wieder werden Homogenisatoren mit Mahlkugeln als Methode der Wahl genannt und auch Hochdruck in Kombination mit Lyse-unterstützenden Reagenzien soll ähnlich gute Ergebnisse liefern (Lawrence 2010).

Daher sollen im Folgenden vor allem diese zwei Methoden hinsichtlich Aufschlusseffizienz näher analysiert und verglichen werden und die Annahme überprüft werden, dass für den Zellaufschluss bakterieller Sporen ein mechanisches Verfahren notwendig ist.

Zellaufschluss mithilfe von Mahlkugeln unter Verwendung eines Homogenisators

Drei Homogenisator-Modelle wurden im direkten Vergleich mit vegetativen und sporulierten *B. subtilis* Zellen getestet. Der mechanische Aufschluss erfolgte stets unter Anwesenheit eines Lysepuffers mit vorheriger enzymatischer Vorbehandlung. Als Aufschluss-unterstützendes Reagenz kam ein Lysepuffer zum Einsatz, bestehend aus 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100 (pH 8) versetzt mit 0,2 mg/ml Lysozym zur Spaltung von glykosidischen Bindungen im Murein-Sacculus der Bakterienzellwand. Zusätzlich wurde Proteinase K, eine Serin-Protease zur Spaltung von Peptidbindungen in der Zytoplasmamembran verwendet. Die enzymatische Vorbehandlung ist abhängig von den aufzuschließenden Mikroorganismen zu wählen. So wäre beispielsweise beim Aufschluss von Pilzsporen ein Lysticase-Mix die geeignete Wahl. Zusätzlich, um auch den Punkt physikalischer Zellaufschluss zu adressieren, wurde ein Teil der Sporen-Proben vor dem mechanischen Lyseschritt mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Homogenisierprozess dieser Versuchsreihe kamen 0,1 mm große Silicapartikel (FastPrep™ Lysing Matrix B, MP Biomedicals) zur Anwendung. Diese Matrix findet routinemäßig bei mechanischen Zellaufschlüssen Anwendung. Es wurden die Geräte FastPrep FP120 (Thermo Savant), FastPrep-24 (MP Biomedicals) und Mikro-Dismembrator U (Sartorius) verglichen. Ein Aufschlussvorgang mit den Geräten FastPrep-24 und FastPrep FP120 lief 40 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 6 m/s. Diese Geräte beschreiben eine Art rotierende Kippbewegung, um den Aufschluss mithilfe von Mahlkugeln zu realisieren. Das Gerät Mikro-Dismembrator U hingegen beschreibt eine geradlinige Schüttelbewegung und ist weniger leistungsfähig, so dass es mit der Maximalgeschwindigkeit von 2.000 upm betrieben wurde. Der exakte Versuchsaufbau ist in Spalte drei von Tab. 5 beschrieben.

Das FastPrep-24 System von MP Biomedicals (siehe Abb. 24) weist die niedrigsten Ct-Werte und die größte Ct-Differenz zu den Kontrollproben ohne Homogenisatorschritt auf. Mit diesem Gerät wurde sowohl mit als auch ohne flüssigen Stickstoff die beste Aufschluss-effizienz erzielt. Unter Verwendung von vegetativen *B. subtilis* Zellen wurde eine Ct-Verbesserung von 3,75 durch den Einsatz des Gerätes FastPrep-24 ermittelt, was einer 13,5fach ($2^{(3,75)} = 13,5$) höheren DNA-Konzentration entspricht, unter der Annahme, dass die PCR mit einer Effizienz von 100 % abgelaufen ist. Bei der Sporenlösung wurde für das FastPrep-24 System eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor zwei ($2^{(1,05)} = 2,1$) ermittelt. Durch einen zusätzlichen Gefrierschritt mit Flüssig-Stickstoff konnte die Sensitivität um den Faktor fünf ($2^{(2,37)} = 5,2$) erhöht werden.

Mit dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass für einen vollständigen Zellaufschluss von grampositiven vegetativen Zellen und vor allem für bakterielle Sporen eine chemische Lyse inklusive enzymatischer Vorbehandlung nicht ausreichend ist. Die Kombination aus chemischer, enzymatischer, physikalischer und mechanischer Beanspruchung hat bei *B. subtilis* Sporen zu dem besten Aufschlussergebnis geführt. Hierbei liefert die mechanische Beanspruchung durch Mahlkugeln einen erheblichen Beitrag zu einer effizienten Zelllyse. Bei diesem Versuch war es nicht möglich, 100 % Kontrollen parallel zu prozessieren, da bisher keine Referenzmethode existiert, die einen quantitativ vollständigen Aufschluss ermöglicht.

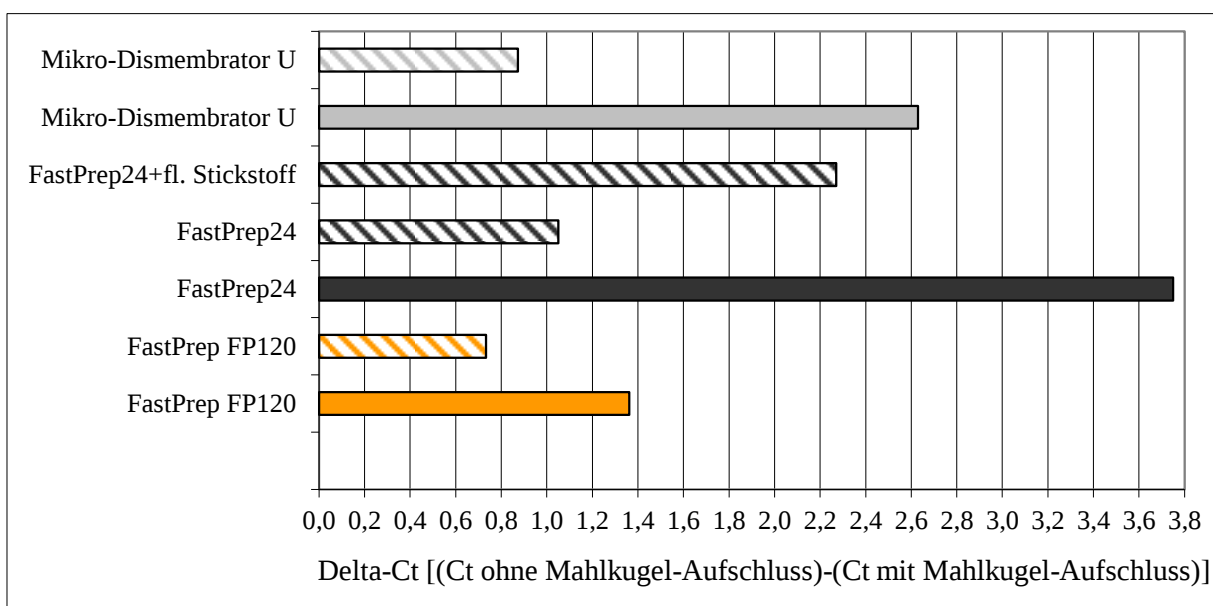


Abb. 24: Ergebnisse des Homogenisatorvergleichs; gestreifte Balken zeigen Ergebnisse der Sporen-Suspensionen; jeweils n = 4 (Proben mit Homogenisator), n = 2 (Proben ohne Homogenisator); Standardabweichung nicht eingezeichnet, da teilweise n = 2, Einzelwerte sind in Tab. 5 dargestellt

Experimenteller Teil

Tab. 5: Versuchsaufbau und Ergebnisse des Homogenisatorvergleichs; jeweils n = 4 (Proben mit Homogenisator), n = 2 (Proben ohne Homogenisator)

Probenmaterial	Homogenisator	Protokoll	Ct-Wert	Mittelwert Ct	Delta-Ct	
Homogenisator Mikro-Dismembrator U						
B. subtilis	Kontrolle ohne Mikro-Dismembrator U	pelletierte Zellen von 500 µl einer üN-Kultur + 250 µl Lysepuffer + Mahlkugeln → 40 s 2.000 upm Mahlkugel-Aufschluss → 16.000 x g 5 min → Überstand abnehmen → 30 min 37 °C wg. Lysozym → 25 µl Proteinase K üN 50 °C → 5 min RT RNase A/T1 → DNA-Isolierung laut Macherey-Nagel Kit NucleoSpin Tissue → PCR laut Tab. 15 und Tab. 16 mit Primerpaar B_FI + B_RI	18,62	17,64	2,63	
			16,65			
	Mikro-Dismembrator U			14,50		15,01
				14,87		
				15,91		
				14,74		
B. subtilis <u>Sporen-Lösung</u>	Kontrolle ohne Mikro-Dismembrator U	100 µl Sporen (10 ⁷ KBE/ml) + 180 µl Lysepuffer + Mahlkugeln → 40 s 2.000 upm Mahlkugel-Aufschluss → 16.000 x g 5 min → Überstand abnehmen → 30 min 37 °C wg. Lysozym → 25 µl Proteinase K üN 50 °C → 5 min RT RNase A/T1 → DNA-Isolierung laut Macherey-Nagel Kit NucleoSpin Tissue → PCR laut Tab. 15 und Tab. 16 mit Primerpaar B_FI + B_RI	26,16	26,11	(-0,87)	
			26,05			
	Mikro-Dismembrator U			26,19		26,98
				26,88		
				27,06		
				27,78		
Homogenisator FastPrep FP120						
B. subtilis	Kontrolle ohne FastPrep FP120	pelletierte Zellen von 500 µl einer üN-Kultur + 250 µl Lysepuffer + Mahlkugeln → 40 s 6 m/s Mahlkugel-Aufschluss → 16.000 x g 5 min → Überstand abnehmen → 30 min 37 °C wg. Lysozym → 25 µl Proteinase K üN 50 °C → 5 min RT RNase A/T1 → DNA-Isolierung laut Macherey-Nagel Kit NucleoSpin Tissue → PCR laut Tab. 15 und Tab. 16 mit Primerpaar B_FI + B_RI	17,40	17,71	1,37	
			18,01			
	FastPrep FP120			15,29		16,34
				16,07		
				16,94		
				17,07		
B. subtilis <u>Sporen-Lösung</u>	Kontrolle ohne FastPrep FP120	100 µl Sporen (10 ⁷ KBE/ml) + 180 µl Lysepuffer + Mahlkugeln → 40 s 6 m/s Mahlkugel-Aufschluss → 16.000 x g 5 min → Überstand abnehmen → 30 min 37 °C wg. Lysozym → 25 µl Proteinase K üN 50 °C → 5 min RT RNase A/T1 → DNA-Isolierung laut Macherey-Nagel Kit NucleoSpin Tissue → PCR laut Tab. 15 und Tab. 16 mit Primerpaar B_FI + B_RI	27,49	26,39	0,74	
			25,28			
	FastPrep FP120			25,78		25,65
				25,43		
				25,53		
				25,87		

Experimenteller Teil

Homogenisator FastPrep24						
B. subtilis	Kontrolle ohne FastPrep24	pelletierte Zellen von 500 µl einer üN-Kultur + 250 µl Lysepuffer + Mahlkugeln → 40 s 6 m/s Mahlkugel-Aufschluss → 16.000 x g 5 min → Überstand abnehmen → 30 min 37 °C wg. Lysozym → 25 µl Proteinase K üN 50 °C → 5 min RT RNase A/T1 → DNA-Isolierung laut Macherey-Nagel Kit NucleoSpin Tissue → PCR laut Tab. 15 und Tab. 16 mit Primerpaar B_FI + B_RI	15,94	17,44	3,75	
	FastPrep24		18,94			
			13,69	14,08		
				13,70		
				13,62		
				13,36		B. subtilis <u>Sporen-Lösung</u>
FastPrep24	25,37					
	23,82	24,11				
		23,75				
		24,04				
		23,36				
Homogenisator (Mikro-Dismembrator/FastPrep24) inkl. Flüssig-Stickstoff						
B. subtilis <u>Sporen-Lsg.</u> Flüssig-Stickstoff	Kontrolle ohne FastPrep24	100 µl Sporen (10 ⁷ KBE/ml) + Mahlkugeln → Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff → 40 s 6 m/s Mahlkugel-Aufschluss → + 180 µl Lysepuffer → 30 min 37 °C wg. Lysozym → 16.000 x g 5min → Überstand abnehmen → 25 µl Proteinase K üN 50 °C → 5 min RT RNase A/T1 → DNA-Isolierung laut Macherey-Nagel Kit NucleoSpin Tissue → PCR laut Tab. 15 und Tab. 16 mit Primerpaar B_FI + B_RI	25,08	25,18	2,37	
	FastPrep24		25,28			
			22,81	22,80		
				22,92		
				22,58		
				22,93		
B. subtilis <u>Sporen-Lsg.</u> Flüssig-Stickstoff	Kontrolle ohne Mikro-Dismembrator U	100 µl Sporen (10 ⁷ KBE/ml) + Mahlkugeln → Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff → 40 s 2.000 upm Mahlkugel-Aufschluss → + 180 µl Lysepuffer → 30 min 37 °C wg. Lysozym → 16.000 x g 5min → Überstand abnehmen → 25 µl Proteinase K üN 50 °C → 5 min RT RNase A/T1 → DNA-Isolierung laut Macherey-Nagel Kit NucleoSpin Tissue → PCR laut Tab. 15 und Tab. 16 mit Primerpaar B_FI + B_RI	25,21	24,74	(-0,15)	
	Mikro-Dismembrator U		24,26			
			24,89	24,81		
				25,65		
				24,62		
				24,49		

Zellaufschluss mithilfe von Hochdruck

Wie bereits eingangs in Kapitel 4.3 erwähnt, soll auch der Hochdruckaufschluss näher betrachtet werden. Hierfür wurde ein für diese Applikation geeignetes Gerät gewählt, das derzeit zu den leistungsstärksten verfügbaren Modellen zählt und nach dem Prinzip der *pressure cycling* Technologie (PCT) arbeitet. Pressure BioSciences hat hierfür verschiedene Methoden entwickelt basierend auf Kombinationen aus chemischer Zelllyse und PCT, um DNA aus schwer aufzuschließenden Mikroorganismen zu isolieren. Die *pressure cycling* Technologie arbeitet mit alternierenden Zyklen von sehr hohem Druck und Umgebungsdruck, um Zelllyse zu induzieren. Um die Effizienz der *pressure cycling* Technologie einschätzen zu können, wurden parallel jeweils vier *B. subtilis* Sporen-Proben mit PCT und vier identische Proben mithilfe von Mahlkugeln in einem Homogenisator aufgeschlossen. Hierfür wurden 500 µl Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100 (pH 8) versetzt mit 0,2 mg/ml Lysozym) und 100 µl Sporensuspension (10^7 KBE/ml) in ein Reaktionsgefäß mit Mahlkugeln bzw. in ein Spezialreaktionsgefäß für den PCT-Aufschluss vorgelegt. Anschließend durchliefen die PCT-Proben 30 Zyklen mit jeweils 10 Sekunden bei 0,31 GPa (3100 bar) und 10 Sekunden Normaldruck unter Verwendung des Geräts Barocycler NEP 2320 (Pressure BioSciences). Für den Aufschluss mittels Mahlkugeln kamen bei zwei Proben Metallkugeln mit einem Durchmesser von 3 mm und bei den anderen zwei Proben Silica-Mahlkugeln mit einem Durchmesser von 0,1 mm und der Homogenisator FastPrep-24 (MP Biomedicals) zum Einsatz. Ein Mahlkörperfüllgrad von 50 bis 85 % sollte laut Herstellerangaben nicht überschritten werden. Die Zelllyse wurde durch zweimal eine Minute Homogenisieren unter Anwesenheit von Mahlkugeln bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s induziert. Von jeder der acht Proben wurden 200 µl im Anschluss in die Silica-basierte DNA-Isolierung (Microsart Amp Extraction Kit, Sartorius) eingesetzt. Die DNA-Elution erfolgte in 50 µl Elutionspuffer (Kit-Bestandteil). Das Protokoll zur DNA-Isolierung ist im Anhang (Abschnitt 7.1.1.4) zu finden. Die PCR-Analyse wurde laut Tab. 15 und Tab. 16 (siehe Anhang, Abschnitt 7.1.1.1) mit dem Primerpaar B_FI + B_RI und 10 µl Probenmaterial durchgeführt. Wie bereits eingangs als Annahme formuliert, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Technologien *pressure cycling* und Mahlkugel-Aufschluss ermittelt werden. Die mittleren Ct-Werte liegen jeweils nahe Ct =25 (siehe Abb. 25).

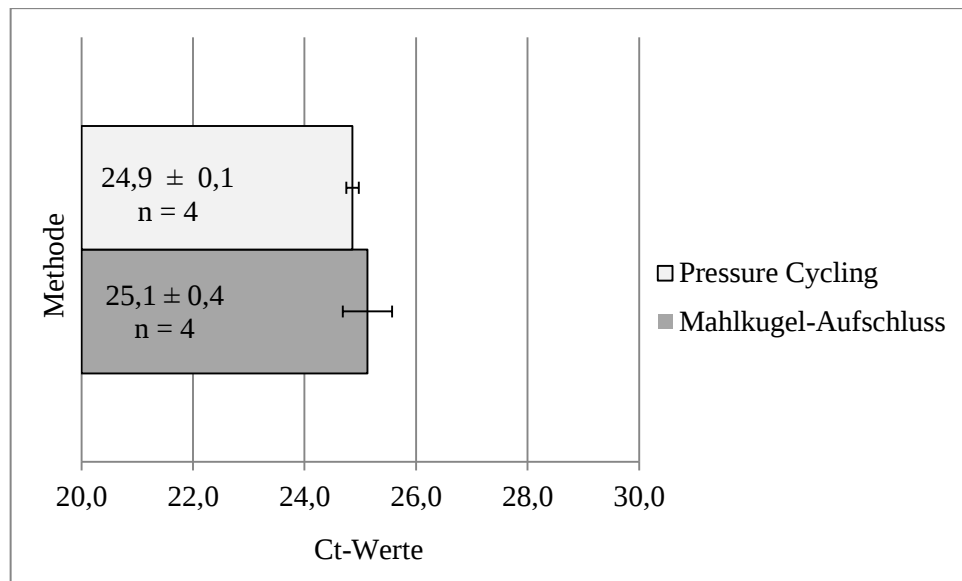


Abb. 25: Direkter Vergleich des Mahlkegel-Aufschlusses und der *pressure cycling* Technologie hinsichtlich Zellaufschlusseffizienz unter Verwendung von *B. subtilis* Sporen

Überprüfung der Sporenaufschlusseffizienz durch Mahlkegeln mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um sich nicht ausschließlich auf die Ergebnisse der *realtime* PCR verlassen zu müssen und auch absolute Werte zur Aufschlusseffizienz durch Mahlkegeln zu erhalten, wurde als Referenzmethode die Fluoreszenzmikroskopie mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9 und Propidiumiodid verwendet. Das Wirkungsprinzip der beiden Farbstoffe ist in Abb. 26 dargestellt. Propidiumiodid führt zu rotleuchtenden Zellen und ist ein positiv geladener DNA-Interkalator, der ausschließlich in tote Zellen eindringt, da lebende Zellen ein positives Zellpotential aufweisen. SYTO 9 ergibt grünleuchtende Signale und ist ebenfalls ein DNA-interkalierendes Molekül, jedoch mit neutraler Ladung, so dass ein Eindringen sowohl in lebende als auch in tote Zellen möglich ist. Das in die toten Zellen vorgedrungene Propidiumiodid unterdrückt das ggf. gleichzeitig vorhandene SYTO 9.

Als Probenmaterial wurden 200 µl einer *Bacillus subtilis* Sporensuspension (ca. 2×10^6 Zellen) einem Homogenisator-Zellaufschlussschritt unterzogen (FasPrep-24 System, 6 m/s, 40 Sekunden, 0,1 mm Silica-Mahlkegeln) und anschließend mit Propidiumiodid und SYTO 9 gefärbt. Hierfür wurden jeweils 1,5 µl 3,34 mM SYTO 9/Propidiumiodid (Bestandteil des LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kits) mit Wasser auf 0,5 ml aufgefüllt, und von diesem Farbmix wurden 200 µl zu den 200 µl der im Homogenisator prozessierten Probe gegeben. Die Mischung wurde 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend quantitativ unter dem Fluoreszenzmikroskop (BX51, Olympus) mithilfe einer Zählkammer (C-Chip™ Neubauer Improved von Peqlab) ausgezählt. Parallel dazu wurden

Proben ohne Homogenisatorschritt hergestellt, um 100 %-Kontrollen für den direkten Vergleich zu generieren.

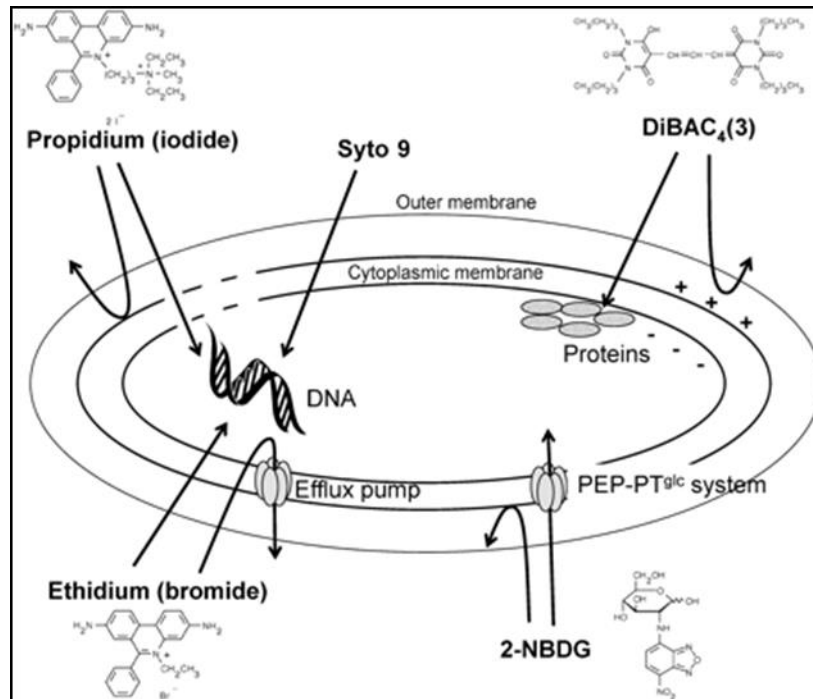


Abb. 26: Wirkungsprinzip von Propidiumiodid und SYTO9; Propidiumiodid: positiv geladen, dringt nur in tote Zellen ein, da lebende Zellen positives Zellpotential, DNA-Interkalator; SYTO 9: neutral geladen, dringt in lebende und tote Zellen ein, wird durch PI in toten Zellen unterdrückt, DNA-Interkalator (Berney et al. 2006)

Es konnten folgende Ergebnisse mithilfe der Zählkammer ermittelt werden:

100 %-Kontrollen ohne Homogenisator: Gesamtzahl = $5,58 \times 10^6/\text{ml}$

Lebendzellzahl = 89,6 %

Zellen mit gestörter Membranintegrität = 10,4 %

Proben mit Homogenisator:

Lebendzellzahl = 13,2 %

Durch Propidiumiodid rotgefärbte tote Zellen waren bei den Homogenisator-Proben nicht sichtbar, da die Zellen vermutlich vollständig zerstört wurden und die Zelltrümmer sowie die DNA nun frei in der Probe verteilt waren und nicht mehr mit Propidiumiodid nachgewiesen werden konnten. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass $100\% - 13,2\% = 86,8\%$ der Sporen über eine gestörte Membranintegrität verfügen. Unter Berücksichtigung, dass bereits in den Kontrollproben 10,4 % der Sporen nicht mehr intakt waren, ergibt sich, dass $100\% - (13,2\% + 10,4\%) = 76,4\%$ der Zellen durch die Mahlkugeln aufgeschlossen wurden.

4.4 Untersuchungen zur Effektivität verschiedener Methoden zur DNA-Isolierung

Eine quantitative Konzentrierung von Zellen oder ein nahezu vollständiger Zellaufschluss sind jedoch bedeutungslos, wenn die darauffolgenden Schritte mit niedriger Effizienz ablaufen. Daher soll an dieser Stelle ein Augenmerk auch auf die DNA-Isolierungsmethoden gelegt werden. Unzählige unterschiedliche Kits für die Isolierung genomischer DNA sind derzeit auf dem Markt erhältlich, sowohl manuelle als auch automatisierte Varianten.

Der Großteil der Kits basiert auf Silica-Zentrifugationssäulen oder magnetischen Partikeln, an die die DNA selektiv bindet und nach mehreren Waschschritten eluiert werden kann. Aber auch filtrationsbasierte Methoden oder Anionenaustauscher werden in einigen Produkten eingesetzt. Eine Berliner Arbeitsgruppe vom BGMB stellte unter der Leitung von B. Gemeinholzer fest, dass die in vielen Labors übliche CTAB-Methode (Cethyltriämmoniumbromid-Puffer, gefolgt von Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanolfällung) sowie die in einigen Kits eingesetzte Aussalzung und Alkohol-Präzipitation oder auch die Anionenaustauscher-basierte DNA-Isolierung hohe Ausbeuten liefern, allerdings eine sehr hohe Inter-Assay-Varianz aufweisen. Produkte, die auf Silicamembranen oder magnetischen Partikeln basieren zeigen eine geringere Varianz, dafür aber auch niedrigere DNA-Ausbeuten. (Laborjournal online 2011)

An diesem Punkt anknüpfende Versuche umfassten den Vergleich dreier grundsätzlich verschiedener aber bekanntermaßen sehr effektiver Methoden. Es sollte ein Überblick erstellt werden, welches Prinzip den höchsten Wirkungsgrad hat und für weitere Versuche angewendet werden soll. Die verwendeten Kits bzw. Protokolle sind in Tab. 6 aufgeführt.

Bei der DNA-Isolierung durch Aussalzen wird zu dem Lysat eine Lösung, Protein Precipitation Solution (5 Prime GmbH), gegeben, die aufgrund ihres hohen Salzgehaltes dazu führt, dass die Proteine des Lysats ausgefällt werden. Nach einer RNase-Behandlung des Überstands kann dann die DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt werden.

Das Macherey-Nagel Kit verwendet Silica-Zentrifugationssäulen und beruht darauf, dass nach erfolgter Lyse die DNA in Gegenwart chaotroper Salze reversibel an Siliziumdioxid bindet. Unter beibehalten der Salzkonzentration wird die DNA in mehreren Schritten gewaschen. Die Elution erfolgt in Abwesenheit von chaotropen Salzen.

Die phenolische DNA-Aufreinigung besteht in den meisten Fällen aus einer Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1), gefolgt von einem oder zwei Extraktionsschritten mit Chloroform, um restliches Phenol aus der Lösung zu entfernen. Phenol hat die Funktion eines

Proteinlösungsmittels, so dass sich die gelösten Proteine nach guter Durchmischung in der Grenzschicht anreichern. Die Nukleinsäuren sind nach dem Extraktionsschritt in der wässrigen Phase zu finden und können mithilfe einer Alkoholpräzipitation gefällt und im Anschluss in einem geeigneten Puffer bzw. Wasser rehydratisiert werden.

Prinzipiell ist es ratsam bei einer DNA-Fällungsreaktion, die nur über eine geringe DNA-Konzentration verfügt, diese mit *carrier* DNA, beispielsweise *calf thymus* DNA, auf etwa 100 ng/µl aufzufüllen, um ein sichtbares Pellet zu erhalten, was die folgenden Prozessschritte erheblich vereinfacht. Auch kann die Zugabe eines DNA *carrier* ggf. Adsorptionseffekte der DNA an die Kunststoffoberfläche der Reaktionsgefäße minimieren. Die DNA-Konzentration sollte mindestens in einem Bereich zwischen 1 und 250 ng/µl liegen. Alternativ können auch Reagenzien wie Glykogen als Co-Präzipitator verwendet werden. DNA-Ausbeuten von 80 bis 100 % können erreicht werden, wenn die DNA-Salz-Alkohol-Mischung bei -20°C 30 min bis 24 h inkubiert wird. (Mülhardt 2009)

Bei dieser Versuchsreihe kam der Modellorganismus *E. coli* zum Einsatz. Es wurden je Methode dreimal 500 µl einer *E. coli* Über-Nacht-Kultur 5 min bei 5.000 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Alle darauf folgenden Arbeitsschritte sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Protokolle drei verschiedener Methoden zur Isolierung von DNA angelehnt an die Handbücher

<i>5Prime Archive Pure DNA Kit</i> (Aussalzung/Alkohol-Präzipitation)	<i>Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue Kit</i> (Silica-Zentrifugationssäulen)	<i>Phenolische DNA-Aufreinigung nach Sambrook und Russell (CarlRoth Protokoll)</i>
300 µl Cell Suspension Solution (5Prime) versetzt mit 0,2 mg/ml Lysozym → vortexen	180 µl Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, pH 8, versetzt mit 0,2 mg/ml Lysozym) → vortexen	180 µl Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, pH 8, versetzt mit 0,2 mg/ml Lysozym) → vortexen
30 min Thermoschüttler bei 37 °C und 300 upm wg. Lysozym	30 min Thermoschüttler bei 37 °C und 300 upm wg. Lysozym	30 min Thermoschüttler bei 37 °C und 300 upm wg. Lysozym
Zentrifugation 1 min bei 16.000 x g → Überstand werfen	-	-
300 µl Cell Lysis Solution (5Prime) + 25µl Proteinase K (M&N)	25 µl Proteinase K (M&N)	25 µl Proteinase K (M&N)
3 h Inkubation bei 56 °C	3 h Inkubation bei 56 °C	3 h Inkubation bei 56 °C
1,5 µl RNase A (5Prime) → 25 x invertieren, 15 min Inkubation 37°C	20 µl RNase A (20 mg/ml, M&N) → mixen, 5 min Inkubation RT	20 µl RNase A (20 mg/ml, M&N) → mixen, 5 min Inkubation RT
→ 1 min auf Eis → 50 µl Protein Precipitation Solution (5Prime) → 20 Sekunden Vortexen mit Maximalgeschwindigkeit → 1 min bei 16.000 x g zentrifugieren → Überstand in neues Reaktionsgefäß mit 300 µl Isopropanol → 50 x invertieren → 1 min bei 16.000 x g zentrifugieren → Überstand werfen → mit 300 µl 70 % Ethanol das DNA-Pellet waschen → 1 min bei 16.000 x g zentrifugieren → Überstand werfen → 10 bis 15 min DNA-Pellet mit geöffneten Deckel trocknen → 100 µl DNA Hydration Solution (5Prime) → DNA rehydratisieren 1 h bei 65°C bzw. über Nacht bei RT	→ 200 µl Lösung B3 (M&N), 70°C, 10min → 210 µl Ethanol → vortexen → Silica-Säule beladen → 1 min zentrifugieren bei 11.000 x g → Durchfluss werfen → 500 µl Puffer BW → 11.000 x g 1min → Durchfluss werfen → 600 µl Puffer B5 → 11.000 x g 1min → Durchfluss werfen → 11.000 x g 1min zum Trocknen → 100 µl Puffer BE (70 °C) → 1min RT und 1min 11.000 x g	→ 1 Vol. Phenol/Chloroform pH 7,5-8 → kräftiges Mischen, 1 min 16.000 x g → wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß + 1 Vol. Phenol/Chloroform pH 7,5-8 → kräftiges Mischen, 1 min 16.000 x g wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß (mit wässriger Phase wiederholen bis kein Protein mehr in Interphase) → Entfernung von Rest-Phenol mit 2 x waschen mit jeweils 1 Volumen Chloroform → 1/10 Vol. Sodium Acetat (3M, pH 5,2; 2,46 g/10 ml) → DNA-Fällung mit 2 Vol. Ethanol, 15 min auf Eis → 30 min zentrifugieren bei 16.000 x g → Überstand werfen → DNA-Pellet mit 70 % Ethanol waschen → 1 min bei 16.000 x g zentrifugieren → Überstand werfen → 10 bis 15 min DNA-Pellet mit geöffneten Deckel trocknen → 100 µl 10 mM Tris-Puffer → DNA rehydratisieren 1 h bei 65°C bzw. über Nacht bei RT

Die eluierten DNA-Proben wurden wie in Tab. 15 und Tab. 16 (Anhang, Abschnitt 7.1.1.1) unter Verwendung des Primerpaares E_FII + E_RII mittels *realtime* PCR analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 grafisch dargestellt.

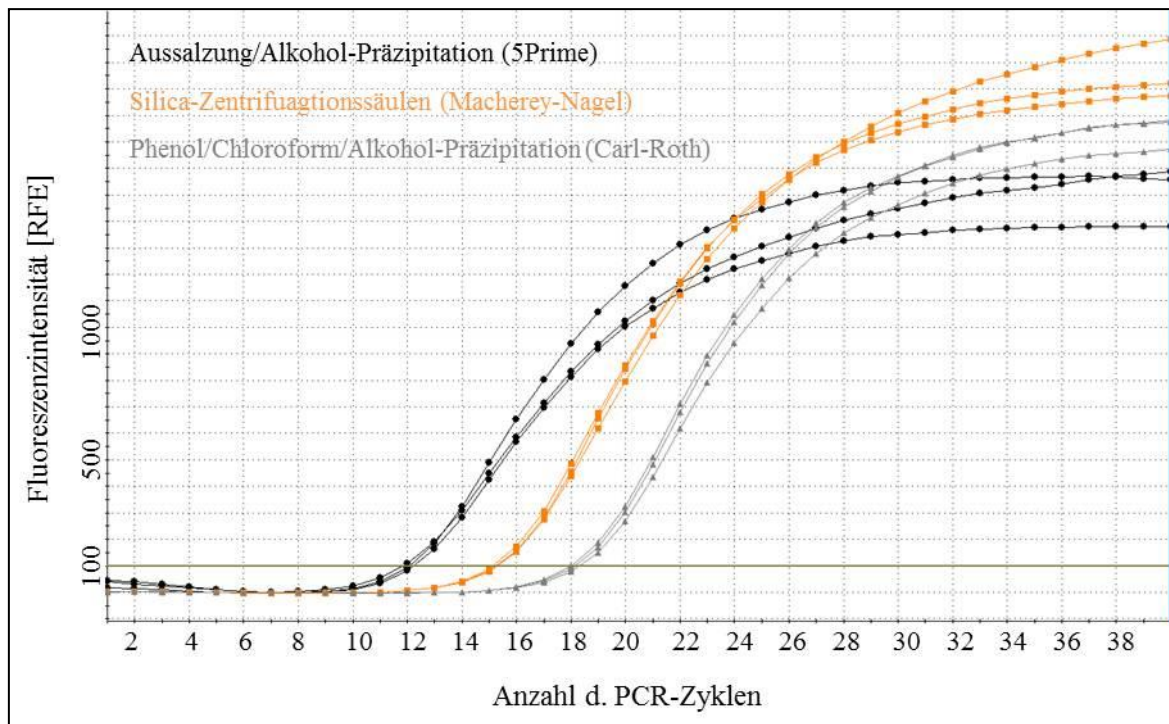


Abb. 27: Realtime PCR: Vergleich verschiedener Methoden zur DNA-Isolierung am Modellorganismus *E. coli*

Aus den Kurvenverläufen geht hervor, dass die DNA-Ausbeute unter Verwendung des Aussalzungs-/Präzipitations-Verfahrens (Ct-Mittelwert = 12,1) mit einer Ct-Differenz von 3,2 deutlich über der von Silica-basierten Methoden (Ct-Mittelwert = 15,3) liegt. Dies entspricht einem Sensitivitätsunterschied um den Faktor $2^{(3,2)} = 9,2$. Die Effizienz der Phenol-Chloroform-Extraktion (Ct-Mittelwert = 18,2) lag nochmals um den Faktor $2^{(2,9)} = 7,5$ unterhalb derer von Silica-basierten Methoden. Die vergleichsweise schlechte Ausbeute mit der phenolischen Aufreinigung ist vermutlich ein Resultat der zahlreichen Schritte, die eine Phasentrennung mit Überführung der wässrigen Phase implizieren, wobei durchaus mit Pipettierverlusten an den Phasengrenzen zu rechnen ist. Es wurden insgesamt zwei Extraktionsschritte mit Phenol/Chloroform und zwei Extraktions- bzw. Waschschrte mit Chloroform durchgeführt, wobei jeder einzelne Schritt nur mit Verlusten durchführbar ist. Die hohe Effizienz der Aussalzungs-/Alkohol-Präzipitationsmethode spricht für sich und ist unter Einsatz von Co-Präzipitatoren recht einfach durchführbar und kostengünstig. In Folgeversuchen sollte daher verstärkt die DNA-Fällung zum Einsatz kommen. Bezugnehmend auf die neu entwickelte Membrantransfer- und Auflöse-Methode lässt sich diese, nach erfolgter DNA-Extraktion aus der organischen Choroform-Phase in die wässrige Phase, gut mit einer alkoholischen DNA-Präzipitation kombinieren.

4.5 Neuer Ansatz zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen unter Verwendung der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation

Die entwickelte Problemlösung bis zu diesem Abschnitt ist schematisch in Abb. 21 dargestellt. Nach einer klassischen Membranfiltration durch eine Polycarbonat-Membran wird diese mithilfe eines organischen Lösungsmittels aufgelöst, um anschließend die DNA der aufgeschlossenen Zellen in die wässrige Phase zu extrahieren, zu fällen und am Ende mittels *realtime* PCR zu analysieren. Diese entwickelte Methode bietet dem Anwender bereits zahlreiche Vorteile hinsichtlich Handhabung und Kontaminationssicherheit, wenn man den Vergleich zieht zu den bereits bekannten Verfahren zur Prozessierung großvolumiger Proben für die PCR-Detektion (z.B. *GeneDisc DNA Extractor* von PALL, *Aquadien* von Bio-Rad, *AquaScreen Fast Extract* von Minerva Biolabs). Ziel der vorliegenden Arbeit ist ebenfalls die Implementierung einer Methode zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Keimen, um der wachstumsbasierten Membranfiltrationsmethode in nichts nachzustehen. Mit der in Abb. 21 dargestellten Methode ist eine Lebend-tot-Differenzierung prinzipiell nicht möglich, da bereits nach dem Filtrationsschritt das Auflösen der Membran in Chloroform dazu führt, dass ein Großteil der noch vitalen, auf dem Filter zurückgehaltenen Mikroorganismen inaktiviert wird und somit nicht mehr zwischen lebenden und toten Keimen unterschieden werden kann. Eine Kombination aus in vorherigen Abschnitten diskutierten Ansätzen könnte zu einer theoretisch geeigneten Lösung führen.

Anstelle der Kombination Polycarbonat-Membran und Chloroform könnte die bereits in Kapitel 4.2.3.2 erwähnte Kollagenmatrix und eine geeignete Kollagenase-Lösung zusammen mit der neu entwickelten Membrantransfer- und Auflöse-Einheit verwendet werden. Diese enzymatische Reaktion führt zwar zur Zerstörung des Filtermaterials, die zurückgehaltenen Mikroorganismen behalten aber ihre Viabilität, was bereits in einem Vorversuch an *E. coli* Zellen gezeigt werden konnte. Hierbei wurde ein Kollagenstanzling mit einer Kollagenase-Lösung und einer definierten Menge vitaler *E. coli* Zellen beaufschlagt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Auflösen der Filtermatrix wurden Aliquots auf Nähragar (Sartorius) ausplattiert und 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Koloniezahl am Folgetag ließ auf keinerlei Viabilitätsverluste durch den enzymatischen Verdau schließen. Basierend auf diesem Vorversuch folgte nun die Suche nach einer Möglichkeit zur Lebend-tot-Differenzierung innerhalb der vorliegenden Probe, bestehend aus gelöster Kollagenmatrix, Kollagenase-

Lösung (10 mg/ml Enzym gelöst in 1x PBS mit 3 mM CaCl_2) sowie lebenden und toten Mikroorganismen.

Während dieser Promotion entstand die Idee eines vollkommen neuen Ansatzes, der nicht wie die Mehrzahl der Verfahren eine Diskriminierung über Lebend-tot-Farbstoffe, wie Propidiumiodid oder Propidiummonoazid, vornimmt, sondern mithilfe der Amplifikationsreaktion an sich. Die Tatsache, dass einige isothermale Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden unter moderaten Bedingungen ($< 50\text{ }^\circ\text{C}$) ablaufen können und vollständig ohne Denaturierungsschritt auskommen, stellt die Grundlage des neuartigen Ansatzes dar. Dieser basiert auf der Hypothese, dass die Zellmembran von Mikroorganismen jegliche Form der durch den Experimentator herbeigeführten DNA-Amplifikation unterbindet, solange sie vollständig intakt ist. Sie ist für die Amplifikation-induzierenden Proteine und Primer nicht permeabel. Daher würde DNA lebender Zellen, wenn diese Zellen ohne vorherige DNA-Extraktion oder denaturierenden Hitzeschritt in eine auf unterhalb von $50\text{ }^\circ\text{C}$ konstant temperierte Amplifikationsreaktion eingesetzt würde, nicht vervielfältigt werden. Bei einer Standard-Polymerasekettenreaktion hingegen käme es aufgrund der hohen Temperaturen, die der DNA-Denaturierung dienen und bei etwa $95\text{ }^\circ\text{C}$ liegen, bei den meisten Mikroorganismen zur Zellyse. Findet die Amplifikationsreaktion unter „Wohlfühl-Bedingungen“ oder zumindest bei tolerierbaren Temperaturen für Mikroorganismen statt, bleiben diese intakt und von der Amplifikation ausgeschlossen und nur freie DNA bzw. DNA von Bakterien mit geschädigter Membranintegrität wird vervielfältigt.

Dieser Ansatz ermöglicht auch quantitative Aussagen, wenn gleichzeitig die DNA-Gesamtmenge der Probe nach erfolgter DNA-Extraktion oder vollständiger Inaktivierung der Mikroorganismen und ein zweites unbehandeltes Aliquot derselben Probe isothermal bestimmt werden. Im Anschluss kann die Lebendzellzahl durch Subtraktion der DNA-Menge toter Zellen von der DNA-Gesamtmenge bestimmt werden (siehe Abb. 28). Parallel ist es notwendig, stets eine Standardkurve mit bekannten DNA-Konzentrationen zu amplifizieren, um mithilfe der generierten Geradengleichung die absoluten quantitativen Zellzahlen bzw. Genomkopien zu ermitteln.

Für die geplante Anwendung wurde eine isothermale Amplifikationsmethode gesucht, die eine Detektion in Echtzeit und eine Quantifizierung erlaubt und idealerweise bei einer konstanten Temperatur zwischen 36 und $42\text{ }^\circ\text{C}$ arbeitet.

Der Großteil der isothermalen Amplifikationsmethoden, wie die *strand displacement amplification*, *loop-mediated isothermal amplification*, *helicase-dependent amplification* und *rolling circle amplification*, arbeitet allerdings bei Reaktionstemperaturen zwischen 60 und

65 °C, was bereits bei einigen Mikroorganismen zur Zellyse führt, und somit für die angestrebte Anwendung ungeeignet ist (Kim & Easley 2011).

Die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) hingegen hat ihr Temperaturoptimum bei 37 °C und bietet einen weiteren großen Vorteil mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von weniger als einer halben Stunde. Die Funktionsweise einer RPA ist in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Darüber hinaus sind bereits vollständige Kits über TwistDx erhältlich, die zwar bisher nicht auf Quantifizierbarkeit hin optimiert sind, aber das Potential dafür zeigen und bereits semiquantitative Aussagen ermöglichen. Im Gegensatz zur qPCR erfolgt die Quantifizierung bei der RPA nicht mithilfe von Ct-Werten, da keine definierten Temperaturzyklen durchlaufen werden. Bei der RPA wird stattdessen der Zeitpunkt bestimmt, bis ein bestimmter Fluoreszenz-Schwellenwert überschritten wird. Sowohl bei der qPCR als auch bei der RPA müssen Verdünnungsreihen mit bekannten DNA-Konzentrationen parallel amplifiziert werden, um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen.

Auf die beschriebene Idee, mithilfe einer konstant niedrig temperierten DNA-Amplifikation zwischen lebenden und toten Mikroorganismen zu unterscheiden, wurde bereits ein Patent erteilt, das beim Deutschen Patent- und Markenamt unter der Nummer DE102012014981B3 eingesehen werden kann (Erfinder: Alexandra Scholz; Titel: Verfahren zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen). In Abb. 28 ist der Gesamtprozess der Lebend-tot-Differenzierung zusammen mit der Probenvorbereitung schematisch dargestellt. Die Probenvorbereitung besteht aus einem Filtrationsschritt durch eine Kollagenmatrix mit anschließender enzymatischer Spaltung des Kollagens, um so eine flüssige Lösung zu erhalten, die eine DNA-Extraktion erlaubt.

Bei den ersten Versuchen kamen universelle bakterielle selbst entworfene Primer zum Einsatz. Hierfür wurden die 16 S rRNA Gensequenzen zahlreicher bakterieller Spezies wichtiger phylogenetischer Vertreter abgeglichen und nach homologen/konstanten Regionen gesucht, die trotzdem hoch spezifisch für das bakterielle Genom sind, um dort die Primer zu setzen. Prinzipiell sind RPA-Primer mit 30 bis 35 Basen deutlich länger als Standard-PCR-Primer. Die Amplikonlänge sollte zwischen 80 und 400 bp liegen. Ein ausgiebiges Primer-Screening ist generell ratsam.

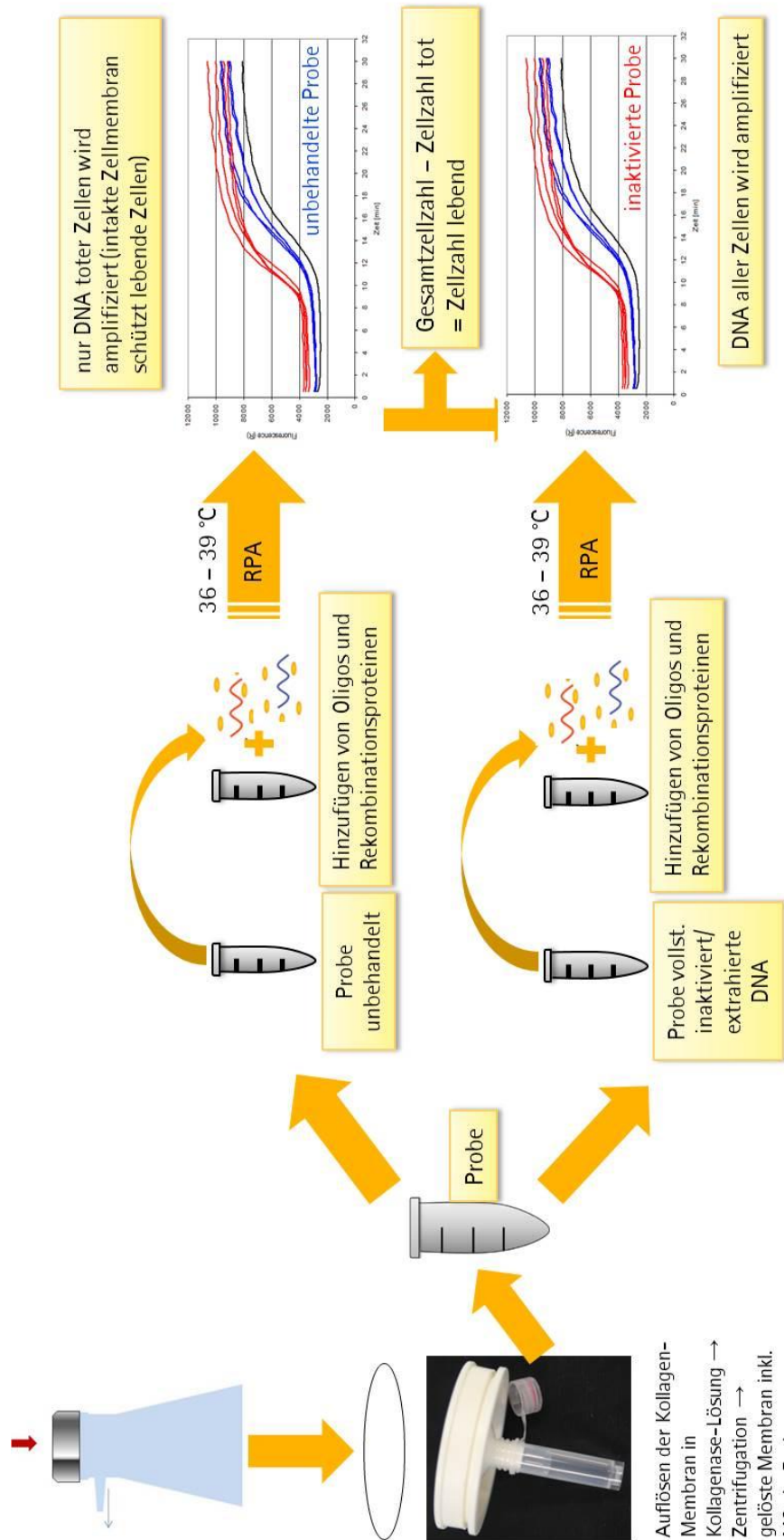


Abb. 28: Schematische Darstellung des neuen Ansatzes zur Lebend-tot-Differenzierung von Mikroorganismen mithilfe der RPA inkl. Probenkonzentrierung mithilfe eines enzymatisch auflösbaren Filters aus Kollagen

Ein Reaktionsansatz von TwistDx umfasst folgende Komponenten: 200 µl Reaktionsgefäße mit Rekombinase, SSB (*single strand binding protein*), DNA-Polymerase, *crowding agent* (z.B. Polyethylenglykol), Puffer, Reduktionsmittel, ATP oder ATP-Analogon, optional *recombinase loading protein*, Primer(n) und ggf. Sonde(n), Ziel-DNA sowie Magnesium.

Es wurde mit dem RPA-Kit TwistAmp fpg der Firma TwistDx gearbeitet, wobei ein Teil der genannten Komponenten bereits als gefriergetrocknetes Pellet in 200 µl Reaktionsgefäßen vorgelegt bereitgestellt wird. Der Anwender muss die Pufferlösung, seine eigenen Primer, ggf. eine Sonde, die Probe und Magnesium-Acetat (MgAc) zufügen, um den Reaktionsansatz zu vervollständigen.

Die Zusammensetzung eines 50 µl Reaktionsansatzes kann dem Anhang (Abschnitt 7.1.1.6) entnommen werden.

Eine RPA-Reaktion startet erst nach Zugabe von Magnesiumacetat, da Magnesium essentiell für die Aktivität der DNA-Polymerase ist. Um eine exakt gleiche Startzeit für parallel laufende Proben zu garantieren, wird MgAc in die Deckel der Reaktionsgefäße pipettiert, so dass mittels einer kurzen Zentrifugation das MgAc in alle Proben gleichzeitig überführt werden kann und somit alle Reaktionen parallel starten. Ein sogenannter Magnesium-Start ist notwendig, da RPA-Reaktionen auch bereits bei Raumtemperatur laufen, wenn auch mit geringerer Effizienz.

Um zu überprüfen, ob sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien nach einer 30minütigen isothermalen Amplifikation noch vital sind, wurde folgender experimenteller Versuchsaufbau gewählt: Jeweils eine Kultivierung von *B. subtilis* und *E. coli* wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (bei $OD_{600} \approx 0,8-1$) 1:100 in CASO-Bouillon verdünnt und 14,2 µl direkt in eine RPA-Reaktion mit der im Anhang beschriebenen Reaktionszusammensetzung (Abschnitt 7.1.1.6) bei 37 °C eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurden die vollständigen Reaktionsansätze, d.h. jeweils 50 µl, auf Nähragar (Sartorius) ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Innerhalb von 24 h kam es sowohl bei *E. coli* als auch bei *B. subtilis* zur Ausbildung eines Bakterienrasens, der sich optisch nicht von den Kontroll-Nähragar-Platten (ohne RPA-Reaktion) unterscheiden ließ. Somit konnte gezeigt werden, dass auch nach der isothermalen Amplifikation sowohl grampositive *B. subtilis* Zellen als auch gramnegative *E. coli* Zellen noch vital sind und keine inaktivierenden Substanzen oder Reaktionen während der Amplifikation ablaufen, was die Grundvoraussetzung für eine Lebend-tot-Differenzierung unter Verwendung dieser Methode darstellt.

Ob tatsächlich mithilfe einer niedrigtemperierten isothermalen Amplifikation zwischen lebenden und toten Mikroorganismen unterschieden werden kann, sollte der nächste Vorversuch zeigen. Zu diesem Zweck erfolgte zuerst eine qualitative Beurteilung der Bandendicken nach erfolgter RPA und Gelelektrophorese (siehe Kapitel 7.1.1.3). Als Testmaterial wurde das gramnegative Bakterium *E. coli*, sowohl in der exponentiellen Phase (bei $OD_{600} \approx 0,8-1$) und als auch nach vollständiger Inaktivierung mittels Ultraschall (10 min Ultraschallbad, 30 W von Elma), eingesetzt. Als Vertreter einer grampositiven Spezies kam *B. subtilis* zum Einsatz, in der stationären Phase aus einer Vorkultur stammend (siehe Abschnitt 4.1.1) sowie nach vollständiger Inaktivierung.

Die Amplifikation lief bei einer konstanten Reaktionstemperatur von 37°C über eine Dauer von 30 min. Die Zusammensetzung eines 50 µl Reaktionsansatzes kann dem Anhang (Abschnitt 7.1.1.6) entnommen werden. Es wurde 14,2 µl Probenmaterial unverdünnt pro Reaktion eingesetzt. Nach erfolgter Amplifikationsreaktion wurden die vollständigen Reaktionsansätze mithilfe einer Silica-basierten DNA-Isolierung (Microsart Amp Extraction Kit, Sartorius, Protokoll siehe Anhang, Abschnitt 7.1.1.4) für die anstehende Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 7.1.1.3) aufgereinigt.

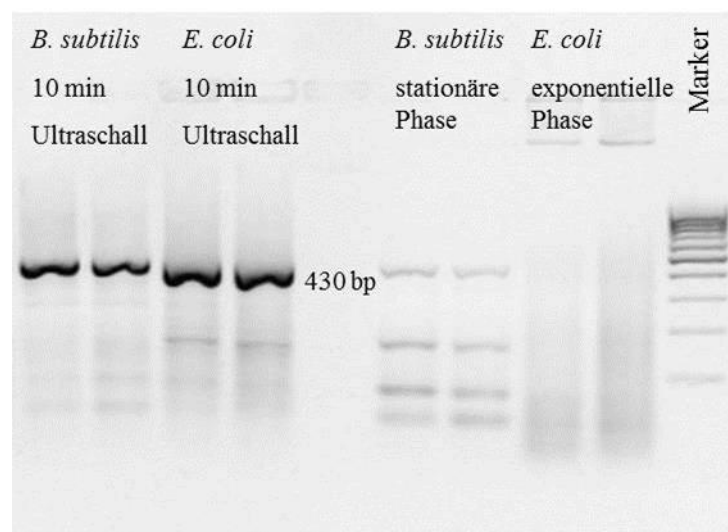


Abb. 29: Zielamplikon bei 430 Basenpaaren (bp) auf Agarosegel nach erfolgter RPA-Reaktion

Das Agarosegel Abb. 29 zeigt, dass eine *E. coli* Kultivierung in der exponentiellen Phase zu keiner DNA-Amplifikation und somit zu keinen Banden führt, da es sich um eine im Idealfall 100 % vitale Kultivierung handelt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine *B. subtilis* Kultivierung in der stationären Phase zu dünnen DNA-Banden (Amplikon bei 430 bp) führt, da es in der stationären Phase bereits zum Absterben von Zellen kommt. Zuvor inaktivierte *B. subtilis* und *E. coli* Proben (10 min Ultraschall) resultierten hingegen erwartungsgemäß in deutlich dickeren DNA-Banden bei 430 bp. Somit kann die Hypothese bestätigt werden, dass

die Amplifikation durch eine intakte Zellmembran unterbunden wird, aber DNA von Zellen mit gestörter Membranintegrität amplifiziert wird. Die kleineren DNA-Fragmente in Abb. 29 unterhalb von 430 bp sind das Resultat unspezifischer Amplifikationsreaktionen z.B. aufgrund der Bildung von Primer-Artefakten.

Um das Quantifizierungspotential dieser Methode zur Lebend-tot-Differenzierung aufzuzeigen, wurden die in Tab. 7 aufgeführten Proben jeweils in Dreifachbestimmung vergleichend mittels RPA analysiert.

Tab. 7: Versuchsaufbau zur Abschätzung des Lebend-tot-Quantifizierungspotentials der RPA

<i>Probe</i>	<i>Ausgangsmaterial</i>	<i>10 min Ultraschall</i>	<i>DNA-Auf- reinigung</i>	<i>DNA spike 6,5E+06 GE/Rkt.</i>	<i>RPA</i>
1	<i>E. coli</i> in exponentieller Phase bei OD ₆₀₀ ≈ 0,8-1 13,2 µl Probe/Rkt.	x			x
2	<i>E. coli</i> in exponentieller Phase bei OD ₆₀₀ ≈ 0,8-1 13,2 µl Probe/Rkt.	x	x		x
3	<i>E. coli</i> in exponentieller Phase bei OD ₆₀₀ ≈ 0,8-1 13,2 µl Probe/Rkt.			x	x
4	Wasser (PCR-Qualität) 13,2 µl/Rkt.			x	x

Eine Standardreihe mit quantifizierter genomischer DNA von *E. coli* sowie Negativkontrollen wurden parallel in der RPA amplifiziert. Zu den Negativkontroll-Reaktionen wurde Wasser (PCR-Qualität, Roche) anstatt der Probe pipettiert. Die Reaktion lief bei 37 °C über einen Zeitraum von 30 min hinweg, während im 30 Sekunden Rhythmus Fluoreszenzdaten aufgezeichnet wurden. Die Reaktionskomponenten mit den jeweiligen Mengenangaben sind im Anhang (Abschnitt 7.1.1.6) zu finden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt, wobei basierend auf den in Tab. 8 dargestellten Werten die in Abb. 30 abgebildete Standardgerade mit zugehöriger Geradengleichung entwickelt wurde. Mithilfe dieser Gleichung konnten anschließend, durch Einsetzen der Zeit bis zum Anstieg der Fluoreszenz über einen bestimmten Schwellenwert, die DNA-Konzentrationen der unbekannten Proben berechnet werden (siehe Tab. 9).

Experimenteller Teil

Tab. 8: Werte der Standardreihe unter Verwendung quantifizierter *E. coli* DNA

Quantifizierter DNA-Standard	Zeit bis zum Anstieg der Fluoreszenz [s] (Mittelwert, n=2)	Mittelwert Genomeinheiten [GE/Reaktion]
<i>E. coli</i> DNA-Standard 1:10 verdünnt	337	8,58E+07
<i>E. coli</i> DNA-Standard 1:100 verdünnt	398	8,58E+06
<i>E. coli</i> DNA-Standard 1:1000 verdünnt	419	8,58E+05

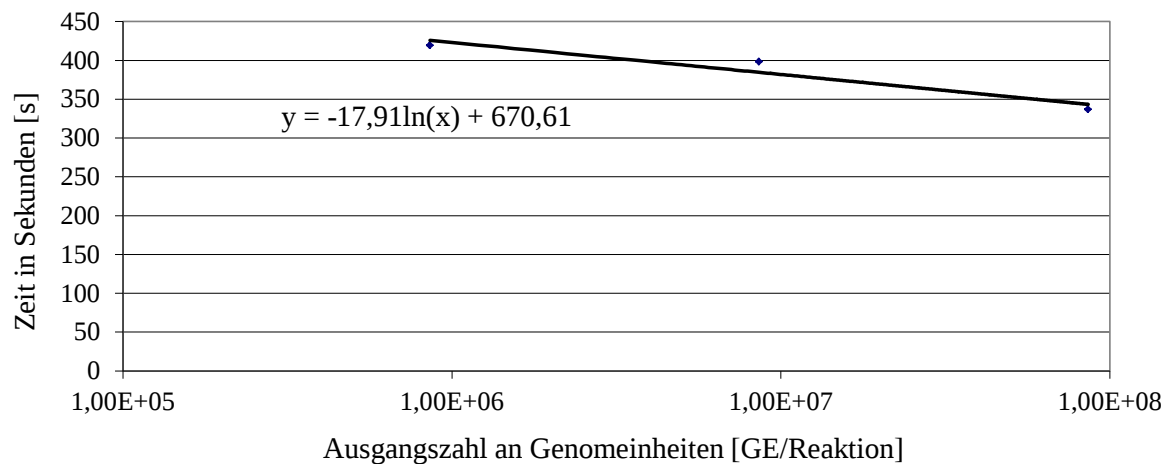


Abb. 30: Standardreihe unter Verwendung quantifizierter *E. coli* DNA

Tab. 9: Ermittelte Konzentrationen der Genomeinheiten pro Reaktion [GE/Rkt.]

Probenbezeichnung	Zeit bis Anstieg d. Fluoreszenz [s]	Mittelwert Genomeinheiten [GE/Rkt.]
1) <i>E. coli</i> nach 10 min Ultraschall	378	1,62E+07
	368	
	375	
2) <i>E. coli</i> nach 10 min Ultraschall + DNA-Isolierung	420	2,35E+06
	403	
	404	
3) <i>E. coli</i> exponentielle Phase + DNA spike 6,5E+06 GE	408	1,62E+06
	416	
	422	
4) H ₂ O + DNA spike 6,5E+06 GE	398	2,77E+06
	412	
	408	
Negativkontrollen	509	2,06E+04
	491	
	486	

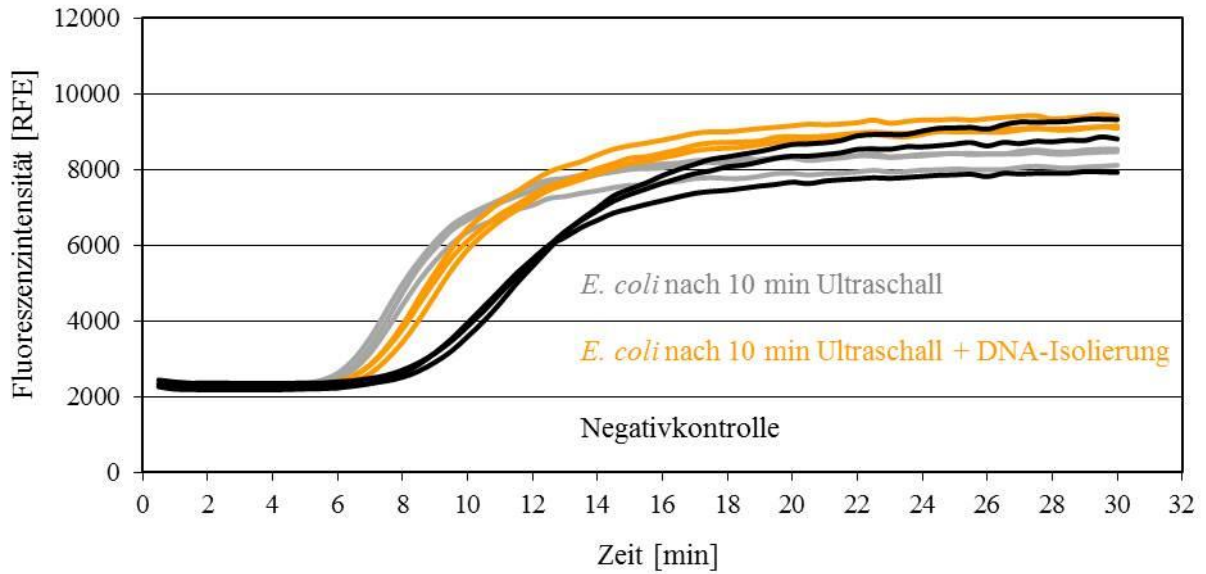


Abb. 31: Fluoreszenzkurven der Proben 1 und 2 sowie Negativkontrollen

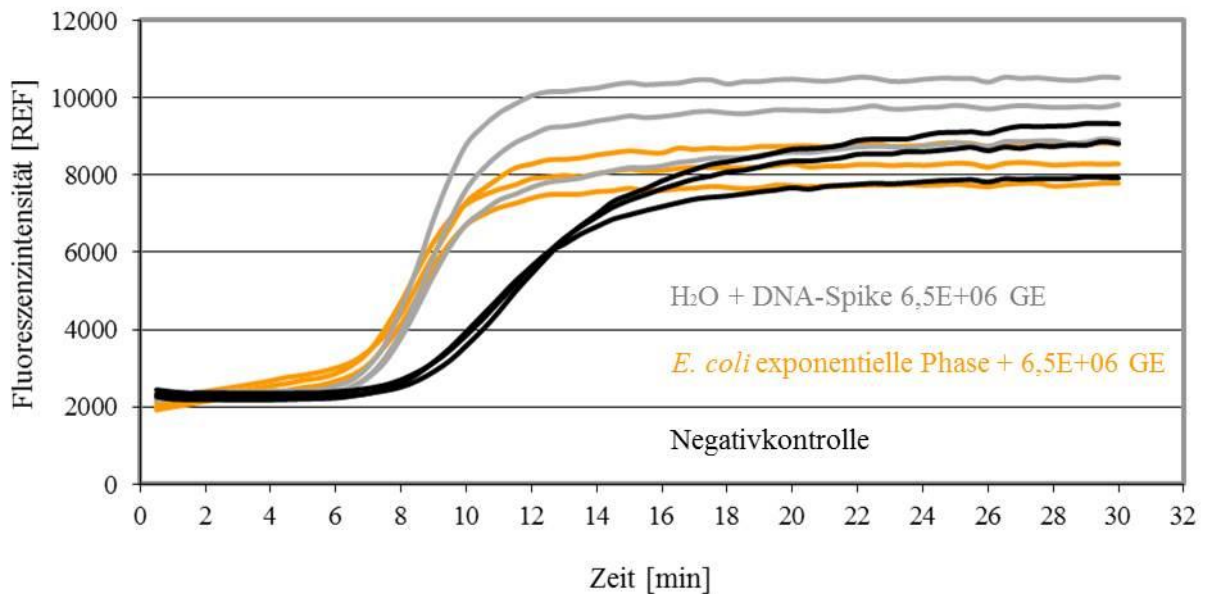


Abb. 32: Fluoreszenzkurven der Proben 3 und 4 sowie Negativkontrollen

Die Ergebnisse in Tab. 9 sowie Abb. 31 und Abb. 32 zeigen, dass die während dieser Promotion entwickelte Idee es ermöglicht, zumindest grob quantitativ zwischen lebenden und toten Mikroorganismen zu unterscheiden.

Zwischen den Proben 1 und 2 ist hinsichtlich Kurvenverlauf und ermittelter Konzentration an Genomeinheiten nur ein geringer Unterschied ersichtlich, der sich durch die DNA-Verluste im Rahmen der bei Probe 2 durchgeführten Silica-basierten DNA-Isolierung erklären lässt. Dieser Ansatz zeigte, dass sich die DNA von Bakterien mit gestörter Membranintegrität vollständig mittels RPA vervielfältigen lässt.

Die Kurvenverläufe von Probe 3 und 4 sowie die ermittelten Genomeinheiten-Konzentrationen sind nahezu identisch, was verdeutlicht, dass vitale Zellen während einer RPA-Reaktion intakt bleiben und deren DNA nicht amplifiziert wird.

Zwar zeigen die Negativkontrollen ebenfalls Signale während der Fluoreszenzdetektion, diese konnten jedoch zeitlich von den Proben differenziert werden und wurden daher nicht berücksichtigt. Diese Signale in den Negativkontrollen sind das Resultat von unspezifischen Amplifikationen, beispielsweise Primer-Artefakten, da für diese Versuche der unspezifische Farbstoff SYBR Green I zur Detektion zum Einsatz kam. Außerdem wurde bis zu diesem Zeitpunkt kein ausgiebiges Primer-Screening durchgeführt, da es sich ausschließlich um Vorversuche handelte, die die Funktionalität der Idee zeigen sollten. In zukünftigen Versuchen muss daher ein intensives Primer-Screening erfolgen, um optimale Primersequenzen für die Zielanwendung auszuwählen. Des Weiteren sollte von SYBR Green I auf spezifische Fluoreszenz-markierte Sonden umgestiegen werden, um die Signale in den Negativkontrollen zu vermeiden.

In einem weiteren Versuch wurde parallel zur RPA die Lebendzellzahlen mittels Ausplattieren auf Nähragar (Sartorius) bestimmt. Es wurden sowohl vollständig vitale als auch inaktivierte *E. coli* Proben jeweils in Vierfachbestimmung mittels RPA analysiert. Das Ausplattieren auf Sartorius Nähragar erfolgte in verschiedenen Verdünnungsstufen, um im auszählbaren Konzentrationsbereich des Koloniewachstums zu liegen. Bis zum Auszählen der gewachsenen Kolonien wurden die Proben 24 h bei 37 °C inkubiert.

Eine Standardkurve mit quantifizierter genomischer DNA und eine Negativkontrolle wurden auch hier parallel in die RPA eingesetzt. Im 30 Sekunden Rhythmus innerhalb von 30 min und bei einer konstanten Reaktionstemperatur von 37 °C wurden Fluoreszenzdaten aufgezeichnet. Das Pipettierschema einer RPA-Reaktion ist im Anhang (Abschnitt 7.1.1.6) zu finden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt, wobei basierend auf den in Tab. 10 dargestellten Werten die in Abb. 33 abgebildete Standardgerade mit zugehöriger Geradengleichung ermittelt wurde. Mithilfe dieser Gleichung konnten anschließend durch Einsetzen der Zeit bis zum Anstieg der Fluoreszenz über einen bestimmten Schwellenwert die DNA-Konzentrationen der unbekannten Proben berechnet werden (siehe Tab. 11). Der Schwellenwert wird stets mit der Fluoreszenzintensität zu Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase gleichgesetzt.

Experimenteller Teil

Tab. 10: Werte der Standardreihe unter Verwendung quantifizierter *E. coli* DNA

Quantifizierter DNA-Standard	Zeit bis zum Anstieg der Fluoreszenz [s] (Mittelwert, n=2)	Mittelwert Genomeinheiten [GE/Rkt.]
<i>E. coli</i> DNA-Standard 1:10 verdünnt	517	8,58E+07
<i>E. coli</i> DNA-Standard 1:100 verdünnt	586	8,58E+06
<i>E. coli</i> DNA-Standard 1:1000 verdünnt	615	8,58E+05

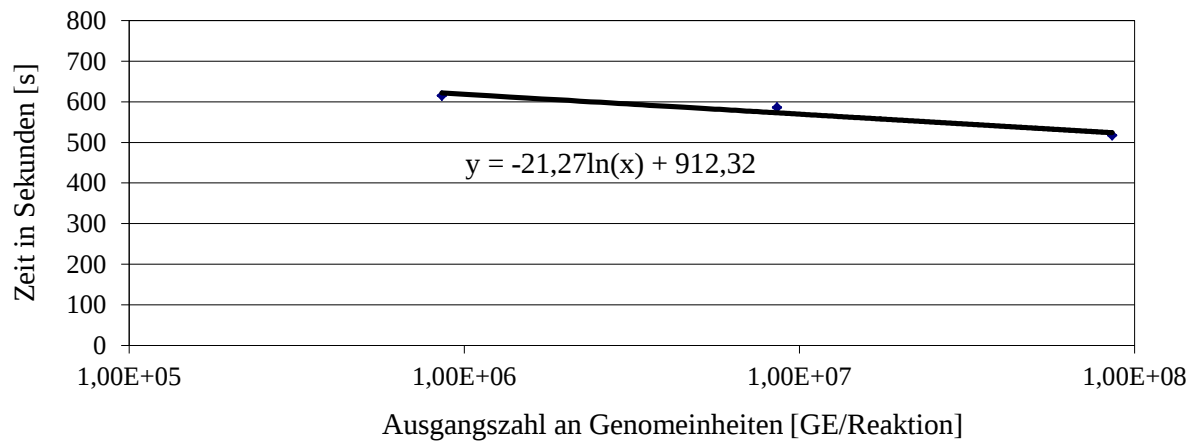


Abb. 33: Standardkurve unter Verwendung quantifizierter *E. coli* DNA

Tab. 11: Ermittelte Konzentrationen der Genomeinheiten pro Reaktion bzw. pro ml (13,2 µl Probe pro 50 µl Rkt.)

Probenbezeichnung	Zeit bis Anstieg d. Fluoreszenz [s]	[GE/Rkt.]	Mittelwert [GE/Rkt.]	Mittelwert GE/ml
<i>E. coli</i> 10 min Ultraschall = GE [Gesamt]	526	7,87E+07	4,60E+07	3,48E+09
	527	7,34E+07		
	549	2,66E+07		
	583	5,25E+06		
<i>E. coli</i> exp. Phase = GE[tot]	665	1,15E+05	2,12E+05	1,60E+07
	636	4,32E+05		
	656	1,73E+05		
	662	1,27E+05		
Negativkontrolle	677	6,53E+04	-	-

$$\text{GE[lebend]} = \text{GE[Gesamt]} - \text{GE[tot]} = (3,48\text{E}+09) - (1,60\text{E}+07) = 3,47\text{E}+09 \text{ GE/ml}$$

Die Daten aus Tab. 11 führen zu dem Ergebnis, dass die *E. coli* Kultur in der exponentiellen Phase 3,48E+09 lebende Zellen pro Milliliter enthielt und lediglich 0,46 % tote Bakterien (1,60E+07 GE/ml). Die zugehörigen Fluoreszenzkurven sind in Abb. 34 dargestellt.

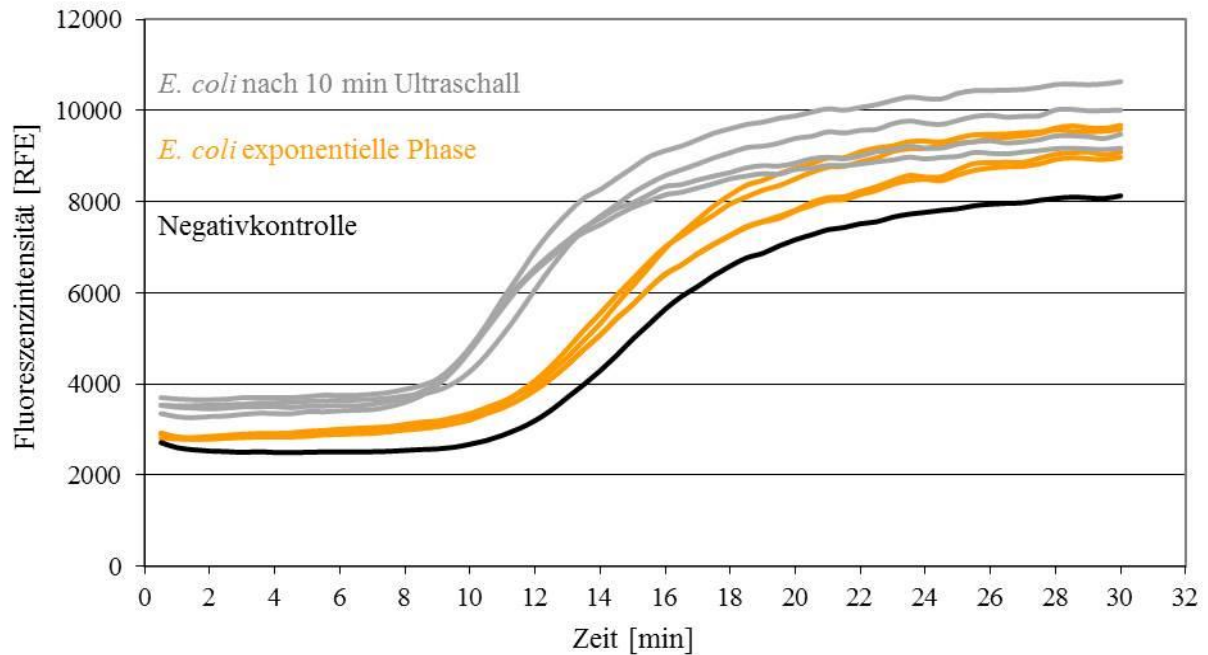


Abb. 34: Fluoreszenzkurven einer RPA mit vitalen und inaktivierten *E. coli* Zellen sowie Negativkontrollen

Durch Ausplattieren wurde eine Lebendzellzahl von *E. coli* in der exponentiellen Phase von etwa $5,0 \times 10^8$ KBE pro Milliliter ermittelt. Das parallele Ausplattieren auf Nähragar führte zu niedrigeren, aber plausiblen Ergebnissen, da davon auszugehen ist, dass nie 100 % der lebenden Bakterien anwachsen und Kolonien bilden, z.B. aufgrund des VBNC-Phänomens (*viable but nonculturable*). In ein VBNC-Stadium gehen zahlreiche Bakterien über, wenn ungünstige Umgebungsbedingungen herrschen. Es kommt zum Herunterfahren des Stoffwechsels, so dass das Wachstum auf Standard-Nähragar nicht mehr möglich ist. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass oft nicht eine Kolonie aus einem einzelnen Keim der Ausgangsprobe gewachsen ist, sondern auf mehrere, nicht vollständig separierte, Mikroorganismen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ergibt sich, dass eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen mittels RPA möglich ist. Wie exakt die Quantifizierungsergebnisse tatsächlich sind, wurde mithilfe einer Masterarbeit geklärt.

Im Zuge dieser Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung von DNA durch Reduzierung der Reaktionstemperatur ansatzweise möglich ist. Bei reduzierter Temperatur verbessert sich das Verhältnis der Intra-Assay-Varianz zur Auflösung der Signale, d.h. dass die Intra-Assay-Varianz geringer ist als die Abstände zwischen Kurvenverläufen unterschiedlich konzentrierter Proben einer logarithmischen Verdünnungsreihe. Die Intra-Assay-Varianz gibt hierbei die Abstände zwischen identischen Proben gleicher Konzentrationen an. Allerdings nimmt mit sinkender Reaktionstemperatur auch die Sensitivität des

Assays ab, was den Quantifizierungsbereich der RPA effektiv verkleinert, da vor allem die niedrigen Konzentrationen von Anwenderinteresse sind. Es konnte aber gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration an Magnesiumacetat und auch die Fragmentierung der verwendeten gDNA Potential besitzen, das Assay hinsichtlich Sensitivität zu verbessern. Daher erscheint, nach weiterer Optimierung der Zusammensetzung der Reaktionskomponenten, die quantitative Anwendung der RPA denkbar. (Masterarbeit Kukuk 2013)

Die Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass die Vervielfältigung der DNA durch eine intakte Zellmembran verhindert wird. Prinzipiell kann zwischen Proben mit extrahierter DNA und Proben, welche das Äquivalent der Genomeinheiten als lebenden Zellen enthalten, unterschieden werden. Bei der Verwendung zuvor inaktivierter Zellen im Rahmen der RPA wurde deutlich, dass der Grad der Beschädigung der toten Zellen die Effizienz der RPA beeinflussen kann. DNA von Zellen, die durch Ultraschall inaktiviert worden waren, wurde besser quantifiziert als die DNA aus Ethanol-inaktivierten Zellen. Diese Beobachtung stimmt auch mit den durch Fluoreszenzmikroskopie erhaltenen Ergebnissen überein, wonach durch Ultraschall teilweise eine vollständige Zerstörung/Fragmentierung der Zelle auftritt, wohingegen nach einer Ethanol-Inaktivierung noch vollständige aber nicht mehr vitale Zellen bzw. Zellverbände zu erkennen sind. (Masterarbeit Kukuk 2013)

Dementsprechend ist die Tatsache, dass die DNA einer Zelle durch RPA nicht vervielfältigt wird, noch kein stringentes Kriterium für die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen. Demnach soll in zukünftigen Versuchen überprüft werden, ob eine zusätzliche Membrandestabilisierung durch die Zugabe von beispielsweise Natrium-Deoxycholat zur besseren Amplifizierbarkeit der nur geringfügig beschädigten, jedoch nicht mehr vitalen, Zellen führt. Laut einigen Publikationen wurden bereits Deoxycholate erfolgreich zur weiteren Membrandestabilisierung geschädigter Zellen verwendet, um die Aufnahme von Lebend-/Tot-Farbstoffen zu verbessern, wohingegen vitale Zellen durch die niedrig konzentrierte Natrium-Deoxycholat-Behandlung unbeeinflusst blieben (Lee & Levin 2009; Fittipaldi et al. 2012). Diese Hypothese sollte im Rahmen einer separaten wissenschaftlichen Arbeit untersucht und ggf. bestätigt werden.

4.6 Untersuchungen zur DNA-Abreicherung von Verbrauchsartikeln und Reagenzien

Im Kapitel 2 „Zielsetzung“ wurde eingangs erwähnt, dass das Fernziel eine Gesamtkeim-PCR inklusive Probenvorbereitung ist. Die Etablierung einer sogenannten *total count* PCR gestaltet sich sehr schwierig, nicht umsonst ist bisher keine sensitive *realtime* PCR zur Gesamtkeim-Detektion auf dem Markt erhältlich. Bei der Entwicklung eines solchen Kits haben Wissenschaftler immer wieder mit falsch positiven Signalen zu kämpfen, die das Resultat von geringsten DNA-Kontaminationen der Reagenzien, des Verbrauchsmaterials oder der räumlichen Umgebung sind. Bei dem in Kapitel 4.1 vorgestellten Kit, *UniTOOL Resolight*, handelt es sich um eine bereits ausgiebig optimierte Gesamtkeim-PCR, deren Reagenzien speziellen DNA-Abreicherungsprozessen unterzogen werden. Nichtsdestotrotz treten auch hier regelmäßig Signale in den Negativkontrollen auf, was auch der Grund ist, weshalb das Kit bisher nicht kommerziell erhältlich ist. Bei der Ergebnisauswertung muss stets ein *cut off* Ct-Wert definiert werden, der bestimmt, ab wann ein Signal bzw. eine Probe negativ ist und somit keine nachweisbare DNA enthält. Zur Festlegung des *cut off* müssen pro PCR-Lauf fünf Reaktionen mit jeweils 100 Plasmiden eines im Kit enthaltenen Standards und fünf PCR-Negativkontrollen parallel zu den eigentlichen Proben getestet werden. Der Kurvenverlauf mit dem höchsten Ct-Wert der 100-Plasmid-Reaktionen bestimmt den *cut off*, indem dieser Ct-Wert um ein Ct erhöht wird ($Ct + 1 = cut\ off$). Damit ein PCR-Lauf als gültig akzeptiert wird, müssen mindestens vier der fünf PCR-Negativkontrollen höhere Ct-Werte aufweisen als der definierte *cut off*. Ist ein PCR-Lauf gültig, so sind sämtliche unbekannte Proben negativ, deren Ct-Werte höher sind als der *cut off* Wert. Dieser beschriebene Auswertungsprozess ist zwar funktional, aber nicht anwenderfreundlich.

Wenn bereits während des relativ kurzen Prozesses des Ansetzens einer PCR bzw. durch die PCR-Reagenzien und Verbrauchsartikel selbst ein hohes Kontaminationsrisiko besteht, ist es nachvollziehbar, dass ein komplexer Gesamtprozess aus Probenkonzentrierung, DNA-Isolierung und PCR ein noch einmal deutlich erhöhtes DNA-Kontaminationsrisiko mit sich bringt. Generell ist bakterielle DNA ubiquitär, so dass universelle Primer fast immer und überall einen komplementären DNA-Strang für die Amplifikation finden.

Dies wird auch deutlich, wenn man sich die in Abb. 35 visualisierten Ergebnisse ansieht. Es wurde das in Abb. 21 dargestellte Verfahren zur Probenvorbereitung verwendet und anschließend die isolierte DNA mittels *UniTOOL* PCR analysiert. Es wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe einer *E. coli* Kultivierung in DNA-freiem Reinstwasser

(Arium Pro VF, Sartorius) hergestellt, wobei die am höchsten konzentrierte Probe eine 1:100 Verdünnung aufwies. In Abb. 35 wird ersichtlich, dass bereits ab der Verdünnungsstufe von 1:10⁴ (entspricht etwa 10⁴ Zellen/ml) keine eindeutige Differenzierung mehr zwischen den Proben aller höheren Verdünnungsstufen und den Gesamtprozess-Negativkontrollen möglich ist, da der Gesamtprozess mit all seinen Reagenzien und Verbrauchsartikeln zu stark mit DNA vorbelastet ist. Somit besteht großer Optimierungsbedarf hinsichtlich der DNA-Abreicherung des Gesamtprozesses, um eine höhere Sensitivität für die Detektion des eigentlichen Probenmaterials zu erreichen.

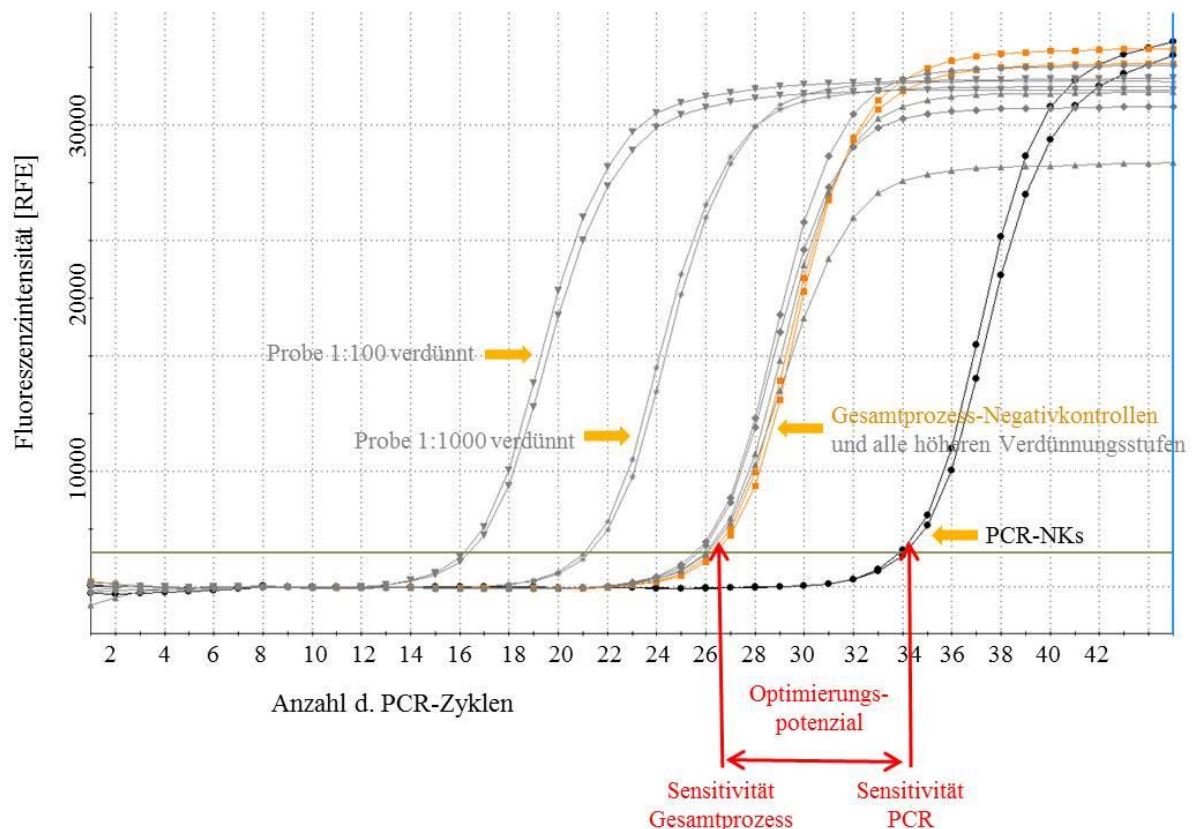


Abb. 35: *E. coli* Verdünnungsreihe laut Abb. 21 prozessiert zeigt geringe Sensitivität aufgrund hoher DNA-Belastung des Gesamtprozesses

Dass die geringe Sensitivität an der starken DNA-Kontamination und nicht an der Probenaufbereitungsmethode an sich liegt, zeigt der folgende Versuch (siehe Tab. 12 und Abb. 36). Es wurden 100 ml Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) mit etwa 10³ *Legionella pneumophila* Zellen versetzt und einerseits, wie in Abb. 21 beschrieben, analysiert und andererseits nach einer Methode bearbeitet, die den bereits optimierten Stand der Technik beschreibt. Der aktuelle Stand der Technik ist in Kapitel 3.3 beschrieben.

Bei dem bereits optimierten Stand der Technik wurden Polycarbonat-Membranen nach dem Filtrationsschritt mit Lysepuffer abgespült, und jeweils die gesamte Spüllösung (Lysat) durch mehrfaches Beladen der Zentrifugenröhrchen in eine Silica-basierte DNA-Isolierung

eingesetzt. Bei einem Standardprotokoll nach dem aktuellen Stand der Technik hätte man lediglich mit einem Aliquot der Probe gearbeitet und die Silica-Säule nur einmal befüllt.

Spalte drei und vier in Tab. 12 zeigen die Ct-Einzel- und Mittelwerte der für Legionellen-DNA spezifischen *AquaScreen* PCR. Hierbei wird die hohe Sensitivität der neu entwickelten Methode ersichtlich, da der mittlere Ct-Wert sogar niedriger liegt als der Ct-Mittelwert des bereits optimierten Stands der Technik. Sowohl die PCR-Negativkontrollen als auch die Gesamtprozess-Negativkontrollen zeigen keine Signale, da das PCR-Assay hoch spezifisch für Legionellen DNA ist und die zuvor erwähnte hohe DNA-Kontamination des Gesamtprozesses mit hoher Wahrscheinlichkeit frei von Legionellen DNA ist. Betrachtet man hingegen die 5. Spalte der Tabelle, wird ersichtlich, dass unabhängig von der gewählten Methode keine Differenzierung zu den Gesamtprozess-Negativkontrollen möglich ist, da das Kontaminationslevel ubiquitärer DNA zu hoch ist und durch das *UniTOOL* Assay amplifiziert und detektiert wird. Gleiches ist grafisch in Abb. 36 zu erkennen.

Somit ist die neu entwickelte Methode zur Probenvorbereitung zwar prinzipiell sensitiv und bietet eine hohe Prozesseffizienz, jedoch ist sie noch nicht kombinierbar mit einer sensitiven Gesamtkeim-PCR, wie dem *UniTOOL* Assay. Zuvor muss der Gesamtprozess DNA-frei gestaltet werden.

Tab. 12: Ct-Werte; 10^3 *Legionella pneumophila* Zellen prozessiert gemäß Abb. 21 und gemäß optimierten Stand der Technik; Analyse mit *AquaScreen* PCR und *UniTOOL* PCR

Probenbezeichnung	Zellen pro 100 ml (Neubauer- kammer)	Ct-Werte <i>AquaScreen</i> PCR	Ct-Mittelwerte <i>AquaScreen</i> PCR	Ct-Werte <i>UniTOOL</i> Gramneg.
PCR-NK	/	Kein Signal	Kein Signal	Kein Signal
		Kein Signal		35,27
		Kein Signal		34,18
		Kein Signal		Kein Signal
Gesamtprozess- Negativkontrolle	/	Kein Signal	Kein Signal	26,46
		Kein Signal		25,66
<u>optimierter</u> Stand der Technik (Polycarbonat-Membran mit Lysepuffer abspülen u. gesamtes Lysat in Silica-basierte DNA- Isolierung einsetzen)	1,30E+03	33,45	32,7	26,74
		31,94		26,82
		32,67		26,61
		33,58		26,31
		30,35		25,95
Methode nach Abb. 21	1,30E+03	31,50	31,5	25,23
		31,49		25,55
		31,78		25,63
		31,30		25,47
		31,54		25,49

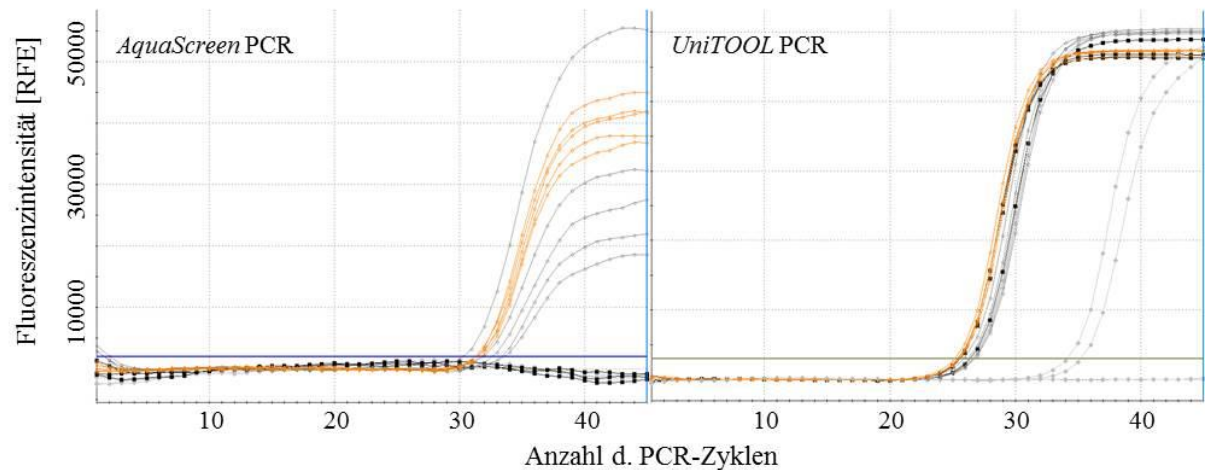


Abb. 36: Amplifikationskurven; Links: 10^3 *L. pneumophila* Zellen gemäß Abb. 21 prozessiert (orange) und gemäß optimierten Stand der Technik (grau), Analyse mit AquaScreen PCR; Rechts: 10^3 *L. pneumophila* Zellen gemäß Abb. 21 prozessiert (orange) und gemäß optimierten Stand der Technik (grau), Analyse mit UniTOOL PCR; PCR-NKs (hellgrau); Gesamtprozess-Negativkontrollen (schwarz)

Methoden zur DNA-Abreicherung, um den Gesamtprozess der Probenvorbereitung DNA-frei zu gestalten

Es wurden diverse Methoden zur DNA-Abreicherung hinsichtlich Effizienz und Eignung betrachtet. Eine DNA-Abreicherungsmethode muss DNA-Kontaminationen in sehr kleine, nicht mehr amplifizierbare Fragmente zerkleinern und darf trotzdem nicht den darauf folgenden Prozess der Probenvorbereitung bzw. der anschließenden PCR-Reaktion inhibieren oder stören. Idealerweise sollten die Fragmente 83 bp-länge nicht überschreiten, da das UniTOOL Kit Amplikonlängen zwischen 83 und 105 bp generiert (Grampositiv 83-85 bp; Gramnegativ 105 bp; Fungi 91 bp). Dass diese Aufgabe nicht trivial ist, wird daran ersichtlich, dass beispielsweise das Unternehmen AppliChem in einer *application note* folgende Aussage tätigt: „AppliChem bietet hochreine Reagenzien und Mastermixe an, die nachweislich frei von bakterieller DNA sind (garantiert für Amplifikate > 220 bp).“ (AppliChem 2010).

Das neu entwickelte Verfahren, dass in Abb. 21 dargestellt ist, soll der Einfachheit halber im Folgenden nur noch als „Sartorius Sample Prep“ bezeichnet werden. Die einzelnen Schritte im Detail des Gesamtprozesses inklusive sämtlicher benötigter Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang (Abschnitt 7.1.1.5) dieser Arbeit beschrieben. Um eine DNA-freie Umgebung zu schaffen, wurden sämtliche Pipettierschritte unter einer *laminar flow* Werkbank durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden alle UV-stabilen Materialien, wie beispielsweise Pipetten, Filterspitzen oder Ständer für die Reaktionsgefäße mindestens eine halbe Stunde unter der *laminar flow* Werkbank mit UV bestrahlt und zusätzlich mit DNA RemoverTM von

Minerva Biolabs abgewischt. Alle Verbrauchsmaterialien wurden einer Ethylenoxid-Begasung unterzogen, bei 25 °C, 3,5 bar, 120 min, 40 % Feuchte, 15 % Ethylenoxid (ETO) und 85 % CO₂. Ethylenoxid dringt sehr leicht in Zellen ein, wo es mit Molekülen, die ein labiles Wasserstoff-Atom enthalten, unter Bildung einer Hydroxyethyl-Gruppe reagiert. So begünstigt ETO beispielsweise die DNA-Alkylierung, was zu DNA-Strangbrüchen führen kann. Eines der Hauptprodukte ist hierbei N7-Hydroxyethylguanin (Setlow et al. 1998).

Das Potential der ETO-Behandlung zur DNA-Abreicherung wurde mit hochkonzentrierter, genomischer, lyophilisierter *E. coli* DNA überprüft. Hierfür wurde genomische DNA in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gefriergetrocknet und im Anschluss die geöffneten Gefäße in einer Begasungskammer mit ETO begast. Die DNA wurde in 10 mM Tris-HCl rehydratisiert und mittels Gelelektrophorese analysiert. Parallel dazu wurde das gleiche Probenmaterial analog, aber ohne ETO-Begasung prozessiert. Wie bereits erwähnt, kann DNA-Alkylierung zu DNA-Strangbrüchen führen, muss aber nicht. Nichtsdestotrotz ist alkylierte DNA für die DNA-Polymerase nicht amplifizierbar, so dass das Alkylierungsmaß der DNA durch ETO ein Maß für die Effizienz der ETO-Behandlung ist, DNA abzureichern. Trägt man die ETO-begaste DNA demnach direkt auf ein Agarosegel auf, würden die Fragmentgrößen lediglich den zufälligen Strangbrüchen entsprechen, nicht aber dem tatsächlichen Alkylierungsgrad. Eine zusätzliche Piperidin-Behandlung führt dazu, dass sämtliche durch ETO alkylierte Basen entfernt werden und es somit zu Strangbrüchen kommt. Daher zeigt ein zusätzlicher Piperidin-Schritt die tatsächliche Effizienz einer ETO-Begasung an und dient nicht der DNA-Abreicherung, sondern nur als Bestätigungsschritt für die Effektivität von ETO (Setlow et al. 1998). Das in Abb. 37 dargestellte Gelfoto einer Agarose-Gelelektrophorese zeigt in den Spuren zwei bis vier genomische DNA ohne ETO-Begasung und in den Spuren fünf bis acht ETO-begaste DNA. Die Spuren neun bis 15 zeigen die gleichen Proben wie die Spuren der linken Gelhälfte jedoch mit zusätzlicher Piperidin-Behandlung. Die Fragmentgrößen der rechten Gelseite (grünfarbener Rahmen) sind ein Maß für den „natürlichen“ bzw. durch ETO-induzierten Alkylierungsgrad der DNA. Es ist ersichtlich, dass die Fragmentgrößen in den Spuren 12 bis 15 deutlich kleiner sind als 100 Basenpaare und dass nur sehr schwache Banden erkennbar sind, was auf ein hohes Potential zur DNA-Abreicherung mittels ETO schließen lässt. Zusätzlich wurden die ETO-begasten Proben in die *UniTOOL realtime* PCR eingesetzt. Hierbei wurde kein von den PCR-Negativkontrollen differenzierbares Signal generiert. Sämtliche Proben zeigten laut der im vorherigen Kapitel erläuterten *cut off* Definition ($Ct > Ct_{100Plasmide} + 1$) kein positives Signal, so dass ETO gut zur DNA-Abreicherung von Verbrauchsartikeln geeignet ist.

Diese Erkenntnis wurde ebenfalls durch die Firma Roche Diagnostics bestätigt, die viel Erfahrung auf dem Gebiet hat und bereits zahlreiche hochreine, DNA-freie Kits und Verbrauchsmaterialien anbietet. Bereits im Jahr 2005 hat Roche Diagnostics einen definierten ETO-Prozess zur DNA-Abreicherung von Einweg-Artikeln erfolgreich zum Patent angemeldet (Engel et al. 2009).

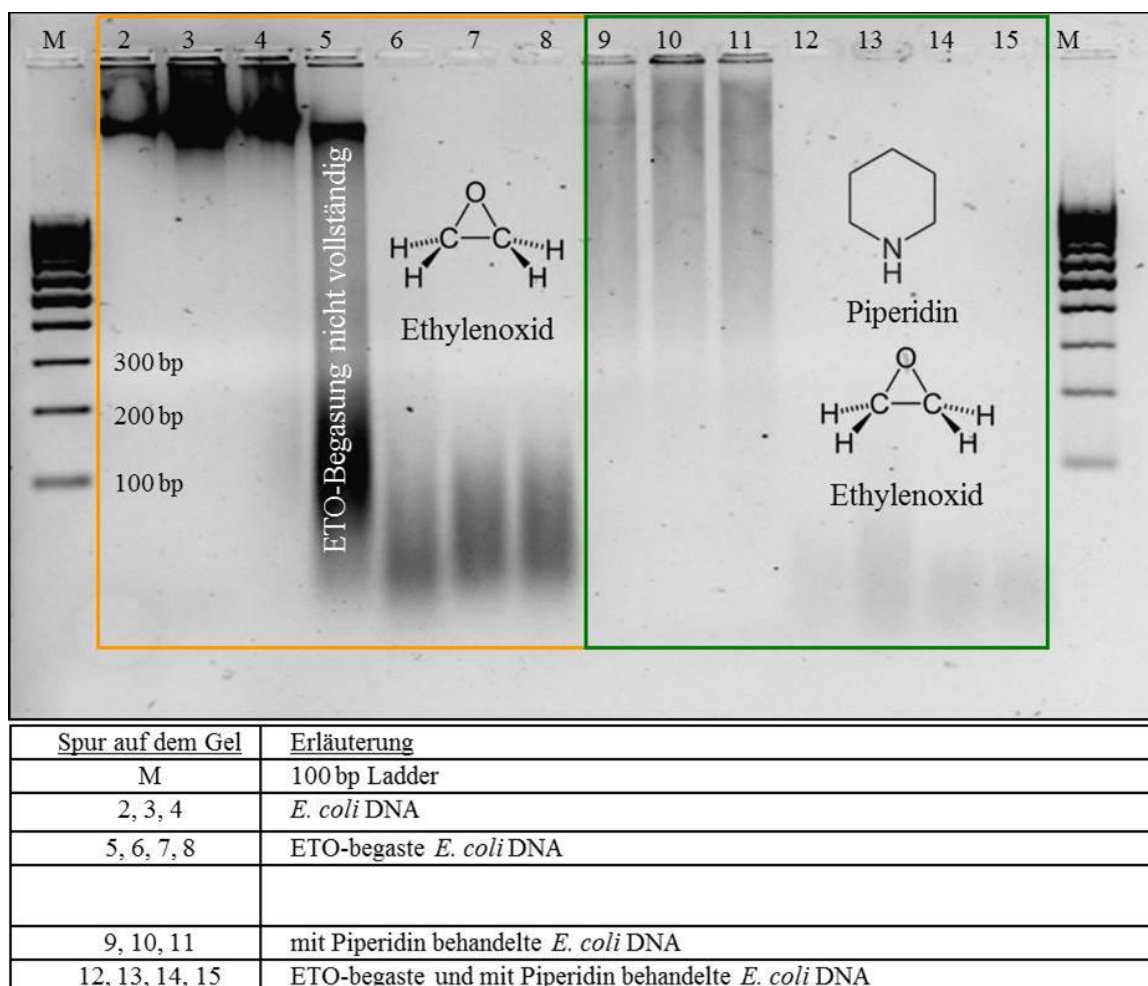


Abb. 37: Auswertung Gelelektrophorese: Bewertung des DNA-Abreicherungspotentials von ETO

ETO ist sehr gut geeignet für trockene und feste Materialien, nicht aber für Flüssigkeiten. Daher muss im Rahmen der Sartorius Sample Prep für die DNA-Abreicherung der Reagenzien nach einer anderen Methode gesucht werden, die trotzdem nicht die Funktionalität der verschiedenen Reagenzien negativ beeinflusst. In Tab. 13 sind die verschiedenen Reagenzien der Sartorius Sample Prep (SSP) zusammen mit den Verfahren, die zur DNA-Abreicherung des jeweiligen Reagenz getestet wurden, aufgelistet.

Tab. 13: Reagenzien der Sartorius Sample Prep (SSP) und jeweils getestete Verfahren zur DNA-Abreicherung

<i>Reagenz d. Sartorius Sample Prep (SSP)</i>	<i>DNase</i>	<i>Ultra-schall</i>	<i>ClO₂</i>	<i>Propidium monoazid</i>	<i>Sartobind Membrane Adsorbers</i>	<i>Viva-spin 100kDa</i>	<i>SSP ohne 3/5/8</i>
Chloroform (1)	x	x	x	x	x	x	-
Lysepuffer (2)	x	x	x	x	x	x	-
Silikonpaste (3)	-	-	-	-	-	-	x
Isopropanol (4)	x	x	x	x	x	x	-
Co-Präzipitator (5)	-	x	-	-	-	-	x
70 % Ethanol (6)	x	x	x	x	x	x	-
DNA-Rehydratisierungspuffer (7)	x	x	x	x	x	x	-
<i>Pressure sensitive adhesive, PSA</i> (8)	-	-	-	-	-	-	x

Nicht jedes der acht notwendigen Reagenzien ist kompatibel mit den sechs aufgeführten Methoden zur DNA-Abreicherung. So kann beispielsweise keines der genannten Verfahren für Silikonpaste angewendet werden aufgrund der sehr hohen Viskosität. Die einzige bisher "getestete Variante" war das Weglassen der Silikonpaste im Gesamtprozess, um eine DNA-Kontamination eben durch diese Komponente auszuschließen. Ähnliches gilt für den Co-Präzipitator, der für die Ausbildung eines gut sichtbaren Pellets bei der DNA-Präzipitation verantwortlich ist und für die Klebeschichtung (PSA) der Membrantransfer- und Auflösungseinheit. Hier wurde ebenfalls durch Weglassen dieser Komponente die DNA-Kontamination ausgeschlossen, außerdem war im Fall des DNA-Co-Präzipitators auch die Behandlung in einem Ultraschallbad möglich. Der DNA-Co-Präzipitator wird nur in solch geringen Mengen eingesetzt (etwa 2 µl pro Probe), dass eine chemische oder enzymatische Methode oder die Abreicherung mithilfe einer Filtration ungeeignete Verfahren sind.

Bei der DNase-Behandlung (RQ1 DNase von Promega) wurde mit einer Enzymkonzentration von 50 Units/ml gearbeitet. Nach einem mindestens 30minütigen Inkubationsschritt folgte die Inaktivierung des Enzyms bei 60 °C über 10 min nach Zugabe von 20 mM EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*). Eine effektive Inaktivierung ist besonders wichtig, da die Reagenzien später zur Probenvorbereitung im Vorfeld einer PCR genutzt werden sollen und die eigentliche nachzuweisende DNA-Probe keinen Schaden aufgrund von noch vorhandener Restaktivität der DNase erleiden soll.

Chlordioxid wurde in einer Konzentration von 0,85 mg/ml eingesetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte durch die Zugabe einer NaSO₃-Lösung. Durch Zugabe von Natriumsulfit im sauren Medium (< pH4) erfolgt die Reduktion bis zum Chlorid.

Propidiummonoazid (PMA) wurde mit einer Arbeitskonzentration von 40 µg/ml dosiert, 10 min bei Raumtemperatur mit den verschiedenen Reagenzien inkubiert und anschließend durch Photoaktivierung über 20 min inaktiviert.

Sartobind Q pico (Sartorius) sind Membranadsorber in Form von Spitzenvorsatzfiltern, durch die die zu reinigende Lösung hindurchfiltriert wird. Bei den Vivaspin 15R (100kDa, Sartorius) handelt es sich ebenfalls um eine Filtrationsmethode, um DNA-freie Reagenzien zu erhalten.

Des Weiteren wurde der Versuch unternommen, die kontaminierende DNA mittels Ultraschall so stark zu fragmentieren, dass sie nicht mehr amplifizierbar ist. Hierfür wurden die Reagenzien über einen untypisch langen Zeitraum von 30 min im Ultraschallbad (30 W von Elma) beschallt.

Lediglich die zwei Methoden, Chlordioxid- und DNase-Behandlung, zeigten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich DNA-Abreicherung. Später erwies sich ClO₂ inklusive NaSO₃-Inaktivierung ebenfalls als ungeeignet, da PCR-Inhibitoren bis hin zur PCR-Analyse mitprozessiert wurden, wodurch es während der PCR zu einer Total-Inhibierung kam. Erfolgte die DNA-Abreicherung sämtlicher Sartorius Sample Prep Reagenzien mithilfe von DNase und die Abreicherung der Verbrauchsartikel mit ETO, konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Die Kurvenverläufe und Ct-Werte sind in Abb. 38 dargestellt. Die Ct-Werte der Gesamtprozess-Negativkontrollen (Extraktionskontrollen) liegen trotz DNase-Behandlung der Reagenzien bei etwa $Ct \approx 27$ und somit 6 Ct-Einheiten vor dem *cut off* ($32,24 + 1 \approx 33$), der angibt, ab wann ein Amplifikationssignal als negativ zu werten ist. Somit ergibt sich ein Faktor von $2^6 = 64$ zwischen dem *cut off* und den Gesamtprozess-Negativkontrollen (mit DNase-Behandlung) hinsichtlich der detektierten DNA-Konzentration.

Zu berücksichtigen ist, dass die PCR zur Detektion gramnegativer Bakterien-DNA besonders anfällig für falsch positive Ergebnisse ist, da zum einen die verwendeten rekombinanten Enzyme aus *E. coli* Kulturen gewonnen werden und zusätzlich die DNA vor allem gramnegativer Bakterien fast allgegenwärtig ist. Betrachtet man die Gesamtprozess-Negativkontrollen der Fungi und grampositiven PCR, zeigen diese deutlich spätere Signale. Doch auch hierbei handelt es sich mit Sicherheit um starke DNA-Verunreinigungen, die im Zuge der Probenvorbereitung eingetragen werden.

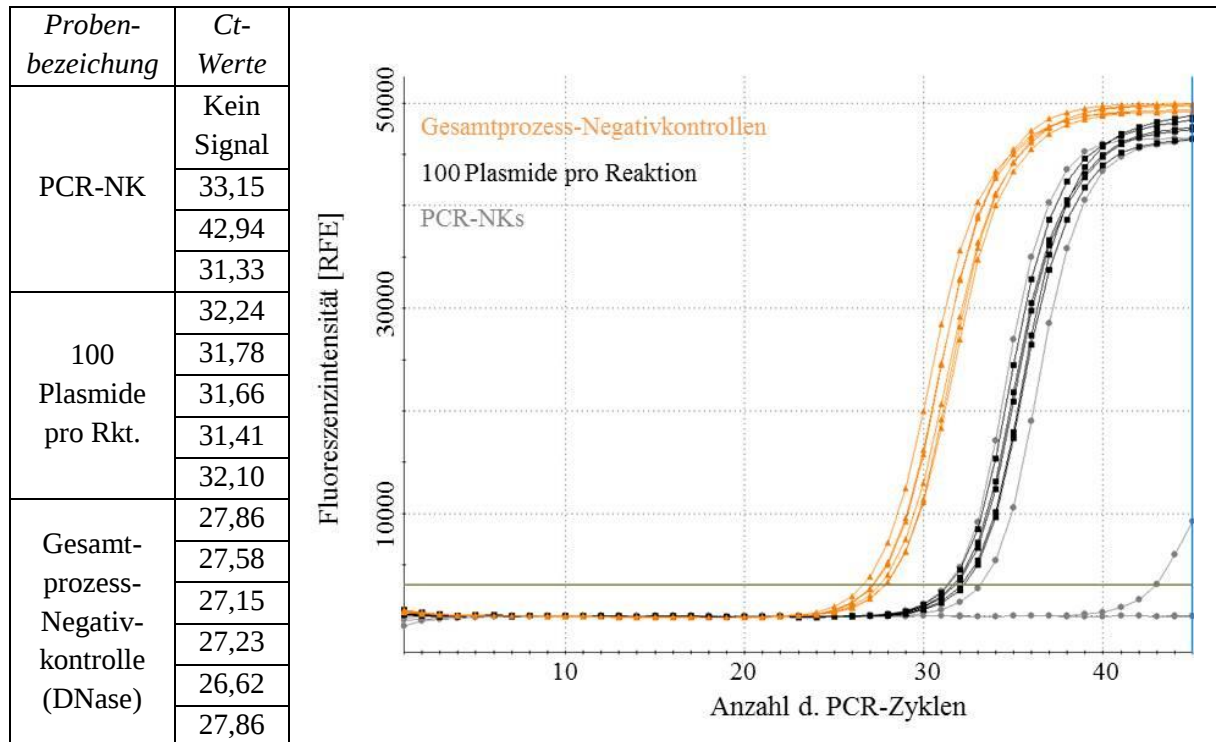


Abb. 38: Kurvenverläufe und Ct-Werte der gramnegativen *UniTOOL*-PCR mit DNA-Abreicherung der Reagenzien durch DNase der Sartorius Sample Prep

In Abb. 39 sind die Kurvenverläufe im direkten Vergleich mit und ohne DNase-Behandlung der Reagenzien dargestellt. Es wird ersichtlich, dass die DNase-Behandlung durchaus die Kontamination um Größenordnungen verringert ($\Delta\text{Ct} = 27 - 21 = 6$), sie jedoch nicht ausreichend ist für dieses hochsensitive *UniTOOL*-Assay.

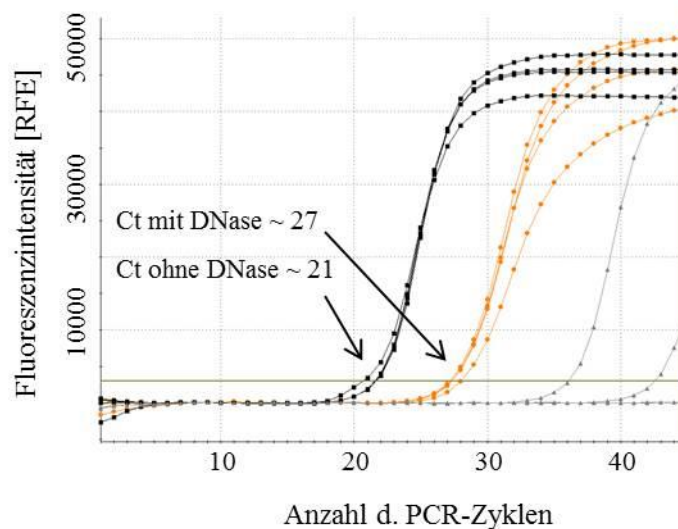


Abb. 39: Kurvenverläufe im direkten Vergleich mit und ohne DNase-Behandlung (gramnegative *UniTOOL*-PCR)

Theoretisch betrachtet könnten die in der Probenvorbereitung verwendeten Reagenzien Isopropanol und 70 % Ethanol relativ einfach frei von nachweisbarer DNA dargestellt werden, indem man ein lösliches Salz hinzugibt, um die Kationen-Konzentration zu erhöhen und

somit ggf. vorhandene DNA-Kontaminationen auszusalzen, d.h. zu fällen. Chloroform hingegen könnte man mittels Destillation DNA-frei machen.

Dass auch DNase prinzipiell geeignet ist, zeigen die konsistenten Ergebnisse in Tab. 14. Es wurde gezeigt, dass die DNase-Behandlung einen *spike* mit $4,6 \cdot 10^7$ GE *E. coli* DNA bis hin zu Ct-Werten abreichert, die den Extraktionskontrollen entsprechen (DNase Probe I). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ohne Inaktivierung durch Zugabe von EGTA die DNase weiterhin vollständig aktiv bleibt und dazu in Lage ist, einen zweiten DNA *spike* mit gleicher Konzentration vollständig zu fragmentieren (DNase Probe II). Nach vorheriger Inaktivierung durch Stopp-Lösung zeigt die DNase hingegen keinerlei Reaktivität mehr, da der zweite DNA *spike* der DNase Probe III weiterhin vollständig nachgewiesen werden kann.

Tab. 14: Potential von DNase zur Fragmentierung/Abreicherung eines *E. coli* DNA spikes

<i>Probenbezeichnung</i>		<i>Ct-Wert</i>
Gesamtprozess-NK	/	23,92
Gesamtprozess-NK	/	24,31
DNase Probe I	1. <i>spike</i> + DNase → <u>ohne</u> Stopp-Lsg., ohne 2. <i>spike</i>	23,66
DNase Probe II	1. <i>spike</i> + DNase → <u>ohne</u> Stopp-Lsg., mit 2. <i>spike</i>	24,05
DNase Probe III	1. <i>spike</i> + DNase → mit Stopp-Lsg., mit 2. <i>spike</i>	10,40
DNase Probe IV	1. <i>spike</i> + DNase → mit Stopp-Lsg., ohne 2. <i>spike</i>	24,28
2x <i>E. coli</i> DNA <i>spike</i>	2x <i>spike</i> $4,6 \cdot 10^7$ GE/PCR (<i>E. coli</i>)	9,35
PCR-NK	/	40,76
PCR-NK	/	36,63

Da mit keiner der getesteten Methoden die gewünschten Ergebnisse erzielt werden konnten, nämlich dass die Gesamtprozess-Negativkontrollen Ct-Werte oberhalb des *cut off* Wertes zeigen, sollte nun die Probenvorbereitung unter Verwendung eines Kits von Roche, dem SeptiFast Prep Kit, das ausschließlich hochreine, speziell DNA-abgereicherte Materialien und Reagenzien enthält, durchgeführt werden. Dieser Versuch sollte zeigen, ob es prinzipiell realisierbar ist, den Prozess der Probenkonzentrierung und Probenvorbereitung in Kombination mit dem *UniTOOL* Assay vollständig DNA-frei zu gestalten und somit abzuschätzen, ob ein Weiterarbeiten an der DNA-Abreicherung der Sartorius Sample Prep Sinn macht. Eine Verdünnungsreihe mit *L. pneumophila* als Testkeim, sowie Gesamtprozess-Negativkontrollen (DNA-freies Wasser, von Roche) wurden über ETO-begaste Polycarbonat-Membranen unter Verwendung von ETO-sterilisiertem Filtrationsequipment filtriert und der Membranfilter anschließend in Chloroform gelöst. Alle Folgeschritte wurden laut SeptiFast Prep Kit Protokoll (siehe Anhang, siehe Abschnitt 7.1.1.7) unter der *laminar flow* Werkbank

durchgeführt und mit dem gramnegativen *UniTOOL* Assay analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 40 und Abb. 41 dargestellt.

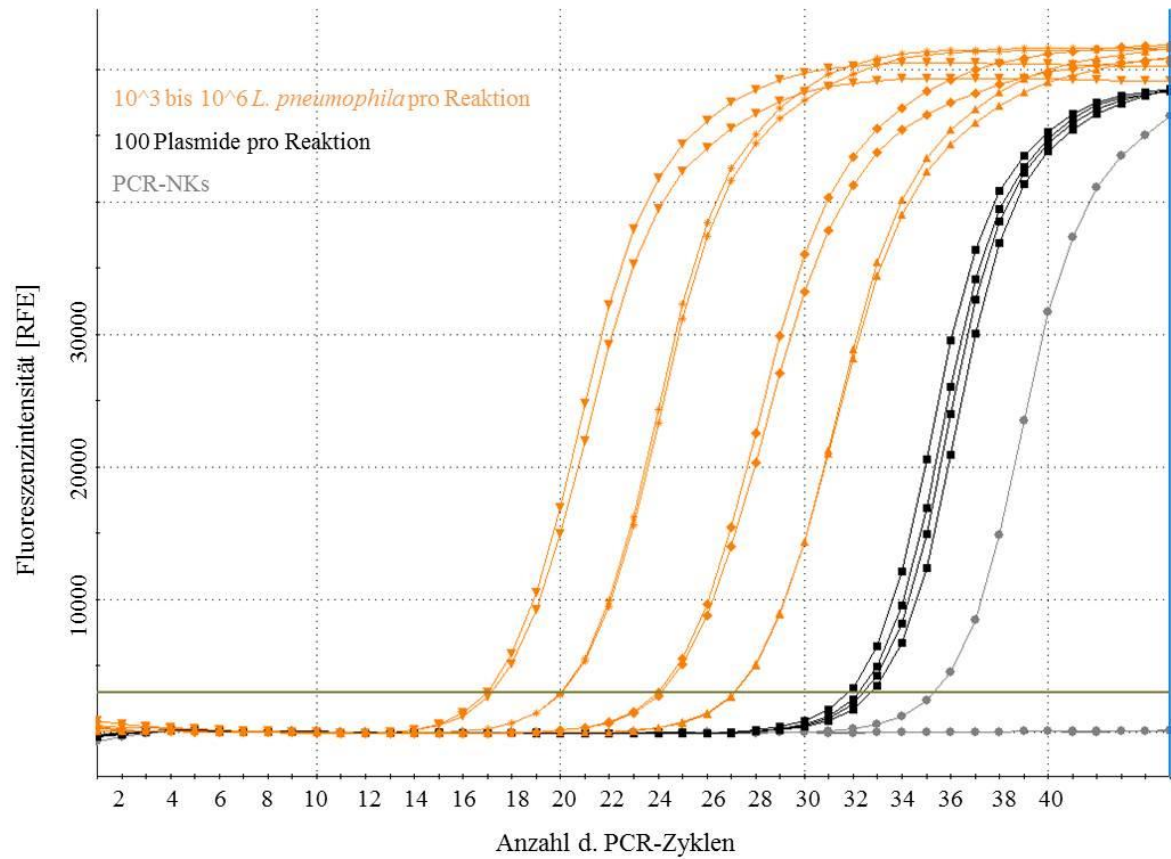


Abb. 40: SeptiFast Prep Kit + *UniTOOL*: Überprüfung der Funktionalität der Methode mit einer Legionellen Verdünnungsreihe

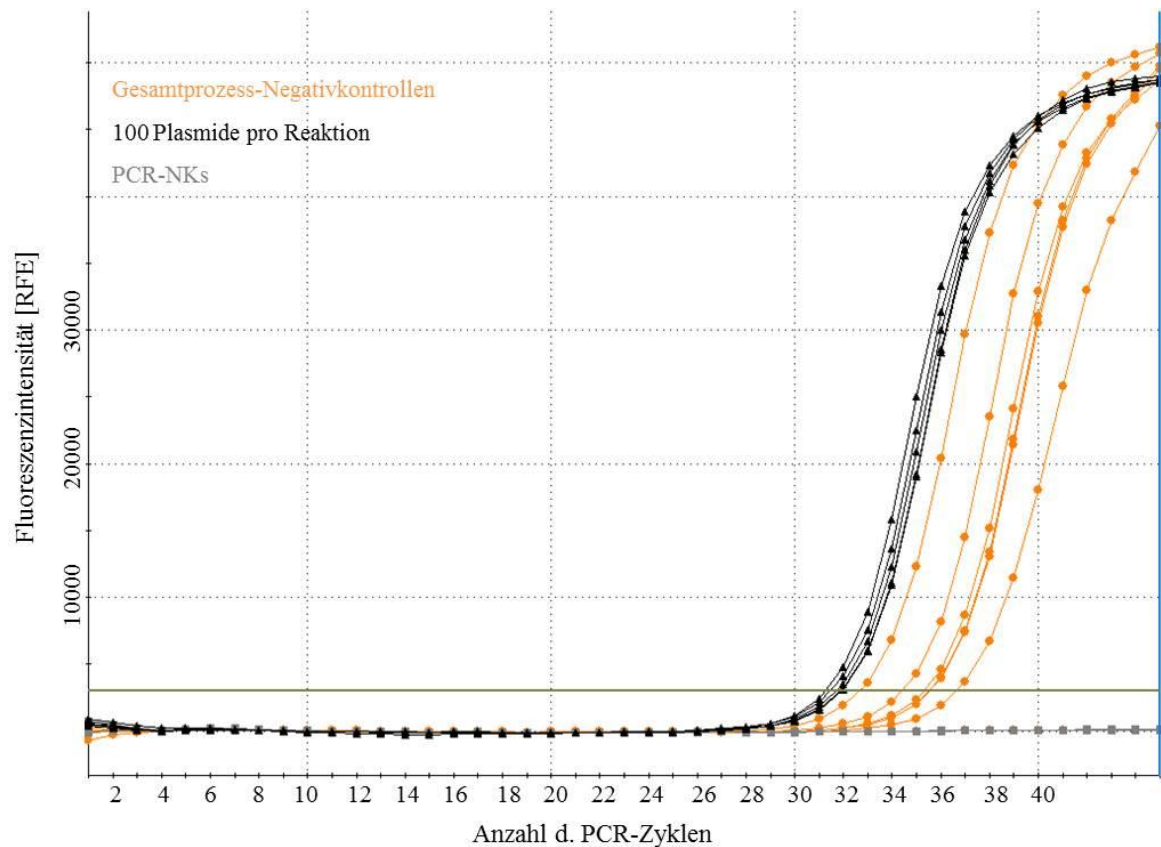


Abb. 41: SeptiFast Prep Kit + *UniTOOL*: Überprüfung ob $Ct_{\text{Gesamtprozess-NK}} > Ct_{100\text{Plasmide}}$

Abb. 40 zeigt, dass unter Verwendung der Methode eine erfolgreiche DNA-Isolierung möglich ist und sich keine PCR-Inhibitoren während der Probenvorbereitung ansammeln. In Abb. 41 ist ersichtlich, dass diese funktionale Methode tatsächlich eine DNA-freie Probenvorbereitung ermöglicht, so dass die Gesamtprozess-Negativkontrollen allesamt Ct -Werte aufweisen, die deutlich höher liegen als die 100-Plasmidkontrollen. Zum Verständnis der *100-Plasmidkontrollen* ist ergänzend zu erwähnen, dass davon ausgegangen wird, dass 100 Plasmide etwa einer Genomeinheit in der Umwelt entsprechen. Daher sollten alle Proben, die zu Signalen führen mit höheren Ct -Werten als die *100 Plasmidkontrollen*, weniger als eine Genomeinheit und somit weniger als eine Zelle enthalten.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass eine vollständig DNA-freie Probenvorbereitung im Vorfeld zum *UniTOOL* Assay oder anderen universellen PCR-Reaktionen prinzipiell realisierbar ist, allerdings mit nicht zu unterschätzendem Aufwand verbunden ist.

5 Zusammenfassung und Diskussion

Derzeit werden für Routineuntersuchungen in der Wasserdiagnostik hauptsächlich kultivierungsbasierte Methoden angewandt, die mehrere Tage benötigen, bis eine Kontamination nachgewiesen werden kann. In vielen Bereichen können allerdings keine mehrtägigen Wartezeiten aufgrund von langwierigen Analysemethoden toleriert werden. Bisher sind keine effizienten Schnelltests zur Bestimmung der Lebendzellzahl bekannt, die die Analyse großer Probenvolumina von mindestens 100 ml erlauben.

Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines Verfahrens zur Probenkonzentrierung und Probenvorbereitung für die schnelle mikrobiologische Analyse von wässrigen Proben am Beispiel verschiedener Modellorganismen. Abhängig vom zeitlichen Voranschreiten der Arbeit und der Umsetzbarkeit sollte außerdem eine neue Methode zur Lebend-Tot-Differenzierung gefunden und implementiert werden.

Ein Resultat der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit ist die Entwicklung einer Membrantransfer- und Auflöse-Einheit inklusive Methode zur Zelllyse und DNA-Isolierung. Sartorius plant, dieses bereits zum Patent angemeldete Probenvorbereitungssystem in Kombination mit dem *AquaScreen Legionella species* qPCR Kit bei potentiellen Kunden vorzustellen und bei positiver Resonanz auf den Markt zu bringen. Das Probenvorbereitungssystem beginnt mit einer klassischen Membranfiltration und anschließendem Auflösen des Membranfilters in Chloroform unter Zuhilfenahme der Membrantransfer- und Auflöse-Einheit. Das Auflösen des Filters ist notwendig, da mikroskopische und PCR-basierte Tests gezeigt haben, dass ein quantitativ vollständiges Abspülen der vom Membranfilter zurückgehaltenen Zellen aufgrund von adsorptiven Effekten und sterischer Hinderung nicht möglich ist. Bisher ist das Auflösen der Membran die einzige Methode, die sicher 100 % der Probe in die darauf folgenden Prozessschritte überführt. Der Auflöseschritt geschieht unter Verwendung des organischen Lösungsmittels Chloroform, so dass nach Zugabe eines wässrigen Lysepuffers die DNA in die wässrige Phase extrahiert werden kann. Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass bei der Anwesenheit von bakteriellen Sporen die chemische Lyse allein nicht ausreicht. Idealerweise kommt eine Kombination verschiedener Aufschlussmethoden zur Anwendung, wobei der mechanische Zellaufschluss mithilfe von Mahlkugeln die Methode der Wahl darstellt. Nach dem Lyseschritt folgt die DNA-Isolierung, die basierend auf den gewonnenen Ergebnissen mit einer DNA-Fällungsreaktion arbeitet. Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Ausbeuten einer alkoholischen DNA-Fällung etwa um den Faktor 9 besser sind als die einer gängigen Silica-basierten Methode. Den Abschluss des

Gesamtprozesses stellen der PCR-Ansatz und die Amplifikationsreaktion dar, die entweder aus einer für einen Keim spezifischen PCR oder z.B. aus einer Gesamtkeim-PCR bestehen kann. Tests haben gezeigt, dass das entwickelte Probenvorbereitungssystem nach aktuellem Stand problemlos für Keim-spezifische PCR-Assays geeignet ist.

Eine Gesamtkeim-PCR inklusive Probenvorbereitung konnte bisher nicht bis hin zur vollständigen Funktionalität entwickelt werden, da es bei den durchgeführten Tests immer wieder zu falsch positiven Ergebnissen kam. Diese waren das Resultat von DNA-Kontaminationen durch eingesetzte Chemikalien, Verbrauchsmaterialien oder den Anwender. Bakterielle DNA, vor allem gramnegativer Spezies, ist ubiquitär vorhanden, und ein im Rahmen dieser Arbeit verwendetes Kit mit universellen Primern reagiert bereits sehr sensitiv auf einzelne komplementäre DNA-Fragmente. Daher müssen in zukünftigen Versuchen die Kontaminationsquellen genauer definiert und beseitigt werden, um einen DNA-freien Gesamtprozess zu gewährleisten. Auch die DNA-freie Handhabung durch den Anwender muss genau definiert werden, um die Einschleppung von Kontaminationen zu unterbinden. Ein weiterer Ansatz ist ggf. die Verwendung eines anderen Gesamtkeim-PCR-Assays, das mit längeren Amplikons arbeitet und somit weniger sensitiv auf kleinste DNA-Fragmente aus der Umwelt reagiert.

Es wurde bereits erwähnt, dass zum Auflösen des Filtermaterials Chloroform zum Einsatz kommt. Da die meisten Anwender aber ungern mit gesundheitsschädlichen Chemikalien arbeiten, wurde ebenfalls nach einem enzymatisch auflösbaren Filtermaterial gesucht. Als geeignet hat sich eine Kollagenmatrix der Firma MedSkin Solutions Dr. Suwelack erwiesen. Ein Filter-Stanzling mit einem Durchmesser von 47 mm lässt sich innerhalb von 30 min vollständig mithilfe einer Kollagenase (1,2 Wunsch-Unit/ml) auflösen. Die natürliche Kollagenstruktur ist jedoch nur zu einem gewissen Grad modifizierbar bzw. stärker vernetzbar, so dass keine definierte Porengrößenverteilung erreicht werden kann. Eine standardisierte und definierte Porengrößenverteilung ist allerdings notwendig, um eine ausreichend hohe Bakterien-Rückhaltung bzw. einen bestimmten Log-Reduktionswert garantieren zu können. Eine Alternative kann eventuell die bereits während der Tests zur enzymatischen Spaltbarkeit verwendete, nicht-poröse Kollagenfolie bieten. Die Kollagenfolie muss zu diesem Zweck mit gezielten Porengrößen versehen werden. Es kann beispielsweise überprüft werden, ob dies mithilfe eines modifizierten *track etch* Verfahrens realisierbar ist. Eine zu überprüfende Idee ist, dass anstatt unter Verwendung einer Lauge mithilfe von Enzymen die definierten Poren in die zuvor bestrahlte Proteinmembran „geätzt“ werden. Die Verfolgung dieses Lösungsansatzes bzw. die Überprüfung dessen Realisierbarkeit kann ein Thema einer zukünftigen

wissenschaftlichen Arbeit darstellen. Sollte sich dieser theoretische Ansatz als realisierbar erweisen, kann in den Gesamtprozess des neu entwickelten Probenvorbereitungssystems ein Verfahren zur Lebend-Tot-Differenzierung implementiert werden. Denn im Gegensatz zur Auflösung mit Chloroform werden die Zellen durch den enzymatischen Auflöseschritt nicht beschädigt oder inaktiviert. Die Ergebnisse eines Kultivierungsversuches mit *E. coli* im Anschluss an eine Kollagenase-Behandlung haben gezeigt, dass die Zellen ihre Viabilität durch die enzymatische Spaltung des Filtermaterials nicht verlieren und somit weiterhin für eine Lebend-Tot-Differenzierung zur Verfügung stehen.

Der Nachteil bei Zellzahlbestimmungen mit Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken besteht darin, dass auf mRNA-Basis keine exakte Quantifizierung und auf DNA-Basis keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich ist. In zahlreichen Anwendungsbereichen ist aber ausschließlich die Anzahl lebender Zellen von Interesse. Für diese Problematik konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit ein Lösungsansatz gefunden und patentiert werden (DE102012014981B3). Die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) erlaubt eine Vervielfältigung der DNA bei einer konstanten Temperatur zwischen 37 °C und 42 °C. Im RPA-Reaktionsansatz enthaltene vitale Mikroorganismen können die Amplifikationsreaktion aufgrund der niedrigen Reaktionstemperatur überstehen und werden nicht Hitze-bedingt inaktiviert. Die intakten Zellmembranen der vitalen Keime verhindern hierbei die Amplifikation der in den Zellen enthaltenen DNA. Frei zugängliche DNA von Bakterien mit gestörter Membranintegrität hingegen wird amplifiziert. Mit diesem Ansatz lässt sich die Anzahl toter Bakterien einer Probe ermitteln. Ein zweites Aliquot der Ausgangsprobe muss vollständig inaktiviert in die RPA eingesetzt werden, so dass die DNA sowohl der toten als auch der zuvor vitalen Keime amplifiziert wird. Die Lebendzellzahl lässt sich anschließend aus der Differenz von Gesamtzellzahl und der Anzahl toter Zellen berechnen.

Diese Idee, galt es auf Funktionalität und Quantifizierbarkeit zu überprüfen. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Vervielfältigung der DNA durch die intakte Zellmembran unterbunden wird. Bei der Verwendung inaktivierter Zellen ohne DNA-Aufreinigung wurde allerdings deutlich, dass der Grad der Beschädigung der toten Zellen die Effizienz der RPA stark beeinflussen kann. DNA von Zellen, die durch Ultraschall inaktiviert wurden, ermöglichten eine bessere Quantifizierung als mit Ethanol inaktivierte Mikroorganismen. Daher ist ein Ansatz, der in weiterführenden Arbeiten verfolgt werden kann, der Einsatz von Deoxycholaten, die zu einer weiteren Membrandestabilisierung der nur geringfügig beschädigten, jedoch nicht mehr vitalen Zellen führen (Lee & Levin 2009; Fittipaldi et al. 2012).

Nach weiterer Optimierung der RPA-Reaktionskomponenten und des Probenvorbereitungssystems mit enzymatisch auflösbaren Filtern sind quantitative Anwendungen ggf. auch inklusive Lebend-Tot-Differenzierung mithilfe der RPA denkbar.

Sollte sich herausstellen, dass dieser Lösungsansatz doch nicht in dem gewünschten Maße realisierbar ist, wäre ein weiterer Ansatz denkbar: Die Lebend-Tot-Differenzierung mithilfe einer Filtration durch eine *track etch* Polycarbonat-Membran. Hierbei passiert die freie DNA toter Mikroorganismen den Membranfilter und wird mitsamt dem Filtrat verworfen. Vitale intakte Zellen verbleiben auf der Membranoberfläche, so dass anschließend ausschließlich deren DNA isoliert und nachgewiesen werden kann. Dieser Ansatz beruht bisher auf rein theoretischen Überlegungen und muss erst auf Realisierbarkeit überprüft werden.

In den vergangenen Jahrzehnten stieg die Zahl der molekularbiologischen Tests in vielen Anwendungsbereichen stark an, um schnelle Alternativen zu den klassischen Kultivierungsabhängigen Assays zu bieten. Das Hauptaugenmerk bei der Entwicklung neuer Produkte lag hierbei besonders auf den Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken, insbesondere auf der PCR. Da das Probenvolumen dieser molekularbiologischen Tests meist auf den Mikroliter-Maßstab begrenzt ist, sollte die Probenvorbereitung großvolumiger wässriger Proben im Fokus dieser Arbeit stehen und somit einen Beitrag zur weiteren Etablierung und Akzeptanz von molekularbiologischen Schnelltests bei Routine-Analysen leisten.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AFNOR	<i>Association française de normalisation</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BGMB	Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
C _T	<i>threshold cycle</i> (Schwellenwert-Zyklus)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CASO	Casein-Soja
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DNase	Deoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae, et alia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETO	Ethylenoxid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
gDNA	genomische DNA
GE	Genomeinheit
ggf.	gegebenenfalls
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GPa	Gigapascal
HDA	<i>helicase dependent amplification</i>
inkl.	inklusive
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
KBE	Koloniebildendeinheit

Verzeichnisse

kHz	Kilohertz
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
m, cm, mm, µm	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i>
MgAc	Magnesiumacetat
MPN	<i>most probable number</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger Ribonucleic acid)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMA	Propidiummonoazid
PSA	<i>pressure sensitive adhesive</i> (Haft-Klebstoff)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
qPCR	quantitative (<i>realtime</i>) PCR
RO-Wasser	Reverse Osmose Wasser
RCA	<i>rolling cycle amplification</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
upm	Umdrehungen pro Minute
RPA	Rekombinase-Polymerase-Amplifikation
rRNA	ribosonale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s, min, h	Sekunde, Minute, Stunde
SDA	<i>strand displacement amplification</i>
SSB	<i>single strand binding</i> (Einzelstrang-bindend)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/Vis	<i>ultra-violet/visible</i> (Ultraviolett/Sichtbar)
VBNC	<i>viable but nonculturable</i> (Lebend aber nicht kultivierbar)
z. B.	zum Beispiel

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Methoden nach aktuellem Stand der Technik.....	19
Abb. 2: Schemat. Darst. d. Funktionsprinzips v. interkalierenden Farbstoffen u. Scorpions..	20
Abb. 3: Schematische Darstellung eines RPA-Zyklus	23
Abb. 4: Sequenzvergleich des 16S rRNA Gens von <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	29
Abb. 5: Test der bestellten Primer mit genomischer <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i> DNA	30
Abb. 6: Vivacon 500 Einheiten zur Simulierung von Filtrations- und Elutionsschritt.....	33
Abb. 7: REM-Aufnahmen, Bakterien auf verschiedenen Membrantypen, Ø 0,45 µm	37
Abb. 8: REM-Aufnahmen, Bakterien auf verschiedenen Membrantypen, Ø 0,2 µm	38
Abb. 9: 100 µl verdünnte <i>E. coli</i> -Kultur in Vivacon 500 → reverses Spülen mit 100µl H ₂ O	41
Abb. 10: Mit SYTO9 gefärbte Zellen mit bzw. ohne reversen Spülschritt	43
Abb. 11: 100 ng gDNA pro Spur; Ultraschall-Gerät	44
Abb. 12: Amplifikationskurven; ohne bzw. mit Ultraschallbehandlung	45
Abb. 13: Versuchsaufbau: Ultraschallsonde, Petrischale mit 6 M GHCl u. 0,45 µm PESU-Membran mit zurückgehaltenen <i>E. coli</i> Zellen	46
Abb. 14: Einfluss von Ultraschall hinsichtlich Effizienz der Zellwiederfindung von <i>E. coli</i> nach erfolgter Membranfiltration	47
Abb. 15: Zelluloseacetat-Membran mit Metallkugel mit FastPrep-24 prozessiert.....	48
Abb. 16: 25 mm-Membranstanze mit <i>B. subtilis</i> Sporen; FastPrep-24 Mahlkugel-Aufschluss; DNA-Isolierung; <i>realtime</i> PCR mit B_FI und B_RI.....	49
Abb. 17: Agarosegel mit <i>B. subtilis</i> Amplikons, wobei die Amplifikation unter Anwesenheit von Membranfragmenten durchgeführt wurde.....	50
Abb. 18: Polycarbonat-Membranen mit <i>E. coli</i> DNA in Chloroform gelöst, DNA-Extraktion in die wässrige Phase mit anschließender Alkoholpräzipitation, PCR mit E_FI + E_RI.....	55
Abb. 19: Membrantransfer- und –Auflöseeinheit bestehend aus Oberteil (1) zum Aufnehmen der Membran u. einem Unterteil (2) mit Auslass zum Herausspülen der gelösten Membran; 56	
Abb. 20: Zentrifugenbecher und –Adapter für die Zentrifugation der Membrantransfer- und –Auflöseeinheit (Sigma).....	57

Abb. 21: Schematische Darstellung des entwickelten Verfahrens: Kontaminationsfreier Transfer und Auflösen des Membranfilters und quantitative DNA-Isolierung.....	58
Abb. 22: REM-Aufnahmen, Links: Kollagenmembran, 1.000 x; Mitte: Kollagenmembran stärker vernetzt, 1000 x; Rechts: Kollagenfolie unporös, 4.000 x	61
Abb. 23: R REM-Aufnahmen, Links: Kollagenmembran stärker vernetzt, gequollen, 1.000 x; Mitte: Alginat, 1.000 x; Rechts: Zellulosenitrat-Membran, 0,45 µm, 15.000 x	61
Abb. 24: Ergebnisse des Homogenisatorvergleichs	64
Abb. 25: Direkter Vergleich des Mahlkugel-Aufschlusses u. der <i>pressure cycling</i> Technologie hinsichtlich Zellaufschlusseffizienz unter Verwendung v. <i>B. subtilis</i> Sporen	68
Abb. 26: Wirkungsprinzip von Propidiumiodid und SYTO9.....	69
Abb. 27: <i>Realtime</i> PCR: Vergleich verschiedener Methoden zur DNA-Isolierung am Modellorganismus <i>E. coli</i>	73
Abb. 28: Schemat. Darstellung des neuen Ansatzes zur Lebend-tot-Differenzierung von MOs mithilfe der RPA inkl. Probenkonzentrierung mithilfe eines enzymat. auflösbaren Filters.....	77
Abb. 29: Zielamplikon bei 430 bp auf Agarosegel nach erfolgter RPA-Reaktion.....	79
Abb. 30: Standardreihe unter Verwendung quantifizierter <i>E. coli</i> DNA.....	81
Abb. 31: Fluoreszenzkurven der Proben 1 und 2 sowie Negativkontrollen	82
Abb. 32: Fluoreszenzkurven der Proben 3 und 4 sowie Negativkontrollen	82
Abb. 33: Standardkurve unter Verwendung quantifizierter <i>E. coli</i> DNA.....	84
Abb. 34: Fluoreszenzkurven einer RPA mit vitalen und inaktivierten <i>E. coli</i> Zellen sowie Negativkontrollen	85
Abb. 35: <i>E. coli</i> Verdünnungsreihe laut Abb. 21 prozessiert zeigt geringe Sensitivität aufgrund hoher DNA-Belastung des Gesamtprozesses.....	88
Abb. 36: Amplifikationskurven; <i>L. pneumophila</i> Zellen gemäß Abb. 21 bzw. gemäß optimierten Stand der Technik prozessiert	90
Abb. 37: Auswertung Gelelektrophorese: DNA-Abreicherungspotential von ETO	92
Abb. 38: Kurvenverläufe und Ct-Werte der gramnegativen <i>UniTOOL</i> -PCR mit DNA-Abreicherung der Reagenzien durch DNase der Sartorius Sample Prep.....	95
Abb. 39: Kurvenverläufe im direkten Vergleich mit und ohne DNase-Behandlung (gramnegative <i>UniTOOL</i> -PCR).....	95

Abb. 40: SeptiFast Prep Kit + UniTOOL: Überprüfung der Funktionalität der Methode mit einer Legionellen Verdünnungsreihe.....	97
Abb. 41: SeptiFast Prep Kit + UniTOOL: Überprüfung ob $Ct_{\text{Gesamtprozess-NK}} > Ct_{100\text{Plasmide}}$	98
Abb. 42: Gesamtübersicht der Membrantransfer- und Auflöseeinheit mit irreversibler Schnappverbindung von Ober- und Unterteil.....	CXXX
Abb. 43: Unterteil mit Auslasse der Membrantransfer- und Auflöseeinheit	CXXXI
Abb. 44: Oberteil der Membrantransfer- und Auflöseeinheit.....	CXXXI

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer-Sequenzen: <i>E. coli</i> und <i>B. subtili</i>	28
Tab. 2: Verwendete Gleichungen und Werte zur Berechnung der Zentrifugalkraft, die auf eine <i>E. coli</i> Zelle wirkt	34
Tab. 3: Membranmaterial u. Lösemittel, das zum Auflösen des jeweiligen Materials führt ..	52
Tab. 4: Rückhaltung von <i>E. coli</i> Zellen durch verschiedene Matrices; KBE in Filtrat/ Kontrolle nach Ausspateln	60
Tab. 5: Versuchsaufbau und Ergebnisse des Homogenisatorvergleichs	65
Tab. 6: Protokolle drei verschiedener Methoden zur Isolierung von DNA.....	72
Tab. 7: Versuchsaufbau zur Abschätzung d. Lebend-tot-Quantifizierungspotentials d. RPA	80
Tab. 8: Werte der Standardreihe unter Verwendung quantifizierter <i>E. coli</i> DNA	81
Tab. 9: Ermittelte Konzentrationen der Genomeinheiten pro Reaktion [GE/Rkt.]	81
Tab. 10: Werte der Standardreihe unter Verwendung quantifizierter <i>E. coli</i> DNA	84
Tab. 11: Ermittelte Konzentrationen der Genomeinheiten pro Reaktion bzw. pro ml.....	84
Tab. 12: Ct-Werte; 10^3 <i>Legionella pneumophila</i> Zellen prozessiert gemäß Abb. 21 und gemäß optimierten Stand der Technik; Analyse mit AquaScreen PCR und UniTOOL PCR...	89
Tab. 13: Reagenzien der Sartorius Sample Prep (SSP) und jeweils getestete Verfahren zur DNA-Abreicherung	93
Tab. 14: Potential von DNase zur Fragmentierung/Abreicherung eines <i>E. coli</i> DNA spikes .	96
Tab. 15: Zusammensetzung einer 25 µl SYBR Green PCR-Reaktion	CXV

Tab. 16: Temp.-Profil d. etablierten SYBR Green PCR für d. qPCR Gerät MxPro3005P	CXV
Tab. 17: Temperaturprofil <i>UniTOOL Resolight</i> , modifiziert für MxPro 3005P	CXVI
Tab. 18: Liste der verwendeten Chemikalien	CXXII
Tab. 19: Lister der verwendeten Kits	CXXIV
Tab. 20: Liste der verwendeten Enzyme	CXXV
Tab. 21: Liste der verwendeten bakteriellen Stämme	CXXV
Tab. 22: Liste des verwendeten Laborequipments	CXXV
Tab. 23: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	CXXVIII

6.4 Literaturverzeichnis

Auty, M. A. E.; Gardiner, G. E.; McBrearty, S. J.; O'Sullivan, E. O.; Mulvihill, D. M.; Collins, J. K. et al. (2001): Direct In Situ Viability Assessment of Bacteria in Probiotic Dairy Products Using Viability Staining in Conjunction with Confocal Scanning Laser Microscopy. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1), S. 420–425.

Bain, R.; Bertam, J.; Elliott, M.; Matthews, R.; McMahan, L.; Tung, R. et al. (2012): A Summary Catalogue of Microbial Drinking Water Tests for Low and Medium Resource Settings. In: *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, S. 1609–1625.

Berney, M.; Weilenmann, H. U.; Egli, T. (2006): Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). In: *Microbiology* 152 (6), S. 1719–1729.

Bio-Rad Laboratories GmbH (2006): Aquadien Kit. Kit for DNA Extraction and Purification from Bacteria present in Water Samlpes. User Guide (Ref.: 357-8121).

Corless, C. E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Kaczmarek, E. B.; Fox, A. J. (2000): Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. In: *Journal of Clinical Microbiology* 38 (5), S. 1747–1752.

Davey, H. M. (2011): Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology. MINIREVIEWS. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (16), S. 5571–5576.

Didenko, V. V. (2001): DNA Probes Using Fluorescence Resonance DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Designs and Applications. In: *Bio-Techniques* 31 (5), S. 1106–1121.

DiMichele, L. J.; Lewis, M. J. (1993): Rapid, Species-Specific Detection of Lactic Acid Bacteria from Beer Using the Polymerase Chain Reaction. In: *ASBC Journal* 51 (2), S. 63–66.

Elsner, H. I.; Lindblad, E.B (1989): Ultrasonic degradation of DNA. In: *DNA and Cell Biology* 8 (10), S. 697–701.

Engel, W.-D; Rainer, A.; Siedel, J.; Tgetgel, A. (2009): Process for DNA decontamination. Angemeldet durch Roche Diagnostics GmbH, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG am 26.03.2009. Veröffentlichungsnr: EP1792631B1.

Evans, G. E.; Murdoch, D. R.; Anderson, T. P.; Potter, H. C.; George, P. M.; Chambers, S. T. (2003): Contamination of Qiagen DNA Extraction Kits with *Legionella* DNA. In: *Journal of Clinical Microbiology* 41 (7), S. 3452–3453.

Ferguson, R. L.; Buckley, E. N.; Palumbo, A. V. (1984): Response of Marine Bacterioplankton to Differential Filtration and Confinement. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1), S. 49–55.

Feuerpfeil, I.; Botzenhart, K. (2008): Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.

Fittipaldi, M.; Nocker, A.; Codony, F. (2012): Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. In: *Journal of Microbiological Methods* 91 (2), S. 276–289.

Grimm, J. (2008): Untersuchungen zur Prävalenz von *Mycoplasma suis* in Deutschland sowie vergleichende Untersuchungen zwischen real-time Polymerasekettenreaktion und Akridin-Ausstrich bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität. Dissertation. LMU München, Tierärztliche Fakultät.

Hacker, K.; Govoni, G.; Sergeev, N.; Bolchacova, E.; Brevnov, M.; Furtado, M.; Young, J. (2011): Device For Capture and Lysis of Microorganisms from Liquids and Methods of Use thereof. Angemeldet durch Live Technologies Corporation am 01.09.2011. Veröffentlichungsnr: WO2012031156A1. Prioritätsdaten: 01.09.2010.

Hobbie, J. E.; Daley, R. J.; Jasper, S. (1977): Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (5), S. 1225–1228.

Hoefel, D.; Grooby, W. L.; Monis, P. T.; Andrews, S.; Saint, C. P. (2003): Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. In: *Journal of Microbiological Methods* 55, S. 585–597.

Jepras, R. I.; Carter, J.; Pearson, F. E. P.; Wilkinson, M. J. (1995): Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (7), S. 2696–2701.

Kahlen, I. (2012): Untersuchung des Reinigungseffektes von Ultraschall auf Oberflächen von Chirurgie-Instrumenten und dessen prototypische Umsetzung in ein Dekontaminationsverfahren. Dissertation. Technische Universität Berlin. Fakultät Verkehrs- und Maschinensysteme.

Kawamoto, Y.; Motoyama, Y. (2010): Collection/recovery method of microorganisms and purification method of microorganism-derived DNA. Angemeldet durch ASAHI B am 14.07.2010. Veröffentlichungsnr: JP2012019723A. Prioritätsdaten: 14.07.2010.

Kim, J.; Easley, C. J. (2011): Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications. In: *Bioanalysis* 3 (2), S. 227–239.

Köster, W.; Egli, T. (2002): Molekulare Methoden in der mikrobiellen Trinkwasseranalytik. In: *Biospektrum* 8 (4), S. 368–372.

Kukuk, L. K. (2013): Etablierung und Evaluierung eines quantitativen isothermalen DNA Amplifikations-Assay zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Prokaryoten am Modellorganismus *Staphylococcus aureus*. Masterarbeit. Universität Düsseldorf. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.

Kulakow, L. A.; McAlister, M. B.; Ogden, K. L.; Larkin, M. J.; O’Hanlon, J. F. (2002): Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4), S. 1548–1555.

Lane, D. J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. John Wiley and Sons, New York. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, S. 115–175.

Lauterborn, S. (2012): Kombiniertes Ultraschall-Luft-Rückspülverfahren. ein Verfahren zur chemikalienfreien in situ Reinigung getauchter Membranen zur Wasseraufbereitung. Dissertation. Technische Universität Darmstadt, Darmstadt. Fachbereich Bauingenieurwesen.

Lee, J.; Levin, R. E. (2009): Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR. In: *Journal of Microbiological Methods* 79 (2), S. 184–188.

Lemare, F. (2010): Development of a sample preparation kit for the detection of *Legionella pneumophila* from water samples via qPCR. Masterarbeit. Université de Nîmes, Nîmes.

London, R.; Schwedock, J.; Sage, A.; Valley, H.; Meadows, J.; Waddington, M.; Straus, D. (2010): An Automated System for Rapid Non-Destructive Enumeration of Growing Microbes. In: *PLOS ONE* 5 (1).

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (2003): Brock Mikrobiologie. 2. Aufl. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

McMaster, G. K.; Carmichael, G. G. (1977): Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. In: *Proc. Natl. Acad. Scf. USA* 74 (11), S. 4835–4838.

Mohammadi, T.; Reesink, H. W.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Savelkoul, P. H. M. (2003): Optimization of Real-Time PCR Assay for Rapid and Sensitive Optimization of Real-Time PCR Assay for Rapid and Sensitive Detection of Eubacterial 16S Ribosomal DNA in Platelet Concentrates. In: *Journal of Clinical Microbiology* 41 (10), S. 4796–4798.

Mohammadi, T.; Reesink, H. W.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Savelkoul, P. H. M. (2004): Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents. In: *Journal of Microbiological Methods* 61, S. 285–288.

Mülhardt, C. (2009): Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Muyzer, G.; Waal, E. C. de; Uitterlinden, A. G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, S. 695–700.

Nakamura, K. (2003): Rapid Method for Microbial Analysis Targeting DNA Molecule. In: *J. Aerosol Res.* 18 (3), S. 177–180.

Peters, R. P. H.; Mohammadi, T.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Danner, S. A.; van Agtmael, M. A.; Savelkoul, P. H. M. (2004): Detection of bacterial DNA in blood samples from febrile patients: underestimated infection or emerging contamination? In: *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 42, S. 249–253.

Pflanz, K. (2010): Vorrichtung und Verfahren zur Behandlung eines Filtrationsmediums. Angemeldet durch Sartorius Stedim Biotech GmbH am 20.10.2010. Veröffentlichungsnr: WO2011057707A2. Prioritätsdaten: 12.11.2009.

Piepenburg, O.; Williams, C. H.; Stemple, D. L.; Niall, A. A. (2006): DNA Detection Using Recombination Proteins. In: *BLOS Biology* 4 (7), S. 1115–1121.

Rageh, M.; Lakkani, A.; Ali, M.; Abd El Fattah, A.; Raafat, A. (2009): Effect of high power ultrasound on aqueous solution of DNA. In: *International Journal of Physical Sciences* 4 (2), S. 63–68.

Sambrook, J.; Russell, D. W. (2000): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3. Aufl. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schrank, K. (2000): Untersuchungen zur Diversität der Treponemen bei der Dermatitis digitalis des Rindes – Erstbeschreibung der Spezies *Treponema brennaborensis*. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin. Fachbereich Veterinärmedizin.

Sen, K.; Schable, N. A.; Lye, D. J. (2007): Development of an Internal Control for Evaluation and Standardization of a Quantitative PCR Assay for Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (22), S. 7380–7387.

Setlow, B.; Tautvydas, K. J.; Setlow, P. (1998): Small, Acid-Soluble Spore Proteins of the a/b Type Do Not Protect the DNA in *Bacillus subtilis* Spores against Base Alkylation. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (5), S. 1958–1962.

Siegmund-Schultze, N. (2013): LEGIONELLENINFEKTIONEN IN WARSTEIN. Größter Ausbruch in Deutschland. In: *Deutsches Ärzteblatt* 110 (38), S. 1736–1738.

Smith, L.; Carroll, K.; Mottice, S. (1992): Comparison of Membrane Filters for Recovery of Legionellae from Water Samples. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1), S. 344–346.

Stärk, K. D. C.; Nicolet, J.; Frey, J. (1998): Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Air Sampling with a Nested PCR Assay. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (2), S. 543–548.

Stevenson, B. S.; Schmidt, T. M. (2004): Life History Implications of rRNA Gene Copy Number in *Escherichia coli*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (11), S. 6670–6677.

Tholey, A. (2006): MALDI Mass Spectrometry for Quantitative Proteomics. Approaches, Scopes and Limitations. Technische Biochemie, Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

Van der Zee, A.; Peeters, M.; Jong, C. de; Verbakel, H.; Crielaard, J. W.; Claas, E. C. J.; Templeton, K. E. (2002): Qiagen DNA Extraction Kits for Sample Preparation for *Legionella* PCR Are Not Suitable for Diagnostic Purposes. In: *Journal of Clinical Microbiology* 40 (3), S. 1126.

Vogel, R. F.; Ehrmann, M. A. (2011): Bakterien unter Hochdruck. In: *Biospektrum* 17 (03/2011), S. 266.

Wattiau, P.; Renard, M. E.; Ledent, P.; Debois, V.; Blackman, G.; Agathos, S. N. (2001): A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring wastewater biotreatment. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, S. 816–819.

Wirz, P. (2008): Der Weg zum reinen Wasser. Herstellung von Pharma-Reinwasser in der Praxis. In: *Pharma + Food, Special Hygieneprozessstechnik 2008*, S. 46–49.

Wong, M. L.; Medrano, J. F. (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. In: *BioTechniques* 39 (1), S. 75–85.

<i>Internetdokumente</i>	<i>Online verfügbar unter:</i>
AppliChem (2007): Kontaminationen durch Nukleinsäuren. Probleme und praktische Lösungen. Darmstadt.	http://www.applichem.com/fileadmin/Broschuere_n/DNA_Broschure_dt.pdf
AppliChem (2010): AppliCations Nr. 3. DNA-freie Reagenzien und Mastermixe für die PCR. Darmstadt.	http://www.applichem.com/fileadmin/Application_Notes/AppliCations_Nr3_DNA-freie_Reagenzien_de.pdf
Bundesminister für Gesundheit i. A. Ilka, T. (2013): Bundesgesetzblatt - Bekanntmachung der Neufassung der Trinkwasserverordnung. Hg. v. Bundesanzeiger Verlag. Bonn.	http://www.bgbl.de/Xaver/text.xav?bk=Bundesanzeiger_BGBl&start=%2F%2F*%5B%40attr_id%3D%2F%2F%5D&wc=1&skin=WC#_Bundesanzeiger_BGBl_%2F%2F*%5B%40attr_id%3D%2F%2F%5D__1379076702453
Hemschemeier, S. K. (2013): Mikrobielle Artenvielfalt. Hg. v. Wiley Information Services GmbH.	http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/bio/biodiv/biodiv.vlu/Page/vsc/de/ch/16/bio/biodiv/biodiv_mo_arten.vscml.html <i>Jahr:</i> javascript:alert(document.lastModified)
Hübner-Schroll, S. (2010): Legionellen. Beunruhigende Häufung. In: Augsburger Allgemeine, 15.01.2010.	http://www.augsburger-allgemeine.de/bayern/Augsburger-Experte-beunruhigende-Haeufung-id7153461.html
Laborjournal online (2011): Nur nicht den Faden verlieren - Produktübersicht: DNA-Isolierung. Hg. v. Freiburg Laborjournal und f+r internet agentur..	http://www.laborjournal.de/rubric/produkte/products_11/2011_11.lasso
Lawrence, N. (2010): Processing <i>Bacillus</i> Vegetative Cells and Spores Using Pressure Cycling Technology (PCT). Hg. v. Pressure BioSciences Inc.	http://www.pynnco.com/IM/image/200807/200872511032698596.pdf
Minerva Biolabs GmbH (2012): AquaScreen FastExtract. DNA Extraction Kit for Water Samples, Version 1.0. Instructions for use.	http://www.minerva-biolabs.com/download/manuals/32-1_AquaScreen-FX_2012-05-25.pdf
Sartorius Stedim Biotech GmbH (2010): Microfilters Product Overview (Publication No.: SM-1503-e10078).	http://www.sartorius.be/fileadmin/fm-dam/sartorius_media/Bioprocess-Solutions/Lab_Technologies/Lab_Filtration/Others/Brochures/Broch_Microfilters_SM-1503-e.pdf
Sartorius Stedim Biotech GmbH (2012): Vivacon 500. Technical data and operating instructions. Hg. v. Sartorius Stedim Biotech GmbH.	http://www.sartorius.com/fileadmin/fm-dam/sartorius_media/Lab-Products-and-Services/Lab-Filtration/Ultrafiltration-Devices/Vivacon/Manuals/Manual_Vivacon500_SLL6002-e.pdf
Tum (2013): Disrupted Organism Guide. Hg. v. Constant Systems Ltd.	http://media.wix.com/ugd/61de6e_6948dceea99117c4fb5d38142380046d.pdf
TwistDx (2012): TwistAmp DNA Amplification Kits. Combined Instruction Manual.	http://www.twistdx.co.uk/images/uploads/docs/Combined_Manual-12-1.pdf

7 Anhang

7.1 Material und Methoden

7.1.1 Arbeitsvorschriften

Im Abschnitt Arbeitsvorschriften sind sämtliche Standardprozesse aufgeführt, die im Rahmen der Arbeit ohne Modifizierung stets nach dem gleichen Protokoll durchgeführt wurden. Experimentelle Abläufe, die sehr variabel waren und immer auf vorherigen Ergebnissen basierend angepasst wurden, sind im Abschnitt 4 im jeweiligen Unterkapitel im Detail beschrieben.

7.1.1.1 SYBR Green PCR für die Detektion von *E. coli* und *B. subtilis*

Der Mastermix setzte sich für eine typische 25 µl-Reaktion wie folgt zusammen.

Tab. 15: Zusammensetzung einer 25 µl SYBR Green PCR-Reaktion

Maxima SYBR Green qPCR Mastermix (2x)	12,5 µl
Vorwärts-Primer	0,3 µM
Rückwärts-Primer	0,3 µM
ROX-Lösung	10 nM
Ziel-DNA	≤ 500 ng (10 µl, wenn nicht extra aufgeführt)
Wasser (PCR-Qualität)	to 25 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25 µl</i>

Tab. 16: Temperaturprofil der etablierten SYBR Green PCR für das qPCR Gerät MxPro3005P (Agilent Technol.)

<i>Schritt</i>	<i>Temp. [°C]</i>	<i>Zeit</i>	<i>Anzahl d. Zyklen</i>
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 s	40 Fluoreszenzmessung während Elongation
Primer-Hybridisierung	60	30 s	
Elongation	72	30 s	
Schmelzkurvenanalyse	95	1 min	1 Fluoreszenzmessung während Temperaturanstieg von 55 °C auf 95 °C
	55	30 s	
	95	30 s	

Das in Tab. 16 dargestellte Temperaturprofil wurde für die spezifischen PCR-Assays zur Detektion von *E. coli* bzw. *B. subtilis* verwendet.

7.1.1.2 *UniTOOL Resolight Assay*

Da es sich bei dem *UniTOOL Resolight Assay* um ein nicht kommerziell erhältliches Produkt handelt und somit auch kein Handbuch verfügbar ist, soll das Protokoll hier im Detail vorgestellt werden. Prinzipiell wurde das *UniTOOL Resolight Kit* nur für die Anwendung mit dem PCR-Gerät LightCycler 2.0 entwickelt. Nichtsdestotrotz konnte in Vorversuchen die Funktionalität auf dem *thermocycler MxPro 3005P* (Agilent) nach Modifizierung des Temperaturprofils ebenfalls bestätigt werden, so dass aus Verfügbarkeitsgründen sämtliche PCR-Läufe auf diesem Gerät liefen. In Tabelle Tab. 17 ist das verwendete Temperaturprofil dargestellt.

Tab. 17: Temperaturprofil *UniTOOL Resolight*, modifiziert für MxPro 3005P

Anzahl d. Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit	Beschreibung der Zyklen
1	40	5 min	Uracil-N-Glycosylase-Schritt
1	95	10 min	Initiale Denaturierung
45	95	15 s	Denaturierung
	60	30 s	Primer-Hybridisierung
	72	40 s	Elongation
1	95	60 s	Schmelzkurvenanalyse
	40	60 s	
	90	1 s	
1	40	30 s	Kühlschritt

Ein *UniTOOL*-Reaktionsansatz setzt sich stets wie folgt zusammen:

Enzymlösung	0,26 µl
Reaktionspuffer	5,74 µl
PCR-H ₂ O	2,28 µl
Primer-Mix	1,40 µl (Fungi/gramnegativ/grampositiv)
Resolight Farbstoff	0,32 µl

Anschließend wurden pro PCR-Ansatz 10 µl Mastermix und 10 µl Probe/DNA-Extrakt in jedes PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Auswertung erfolgt anhand der Ct-Werte unter Zuhilfenahme der Schmelzkurvenanalyse. Es wurden stets jeweils fünf Reaktionen einer PCR-Negativkontrolle und eines Plasmidstandards (Kit-Bestandteil) mit 100 Kopien pro Reaktion als Kontrollreaktionen parallel amplifiziert, um die Gültigkeit des jeweiligen PCR-Laufs sowie den *cut off* Wert zu definieren. Das Vorgehen bei der *cut off* Bestimmung und die Beurteilung, ob ein PCR-Lauf überhaupt gültig ist, ist ausführlich in Kapitel 4.6 beschrieben.

Prinzipiell ist die vollständige Probenvorbereitung und der PCR-Ansatz unter sterilen und DNA-freien Bedingungen durchzuführen, da das Assay hochsensitiv ist und mit universellen Primern arbeitet, die jede Art von bakterieller oder Fungi DNA detektieren.

7.1.1.3 Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese

Es wurde eine Gelelektrophorese-Kammer der Firma Biometra, Modell Compact M, für 100 ml eines 1,5 %igen Agarosegels (Agarose Star Pure, Starlab) verwendet. In die Gellösung wurden zusätzlich 10 µl GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Fluoreszenzfarbstoff von Lonza) pipettiert, so dass sich eine 1:10.000 Verdünnung des Farbstoffs ergab. Die Geltaschen wurden stets mit 10 µl Probe (1:6 verdünnt mit 6x Gelladepuffer von Carl-Roth) bzw. mit 3 µl eines Größenstandards (100 bp Rainbow eXtended DNA Marker, Bioron) beladen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente im Gel erfolgte bei 120 V in 1x TBE-Puffer (Rotiphorese 10x TBE Puffer, Carl Roth, 1:10 verdünnt). Zur Geldokumentation wurde das Gerät BioDoc Analyze von Biometra verwendet.

7.1.1.4 Microsart Amp Extraction Kit

1. 200 µl Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorlegen
2. 200 µl Puffer A hinzufügen und vortexen (bei Proben mit Proteinkonzentrationen >10 mg/ml zusätzlich 10 µl Proteinase K hinzufügen) und mindestens 15 min bei 56 °C inkubieren
3. 200 µl Ethanol hinzufügen und vortexen
4. Silica-Säule in ein Auffanggefäß einsetzen und das Lysat auf die Silica-Säule pipettieren
5. 1 min bei 10.600 x g zentrifugieren und anschließend den Durchfluss verwerfen
6. 500 µl Puffer B auf die Silica-Säule pipettieren
7. 1 min bei 10.600 x g zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
8. 500 µl Puffer C auf die Silica-Säule pipettieren
9. 1 min bei 10.600 x g zentrifugieren und Silica-Säule in ein neues Auffanggefäß einsetzen
10. 1 min bei 13.000 x g zentrifugieren, um Reste von Puffer C zu entfernen
11. Auffanggefäß verwerfen und Silica-Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß einsetzen
12. Mind. 50 µl Puffer D (auf 70 °C temperiert) auf die Silica-Säule pipettieren und 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
13. 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren und anschließend die Silica-Säule verwerfen
14. Das Eluat kann direkt in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden

7.1.1.5 Protokoll der Sartorius Sample Prep

1. Membranfiltration einer wässrigen Probe unter Verwendung einer Microsart@filter Einheit (Plastik *funnel* und Plastik-Basis, Sartorius) bestückt mit einer 47 mm *track etch* Polycarbonat-Membran (0,4 µm Porendurchmesser, 6 bis 11 µm Membrandicke, Whatman). Microsart@filter Einheit mit Membranfilter werden ETO-sterilisiert eingesetzt. Weiteres Filtrationsequipment umfasst eine Filtrationsleiste und eine Microsart e.jet Pumpe (Sartorius)
2. Entfernung des *funnels* und Aufnahme des Membranfilters mithilfe des PSA (*pressure sensitive adhesive*) des Oberteils der Membrantransfer- und Auflösungseinheit (ETO-steril)
3. Verbinden des Ober- und Unterteils der Membrantransfer- und Auflösungseinheit über eine irreversible Schnappverbindung
4. Auffanggefäß (ETO-steril) mit Schraubdeckel mit einem Fassungsvermögen von 2 ml enthält 750 µl Chloroform (DNA- und DNase-frei) und optional 15 Mahlkugeln (Stahl, 3 mm Durchmesser) für den Zellaufschluss von beispielsweise bakteriellen Sporen. Das geöffnete Auffanggefäß ist am Auslass des Unterteils über eine Steckverbindung zu befestigen (sich nach unten hin verjüngender Auslass wird in offenes Auffanggefäß gesteckt)
5. Die Membrantransfer- und Auflösungseinheit mit Auffanggefäß wird kopfüber leicht geschüttelt, um das Chloroform vollständig vom Auffanggefäß in die Einheit zu überführen. Der Spalt im Auslass und die Mahlkugelgröße wurden so gewählt, dass ein Übertreten der Mahlkugeln vom Auffanggefäß in die Membrantransfer- und Auflösungseinheit nicht möglich ist. Anschließend wird die Membrantransfer- und Auflösungseinheit mit dem Auffanggefäß kopfüber wenige Sekunden leicht geschwenkt, um ein vollständiges Auflösen des Membranfilters zu gewährleisten
6. Die Membrantransfer- und Auflösungseinheit mit befestigtem Auffanggefäß wird aufrecht in den speziellen Zentrifugenadapter überführt. Es handelt sich hierbei um einen Ausschwingzentrifugenadapter, um ein quantitativ vollständiges Überführen der gelösten Membran inklusive der durch die Membran zurückgehaltenen Mikroorganismen und des Lösungsmittels zu gewährleisten. Des Weiteren ist der Zentrifugenadapter derart konstruiert, dass ein Abfallen/Lösen des Auffanggefäßes während des Zentrifugationsschrittes unterbunden wird. Der Zentrifugenadapter wird in eine passende Zentrifuge montiert, und es folgt eine einminütige Zentrifugation bei etwa 3.400 x g, um die im Chloroform gelöste Membran inkl. zurückgehaltenen Mikro-

- organismen vollständig in das Auffanggefäß mit den optional enthaltenen Mahlkugeln zu überführen
7. Das Auffanggefäß wird von der Membrantransfer- und Auflöseeinheit entfernt und mithilfe eines Schraubdeckels fest verschlossen
 8. Optional um Sporen aufzuschließen und deren DNA zugänglich zu machen, wird das Auffanggefäß 1 bis 2 min bei 6,5 m/s im Homogenisator „FastPrep-24 Instrument“ (MP Biomedicals) prozessiert (Alternativ sind auch andere Homogenisatoren mit vergleichbarer Leistung einsetzbar)
 9. Es folgt die Zugabe von 500 µl eines Lysepuffers, der sich nicht mit der organischen Chloroform-Phase mischt und zur Ausbildung zweier Phasen führt (z.B. Archive Pure DNA Lysis Buffer, 5Prime)
 10. Im nächsten Schritt folgt eine 10minütige Extraktion (DNA aus organischer in wässrige Phase extrahieren) bei Raumtemperatur. Hierfür ist das Auffanggefäß entweder horizontal auf einem Vortexer oder horizontal auf einem Thermomixer bei etwa 750 upm zu befestigen
 11. In die Öffnung des Auffanggefäßes wird eine Spatelspitze DNA- und DNase-freie Silikonpaste geben (GE Bayer Silicones, hochviskos)
 12. Das Auffanggefäß wird etwa 3 min bei ~16.000 x g zentrifugiert, so dass sich drei Phasen aufgrund der unterschiedlichen Dichten separieren. Die obere wässrige Phase inklusive DNA, die mittlere Silikongelphase als Sperrschicht und die untere organische Phase. Die obere wässrige Phase wird mithilfe einer Pipette vollständig in ein neues, leeres 1,5 ml Auffanggefäß überführt
 13. 600 µl Isopropanol und 2 µl Glycogen als DNA *carrier* hinzufügen und etwa 50-mal das Reaktionsgefäß invertieren, um eine gute Durchmischung zu erreichen
 14. Das Reaktionsgefäß wird etwa 3 min bei ~16.000 x g zentrifugiert, so dass ein weißes DNA-Glycogen-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes zu erkennen ist
 15. Isopropanol wird verworfen, so dass das DNA-Glycogen-Pellet im Reaktionsgefäß verbleibt
 16. Zum DNA-Glycogen-Pellet werden 600 µl 70 % Ethanol pipettiert und das Reaktionsgefäß anschließend etwa 20-mal invertiert
 17. Das Reaktionsgefäß wird 1 min bei ~16.000 x g zentrifugiert
 18. 70 % Ethanol wird verworfen. Das DNA-Glycogen-Pellet verbleibt im Reaktionsgefäß

19. Das DNA-Glycogen-Pellet im geöffneten Reaktionsgefäß entweder 10 min bei 37 °C im verschlossenen Thermoblock oder 15 bis 20 min unter der Sterilwerkbank trocknen lassen, um Ethanol-Reste zu entfernen, da diese als PCR-Inhibitoren wirken
20. Pellet in 50 bis 100 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 7-8, DNA-frei) 1 h lösen bei 65 °C im Thermoblock (im geschlossenen Reaktionsgefäß)
21. Analyse des DNA-Extraktes mithilfe von quantitativer *realtime* PCR

7.1.1.6 RPA-Assay mit dem Kit TwistAmp fpg

Der Reaktionsstart erfolgte jeweils durch die parallele Zugabe von Magnesiumacetat. Die Reaktionen liefen jeweils 30 min bei 37 °C. Bei den SYBR Green enthaltenden Proben wurde im 30 Sekunden Abstand die Fluoreszenz gemessen. Bei Proben ohne SYBR Green wurde in den meisten Fällen durch Zugabe von beispielsweise Lysepuffer die Reaktion gestoppt, um anschließend die DNA aufzureinigen und mithilfe einer Gelelektrophorese zu analysieren.

Zusammensetzung einer 50 µl Reaktion ohne Fluoreszenzdetektion:

1	Lyophilisiertes Pellet des RPA-Kits „TwistAmp fpg“
29,5 µl	Puffer des RPA-Kits „TwistAmp fpg“
420 nM	Primer SEQ1 5' CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 3'
420 nM	Primer SEQ2 5' TAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT 3'
14,2 µl	Probe
12 mM	MgAc

Zusammensetzung einer 50 µl Reaktion mit *realtime* Fluoreszenzdetektion:

1	Lyophilisiertes Pellet des RPA-Kits „TwistAmp fpg“
29,5 µl	Puffer des RPA-Kits „TwistAmp fpg“
420 nM	Primer SEQ1 5'-CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC-3'
420 nM	Primer SEQ2 5'-TAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT-3'
1 µl	SYBR Green I (1:50.000 verdünnt)
13,2 µl	Probe
12 mM	MgAc

7.1.1.7 Probenvorbereitung mit dem SeptiFast Prep Kit

1. Membranfiltration der Probe durch eine 0,4 µm Polycarbonat-Membran und lösen des Membranfilters in 750 µl Chloroform
2. 150 µl Proteinase K in Reaktionsgefäß I (15 ml Falcon) vorlegen
3. In Chloroform gelösten Membranfilter in Reaktionsgefäß I überführen und vortexen
4. 10 µl interne Kontroll-DNA hinzufügen
5. Den Inhalt von zwei Reaktionsgefäßen Lysis Buffer hinzufügen und vortexen
6. In einem Thermomixer 15 min bei 56 °C bei 500 upm inkubieren
7. Den Inhalt von einem Reaktionsgefäß Binding Buffer hinzufügen und vortexen
8. Eine Silica-Säule in Reaktionsgefäß II (15 ml Falcon) einsetzen
9. Die Hälfte des Probenvolumens von Reaktionsgefäß I in die Silica-Säule pipettieren
10. Silica-Säule + Reaktionsgefäß II 1 min bei 1.900 x g zentrifugieren
11. Rest des Probenvolumens von Reaktionsgefäß I in die Silica-Säule pipettieren
12. Silica-Säule + Reaktionsgefäß II 3 min bei 1.900 x g zentrifugieren
13. Silica-Säule in Reaktionsgefäß III einsetzen (Durchfluss verwerfen)
14. Den Inhalt von einem Reaktionsgefäß Inhibitor Removal Buffer auf die Silica-Säule in Reaktionsgefäß III geben
15. Silica-Säule + Reaktionsgefäß III 2 min bei 4.200 x g zentrifugieren
16. Den Inhalt von einem Reaktionsgefäß Washing Buffer auf die Silica-Säule in Reaktionsgefäß III geben
17. Silica-Säule + Reaktionsgefäß III 10 min bei 4.200 x g zentrifugieren
18. Silica-Säule in Reaktionsgefäß IV einsetzen (Durchfluss verwerfen)
19. Silica-Säule + Reaktionsgefäß IV 1 min bei 4.200 x g zentrifugieren
20. Silica-Säule in Reaktionsgefäß V einsetzen
21. 300 µl auf 70 °C temperierten Elution Buffer in die Silica-Säule pipettieren
22. 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
23. 2 min bei 4.200 x g zentrifugieren
24. Silica-Säule verwerfen und Eluat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
25. Analyse des DNA-Extraktes mithilfe des *UniTOOL Resolight Assays*

7.1.2 Verwendete Chemikalien

Tab. 18: Liste der verwendeten Chemikalien

<i>Chemikalien/Reagenzien</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller</i>
Maxima SYBR Green qPCR Master-mix (inkl. ROX, H ₂ O PCR-Qualität)	K0251	Thermo Fisher Scientific Inc.
GelStar Nucleic Acid Stain	5035	Lonza Group Ltd.
Agarose Star Pure Low EEO Standard	N3 101-0100	Starlab GmbH
6x Gel-Ladepuffer	HP03.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
100 bp Rainbow eXtended DNA Marker	304205	Bioron GmbH
Rotiphorese 10x TBE Puffer	3061.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol Rotipuran > 99,8 %	9065.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
2-Propanol Rotipuran > 99,8 %	6752.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Roti-Chloroform	X984.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Archive Pure DNA Lysis Solution	2301330	5 Prime GmbH
GE Bayer Silicone, hochviskos	0857.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glycogen	733-1048	5 Prime GmbH
Primer	HPSF- Qualität; lyophilisiert	Eurofins MWG GmbH
SYBR Green I	86205	Sigma-Aldrich Co. LLC. (Fluka)
KH ₂ PO ₄	1.04873.1000	Merck KGaA
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	1.06580.1000	Merck KGaA
Natriumchlorid	3957	Carl Roth GmbH + Co. KG
KCl	60130	Sigma-Aldrich Co. LLC. (Fluka)
CASO-Bouillon	1054580500	Merck KGaA
Tris	1.08387.2500	Merck KGaA
HCl 32 %	1003132500	Merck KGaA
EDTA	03695	Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Triton X 100	93418-250ML	Sigma-Aldrich Co. LLC. (Fluka)
Roti Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	A156.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Guanidinhydrochlorid	0037.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Genomische Maus-DNA	Bio-35027	Bioline GmbH
DNA Remover (DNA-Denkontaminationsspray)	15-2200	Minerva Biolabs GmbH
Sartorius Nähragar nach DEV	14144-----IN	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Flüssig-Stickstoff	Labor- u. Analytik-Gas	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH
Methylenchlorid	Industrial	Akzo Nobel GmbH

	Chemicals	
Dimethylsulfoxid	4720.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
<i>Legionella</i> DNA Standard	52-0101	Minerva Biolabs GmbH
CaCl ₂ *2 H ₂ O	1.02382.5000	Merck KGaA
Natriumacetat	S8750-250G	Sigma-Aldrich Co. LLC.
MgCl ₂	8.14733.0500	Merck KGaA
Piperidin	411027-100ML	Sigma-Aldrich Co. LLC.
PCR grade Water (DNA frei)	03315932001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Chlordioxid	Dx-Dox	Dr. Kücke GmbH
NaSO ₃	71990	Sigma-Aldrich Co. LLC. (Fluka)
Propidiummonoazid (20 mM)	40019	Biotium, Inc.

7.1.3 Verwendete Lösungen/Puffer

10x PBS (phosphate buffered saline)

2,4 g	KH ₂ PO ₄
14,4 g	Na ₂ HPO ₄
80,0 g	NaCl
0,2 g	KCl

Die entsprechend eingewogenen Chemikalien wurden in Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) gelöst und bei etwa 20 °C auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Volumen auf 1 Liter mit Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) aufgefüllt. Diese 10fach konzentrierte Stammlösung wurde vor der Verwendung stets 1:10 verdünnt.

CASO-Bouillon

30 g CASO-Granulat wurden in 1 Liter RO-Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

Zusammensetzung des CASO-Granulats (Merck):	17,0 g	Pepton aus Casein
	3,0 g	Pepton aus Sojamehl
	5,0 g	NaCl
	1,5 g	D(+) Glucose-Monohydrat
	2,5 g	Dikaliumhydrogenphosphat

Lysepuffer

Dieser Lysepuffer eignet sich vor allem für den Zellaufschluss grampositiver Bakterien. Es wurde eine Lösung in Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) mit 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 % Triton X 100 hergestellt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf 8 eingestellt, und die Lösung mit 20 mg/ml Lysozym versetzt.

Kollagenase-Puffer

Die 10x PBS-Stammlösung wurde 1:10 in Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) verdünnt und mit 3 mM Kalziumchlorid versetzt.

Zellulase-Puffer

Es wurde eine 0,1 M Natriumacetat-Lösung in Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) angesetzt (pH-Wert 4,5).

Alginate-Lyase-Puffer

Es wurde eine Lösung in Reinstwasser (Arium Pro VF, Sartorius) mit 30 mM Tris und 30 mM Magnesiumchlorid hergestellt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt.

7.1.4 Verwendete Kits

Tab. 19: Lister der verwendeten Kits

<i>Kit-Bezeichnung</i>	<i>Modell- bzw. Bestellnummer</i>	<i>Hersteller</i>
<i>UniTOOL Resolight Assay</i>	nicht kommerziell erhältlich	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
<i>AquaScreen Legionella species qPCR Detection Kit</i>	Art.-Nr. 33-2100	Minerva Biolabs GmbH
<i>AquaScreen Legionella pneumophila qPCR Detection Kit</i>	Art.-Nr. 34-2100	Minerva Biolabs GmbH
<i>OnarLp qPCR Detection Kit</i>	nicht mehr erhältlich	Minerva Biolabs GmbH
LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit	Art.-Nr.: L7007	Life Technologies Corporation
NucleoSpin Tissue	REF: 740952.50	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Archive Pure DNA Kit	Cat. No.: 2301210	5 Prime GmbH
Microsart AMP Extraction	SMB95-2003	Sartorius Stedim Biotech GmbH
TwistAmp fpg Kit	Product Code: TAFPG01kit	TwistDX Limited
SeptiFast Prep Kit	REF: 04 404 459 001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Microbank	Art.-Nr.: PL172/M	Pro-Lab Diagnostics Inc.

7.1.5 Verwendete Enzyme

Tab. 20: Liste der verwendeten Enzyme

<i>Enzyme</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller</i>
Lysozym	28260	SERVA Electrophoresis GmbH
Proteinase K	740396	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Kollagenase NB 4 Standard Grade (<i>C. histolyticum</i>)	17454.01	SERVA Electrophoresis GmbH
Zellulase (<i>Trichoderma viride</i>)	16427.01	SERVA Electrophoresis GmbH
Alginat-Lyase	A1603-100MG	Sigma-Aldrich Co. LLC.
RNase A	2301410	5 Prime GmbH
DNase (inkl. Reaktionspuffer und EGTA-Stop-Solution)	M6101	Promega GmbH

7.1.6 Verwendete bakterielle Stämme

Tab. 21: Liste der verwendeten bakteriellen Stämme

<i>Spezies</i>	<i>DSM</i>	<i>ATCC</i>	<i>Risikogruppe</i>	<i>Lieferant</i>
<i>Escherichia coli</i>	1576	8739	2	Doenitz ProLab
<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	347	6633	1	Doenitz ProLab
<i>Legionella pneumophila subsp. pneumophila</i> (Serogruppe 1)	7513	33152	2	Doenitz ProLab
<i>Bacillus subtilis</i> Sporen-Suspension 10 ⁷ KBE/ml ; Cat. No. 1.10649.0001	/	/	1	Merck KGaA

7.1.7 Verwendetes Laborequipment

Tab. 22: Liste des verwendeten Laborequipments

<i>Laborequipment</i>	<i>Modell-/Bestellnummer</i>	<i>Hersteller</i>
realtime PCR cyclers	Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies Deutschland GmbH
Vortex-Mixer	Best.-Nr. 444-1372	VWR International GmbH
Pipette	Reference 0,5-10 µl	Eppendorf AG
Pipette	Reference 2,0-20 µl	Eppendorf AG
Pipette	Reference 10-100 µl	Eppendorf AG
Pipette	Reference 50-200 µl	Eppendorf AG
Pipette	Reference 100-1000 µl	Eppendorf AG

Mikrozentrifuge	Heraeus Biofuge pico	Thermo Fisher Scientific Inc.
Zentrifuge für PCR-Reaktionsgefäße	Micro Centrifuge AL 220VAC	Carl Roth GmbH + Co. KG
Universalzentrifuge	Typ 2-15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH
Universalzentrifuge	Typ 3-16	SIGMA Laborzentrifugen GmbH
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Compact M	Biometra GmbH
Gel-Dokumentation	BioDoc Analyze	Biometra GmbH
Elektrophorese-Netzteil	Modell E835	Consort bvba
Thermomixer für 1,5 ml/2 ml Reaktionsgefäße	Mixing Block MB-102	Bioer Technology CO. LTD
Zentrifugen-Adapter für Membrantransfer- und Auflöse-Einheit	Modell 90672	SIGMA Laborzentrifugen GmbH
Zentrifugen-Becher für Membrantransfer- und Auflöse-Einheit	Modell 13180	SIGMA Laborzentrifugen GmbH
Microsart e.jet Pumpe (Sartorius)	Best.-Nr. 166MP-4	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Filtrationsleiste	Combisart, 1-fach-Leiste	Sartorius Stedim Biotech GmbH
<i>laminar flow</i> Sterilwerkbank	Hero Safe Type KS15	Thermo Electron LED GmbH
Gefrierschrank (- 80 °C)	Typ 6483	GFL mbH
Kühlschrank/ Gefrierschrank	Premium Biofresh NoFrost	Liebherr-International Deutschland GmbH
Trockenschrank (50 °C)	UFE 500 Universalschrank	Memmert GmbH & Co. KG
Autoklav	Varioklav Typ 300E	H+P Labortechnik AG
Brutschrank (37 °C)	Heraeus Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc.
Inkubationsschüttler	Certomat	Sartorius Stedim Biotech GmbH
UV/VIS-Spektrometer	Lambda 25 UV/VIS-Spektrometer	PerkinElmer Inc.
pH-Meter	Typ 913 pH	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG
Rasterelektronenmikroskop	Quanta 200 F	FEI
Spatter Coater	Typ K550	EmiTech Ltd.

Bubble Point und Durchfluss Messgerät	Spezialanfertigung	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Mikroskop inkl. Fluoreszenzequipment	Modell BX51	Olympus Corporation
Kamera (Mikroskop)	AxioCam MRN	Carl Zeiss AG
Ultraschall-Sonde	20 kHz, Vibra Cell 5020 AT, 50 Watt	Sonics & Materials, Inc.
Ultraschall-Sonde	40 kHz, Vibra Cell 5020 AT, 50 Watt	Sonics & Materials, Inc.
Pinzette	Best.-Nr. 615.105	RSG Rostfrei Schneidwerkzeuge GmbH
Membran-Stanzen (7 mm, 25 mm, 47 mm)	Spezialanfertigungen	C. Behrens Stanztechnik und Anlagen GmbH
Laborwaage	LP3200D u. LA8200S	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Homogenisator	Thermo Savant FastPrep FP120	Thermo Fisher Scientific Inc.
Homogenisator	FastPrep-24	MP Biomedicals LLC.
Homogenisator	Mikro-Dismembrator U	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Gerät für den Hochdruck-Zellaufschluss (<i>pressure cycling technology</i>)	Barocycler NEP 2320	Pressure BioSciences Inc.
Ultraschallbad	S10 Elmasonic (30 Watt)	Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG
Bunsenbrenner	1262, Propan-Gas	Juchheim Laborgeräte GmbH
Drigalski-Spatel	Best.-Nr. 231-2185	VWR International GmbH
Reaktionsgefäßständer (1,5/2 ml)	Best.-Nr. C773.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Reaktionsgefäßständer (15/50 ml)	Best.-Nr. K084.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
PCR-Cooler, 0,2 ml	Best.-Nr. 3881000.031	Eppendorf AG
Kamera	Modell NEX-5N	Sony Europe Limited
LED-Leiste (Wellenlänge 450 bis 500 nm)	Best.-Nr. D-03-14	Revoart LED Shop
Mikrowelle	HMT 72 M 450	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
Reinstwassersystem (für DNA-freies Wasser)	Arium Pro VF	Sartorius Stedim Biotech GmbH

7.1.8 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tab. 23: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller</i>
Reaktionsgefäße (1,5 ml, PCR-clean)	0030 123.328	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel (2 ml)	CK65.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Deckel für qPCR-Reaktionsgefäße (8er Strips)	# 401425	Agilent Technologies Deutschland GmbH
Reaktionsgefäße für qPCR (8er Strips)	# 401428	Agilent Technologies Deutschland GmbH
Polycarbonat-Membran 0,2 µm	111106	Whatman Ltd.
Polycarbonat-Membran 0,4 µm	111107	Whatman Ltd.
Zelluloseacetat-Membran 0,2 µm	11107--47----ACN	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Zelluloseacetat-Membran 0,45 µm	11106--47----ACN	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Polyethersulfon-Membran 0,2 µm	15407--47----MIN	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Polyethersulfon-Membran 0,45 µm	15406--47-----N	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Zellulosenitrat-Membran 0,2 µm	11407--47----ACN	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Zellulosenitrat-Membran 0,45 µm	11306--47----ACN	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Regenerierte Zellulose 0,45 µm	18406--47----HDN	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Vivacon 500 (Einzelteile ohne Membran)	nicht kommerziell erhältlich	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Polycarbonat-Membran, schwarz, 0,2 µm	7063-2502	Whatman Ltd.
Drehteile der Membrantransfer- u. Auflöseinheit (Prototypen)	Spezialanfertigung, nicht kommerziell erhältlich	Sommer GmbH
Microsart® Filter Einzelteile (base + funnel)	nicht kommerziell erhältlich	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Zählkammern (C-Chip Neubauer Improved)	84-DHCN-01	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Petrischalen (6 cm, Plastik)	14311--60-----N	Sartorius Stedim Biotech GmbH
REM-Stiftprobenteller	G301	Plano GmbH
REM-Leit-Tabs	G3347	Plano GmbH
Metallkugel (Ø 3 mm)	116925050	MP Biomedicals LLC.
Silica-Partikel (Ø 0,1 mm)	116540428	MP Biomedicals LLC.
Keramikkugel (Ø 3 mm)	116540034	MP Biomedicals LLC.

Matristypt (poröse Kollagen-Matrix)	83212-001	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG
Matristypt (stärker vernetzt)	Spezialanfertigung, nicht kommerziell erhältlich	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG
Kollagenfolie (nicht porös)	Spezialanfertigung, nicht kommerziell erhältlich	RESORBA Medical GmbH
Alginat (poröse Matrix)	10007431	Advanced Medical Solutions Group plc
Pipettenspitzen (Dualfilter, PCR clean, sterile)	0030 077.520 (0,5-20 µl) 0030 077.555 (2-200 µl) 0030 077.571 (50-1000 µl)	Eppendorf AG
Sartobind Q pico	92IEXQ42DD-11--D	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Vivaspin 15R 10 kDa	VS15RH01	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Küvetten (UVette 50-2000 µl)	0030 106.318	Eppendorf AG
50 ml Zentrifugenröhrchen	430829	Corning Incorporated

7.2 Technische Zeichnungen der Membrantransfer- und
Auflöseeinheit

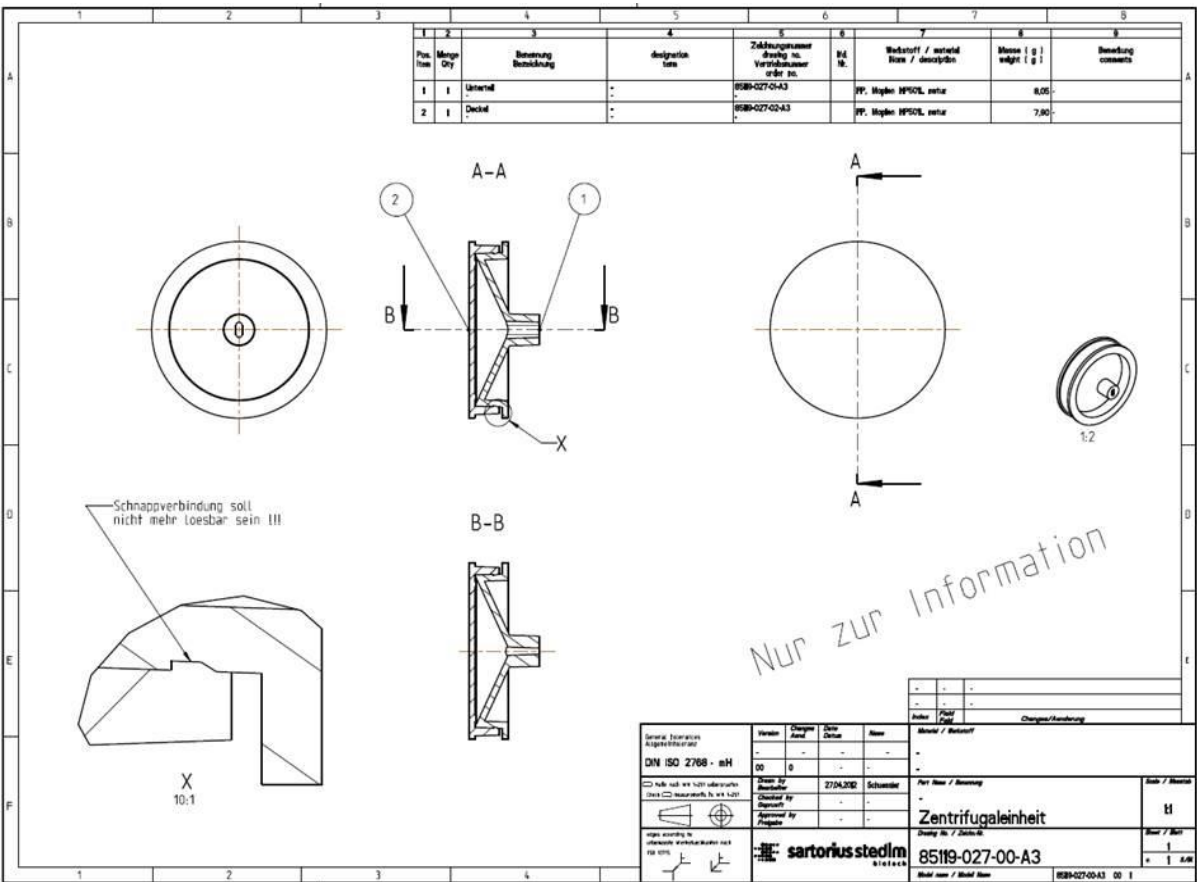


Abb. 42: Gesamtübersicht der Membrantransfer- und Auflöseeinheit mit irreversibler Schnappverbindung von Ober- und Unterteil

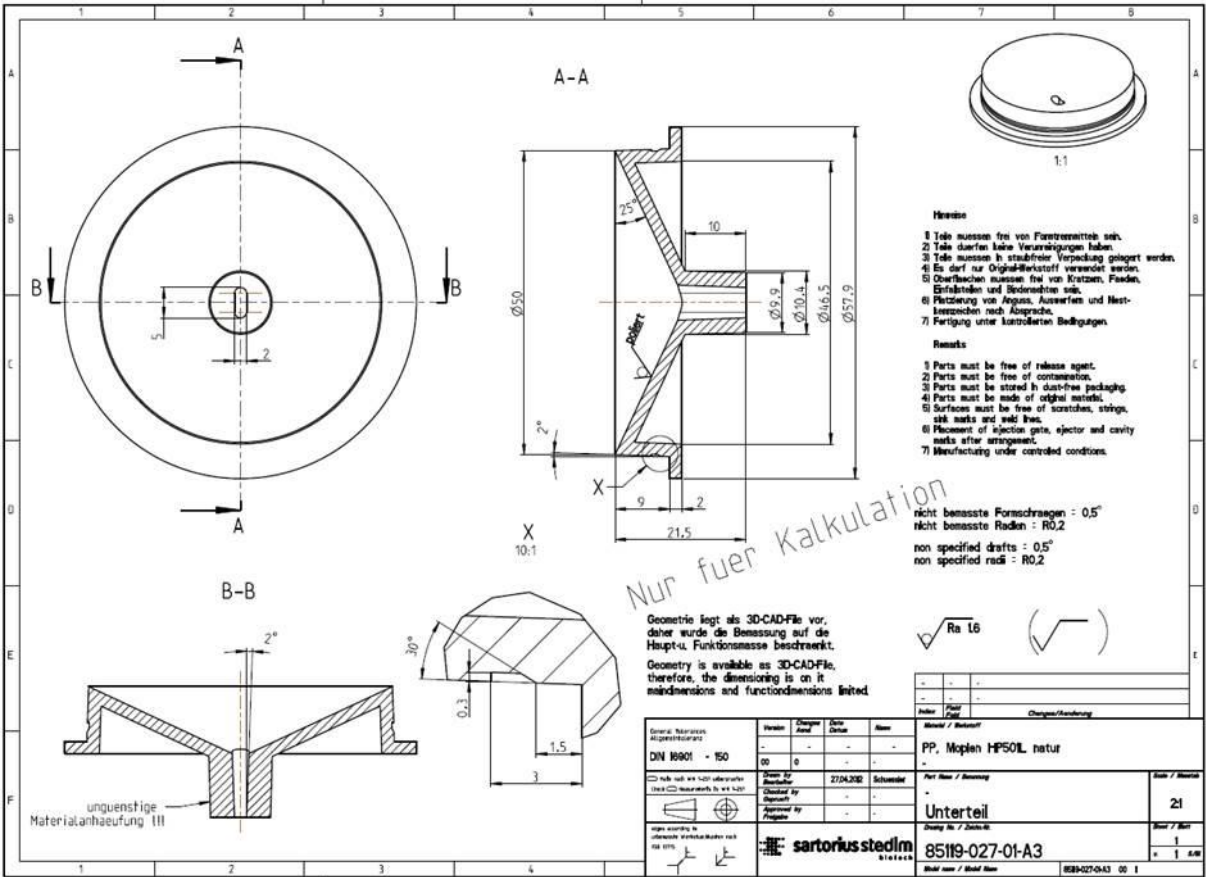


Abb. 43: Unterteil mit Auslasse der Membrantransfer- und Auflöseeinheit

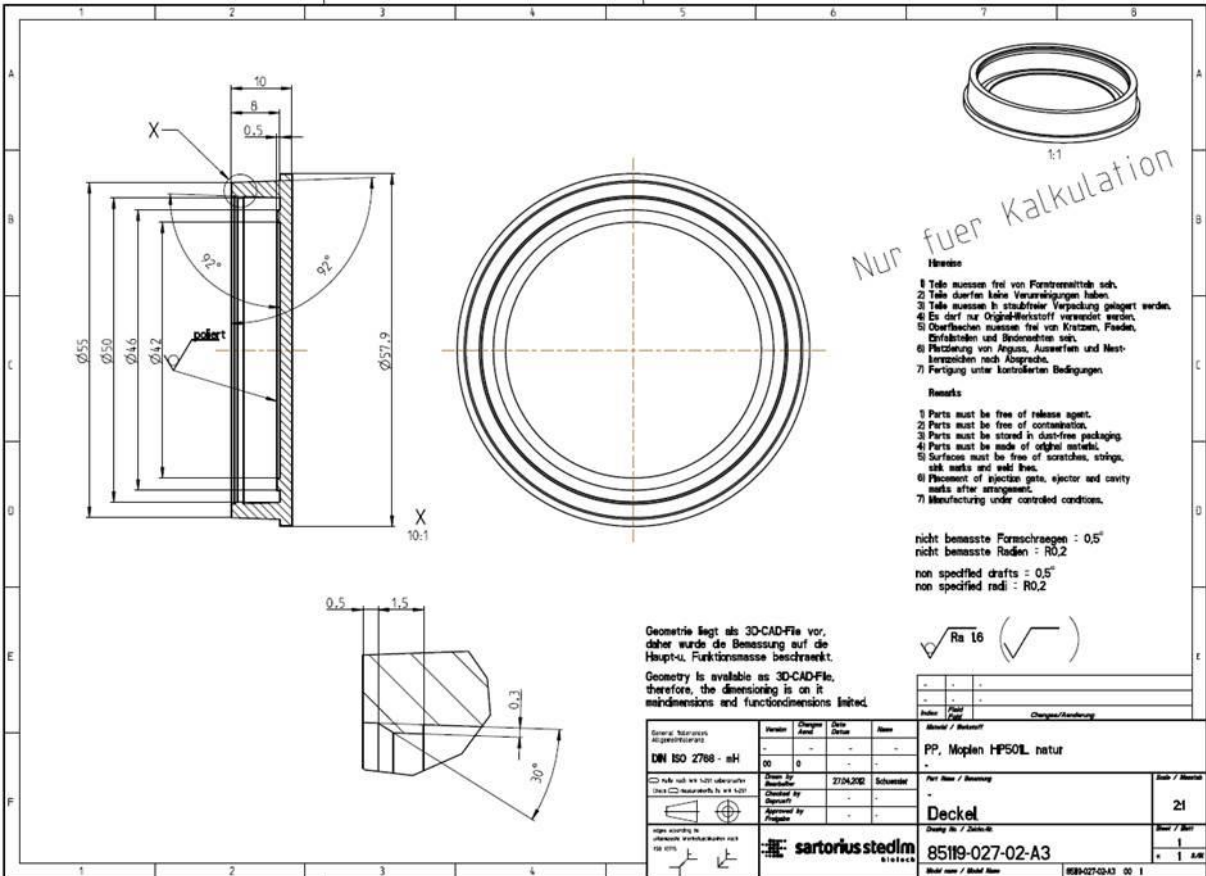


Abb. 44: Oberteil der Membrantransfer- und Auflöseeinheit