

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

Entwicklung und Optimierung
eines auf Chemilumineszenz basierenden,
nicht radioaktiven DNA-Nachweisverfahrens
und der Vergleich mit einer etablierten
Enzym-Immuno-Methode

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Astrid Ohlmann
aus Hamburg

Lübeck 2004

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Dennin

2. Berichterstatterin:

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Bärbel Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

08.02.2005

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den

08.02.2005

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Für Erik, meinen Sohn

INHALTSVERZEICHNIS**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

1.	EINLEITUNG	
1.1.	Einführung in die Thematik	1
1.2.	Zielsetzung	5
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1.	Reagenzien und Lösungen	6
2.2.	Geräte	8
2.3.	Anreicherung, Isolierung und Reinigung der Cytomegalie Plasmid-DNA	8
2.3.1.	Anreicherung des Plasmids (pCM 5018)	8
2.3.2.	Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA	9
2.4.	Elektrophoretische Isolierung der J-Fragment DNA aus der Cytomegalie Plasmid-DNA	11
2.4.1.	Spaltung der Cytomegalie Plasmid-DNA mit der Endonuklease Eco R1	11
2.4.2.	Auftrennung der DNA-Fragmente in der horizontalen Gelelektrophorese	13
2.4.3.	Isolierung der J-Fragment DNA Bande aus dem Gel mit der Elektroelutionsmethode	14
2.5.	Elektrophoretische Trennung der Cytomegalie Plasmid-DNA für die Versuchsfilter	15
2.5.1.	Restriktionsansatz und elektrophoretische Trennung	15
2.5.2.	Blotting der DNA-Fragmente auf Membranen	16
2.6.	Dotblotting von Cytomegalie Plasmid-DNA und J-Fragment DNA	18
2.6.1.	Dotblotting von Cytomegalie Plasmid-DNA	18
2.6.2.	Dotblotting von markierter J-Fragment DNA	19
2.7.	Markierung der J-Fragment DNA nach der „random primed“ Methode	20
2.8.	Hybridisierung der filtergebundenen Cytomegalie Plasmid-DNA	21

2.9.	Nichtradioaktiver DNA-Nachweis	23
2.9.1.	Kolorimetrischer DNA-Nachweis	24
2.9.2.	DNA-Nachweis mittels der Chemilumineszenz	24
2.10.	Aufarbeitung von humanen Cytomegalieviren und Urinproben für den direkten Virus-Nachweis	25
2.10.1.	Aufarbeitung von humanen Cytomegalieviren	25
2.10.2.	Vorbereitung der Urinproben für den Cytomegalie DNA-Nachweis	26
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	J-Fragmentisolierung aus dem Elektrophoresegel	28
3.2.	Optimierung des DNA Nachweises mittels der Chemilumineszenz dargestellt an J-Fragment DNA und Cytomegalie Plasmid-DNA	30
3.2.1.	Nachweis von J-Fragment DNA bei konstanter AMPPD- Konzentration und verschiedenen Expositionszeiten	30
3.2.2.	Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA bei konstanter AMPPD-Konzentration und verschiedenen Expositionszeiten	33
3.2.3.	Nachweis von J-Fragment DNA mit unterschiedlichen AMPPD- Konzentrationen und 2 h Expositionszeit	37
3.2.4.	Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA mit unter- schiedlichen AMPPD-Konzentrationen und 2 h Expositionszeit	41
3.2.5.	Anwendung von Chemilumineszenzsignalverstärkern	44
3.3.	Vergleich der Chemilumineszenz- und der Enzym-Immuno- Methode dargestellt an elektrophoretisch getrennter Cytomegalie Plasmid-DNA	46
3.4.	Direkter Nachweis von Cytomegalieviren im Urin	49
4.	DISKUSSION	
4.1.	Stand der Forschung	55
4.2.	Diskussion der Methode	56
4.3.	Diskussion der eigenen Ergebnisse	59
4.3.1.	Expositionszeit von AMPPD	59

4.3.2.	Konzentration des Chemilumineszenzsubstrates AMPPD	60
4.3.3.	Vergleich der Chemilumineszenzmethode mit der Farbstoffmethode	60
4.3.4.	Nachweis von humanen Cytomegalieviren	62
5.	ZUSAMMENFASSUNG	63
6.	ANHANG	
6.1.	Arbeitsprotokolle der Vorversuche	64
6.1.1.	J-Fragmentisolierung aus elektrophoretisch getrennter Cytomegalie Plasmid-DNA	64
6.2.	Arbeitsprotokolle der Hauptversuche	67
6.2.1.	Anreicherung des Plasmids pCM 5018	67
6.2.2.	Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA	67
6.2.3.	Markierungsansatz	68
6.3.	Weiteres Bildmaterial über den Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA durch das Chemilumineszenzverfahren und der Enzym-Immuno-Methode	69
7.	LITERATURVERZEICHNIS	71
8.	DANKSAGUNG	81
9.	LEBENS LAUF	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMPPD	3-(2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
CMV	Cytomegalievirus
CsCl	Cäsiumchlorid
Dig-AP	Digoxigenin alkalische Phosphatase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
Fa	Firma
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
HCl	Salzsäure
hCMV	humanes Cytomegalievirus
H ₂ O	Wasser
kbp	Kilobasenpaare
Lsg.	Lösung
M	Molarität
mbar	Millibar
mU	Milliunits
N	Normalität
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsazl
Nr.	Nummer
P	Phosphat
Pat.	Patient
pCMV	Cytomegalievirus Plasmid
RNA	Ribonukleinsäure
S	Schwefel

Tab.	Tabelle
T _m	Schmelzpunkt der Nukleinsäure
U	Units, Enzymeinheit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1. Einführung in die Thematik

Die Entwicklung von spezifischen und sensitiven Nukleinsäurenachweisverfahren ist seit Jahren Gegenstand der molekularbiologischen Forschung. Dabei kommt dem Vorgang der Nukleinsäurehybridisierung eine zentrale Bedeutung zu.

Grundlage des spezifischen Nukleinsäurenachweises ist die von E.M. Southern 1975 beschriebene Methode. Dieses als Southern-Blotting bekannt gewordene Verfahren beinhaltet die Übertragung von elektrophoretisch getrennten Nukleinsäuresequenzen bzw. Fragmenten von einem Agarosegel auf geeignete Trägermembranen, wie z.B. Cellulose-, bzw. Nylonfilter. Der Nachweis der spezifischen Nukleinsäuren erfolgt anschließend durch die Hybridisierung mit radioaktiv markierter Sonden-DNA.

Dieser klassische Weg des Nukleinsäurenachweises mit den radioaktiv markierten Nukleinsäure-Sonden war eine weit verbreitete Technik, die jedoch mit einer Vielzahl von Problemen behaftet ist.

Radioisotope, wie ^{32}P , sind - bedingt durch ihre kurze Halbwertszeit - sehr instabil und erfordern somit für jeden DNA-Nachweis eine frisch markierte Sonden-DNA (Neumann et al., 1986). Außerdem stellt die energiereiche β -Strahlung bei dem Gebrauch von ^{32}P ein Gesundheitsrisiko für den Anwender dar (Martin et al., 1990). Die aufwendigen Genehmigungs-, Einrichtungs-, Kontroll- und Entsorgungsmaßnahmen für radioaktives Arbeiten forcierten die Suche nach anderen Techniken (Schneider und Müller, 1988).

Zum Zeitpunkt der Dissertation standen eine Reihe nichtradioaktiver Substrate für die Detektion der DNA-Hybride als Alternative zur Verfügung.

Wichtige Voraussetzung für die Weiterentwicklung des nichtradioaktiven DNA-Nachweises war die Sensitivität. Der radioaktive DNA-Nachweis zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, die es mit der nichtradioaktiven Methode ebenfalls zu erreichen galt (Chan et al., 1985; Neumann et al., 1986). Eine besondere Stellung innerhalb der nichtradioaktiven DNA-Nachweismethoden nehmen die Enzym-Konjugat-Systeme ein. Besonders sei das Biotin-Avidin/Streptavidin System erwähnt, das als erstes nichtradioaktives DNA-Nachweissystem entwickelt wurde (Langer et al., 1981).

Bei der Detektion biotinylierter DNA-Hybride bediente man sich der Affinität von Avidin zu Biotin. Ein an Avidin bzw. Streptavidin gekoppeltes Enzym wie z.B. die alkalische Phosphatase und die Zugabe von geeigneten chromogenen Substraten dieses Enzyms ermöglicht schließlich die Anfärbung der Hybridbande (Schneider und Müller, 1988).

Viele Autoren berichteten über die Anwendung dieses Systems, das eine hohe Sensitivität besitzt, aber auch den Nachteil hoher Hintergrundsignale aufweist (Gregsens et al., 1987; Kincaid und Nightingale, 1988; Pollard-Knight et al., 1990; Bronstein et al., 1990).

Zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeit dieser Zusammenschrift wurde im hiesigen Labor ein Verfahren benutzt, das von der Firma Boehringer-Mannheim entwickelt wurde und statt Biotin markierter DNA-Sonden Digoxigenin markierte DNA-Sonden für die Hybridisierung der immobilisierten Nukleinsäuren einsetzt. Dieses Substrat wird mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, nachgewiesen. Das zugesetzte chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und der Farbverstärker Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) präzipitieren in unmittelbarer Nähe der alkalischen Phosphatase zu einem violetten Farbstoffkomplex.

Der nichtradioaktive Nachweis von spezifischer, immobilisierter Ziel-DNA kann nach dieser Methode in drei Abschnitte unterteilt werden.

1. Die Markierung der Sonden-DNA durch den „random-primed“ Einbau mit Digoxigenin-markiertem Desoxyuridintriphosphat (dUTP) (Feinberg und Vogelstein, 1983).
2. Die Hybridisierung der nachzuweisenden Nukleinsäure mit der Digoxigenin-markierten Sonde.
3. Der Nachweis der Digoxigenin-markierten Hybriden mit dem Antikörper-Enzym-Konjugat (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, Dig-AP) und der nachfolgenden Enzym-katalysierten Farbreaktion mit BCIP und NBT.

Die folgende Abbildung 1 soll die drei Abschnitte des Nukleinsäurenachweises schematisch verdeutlichen.

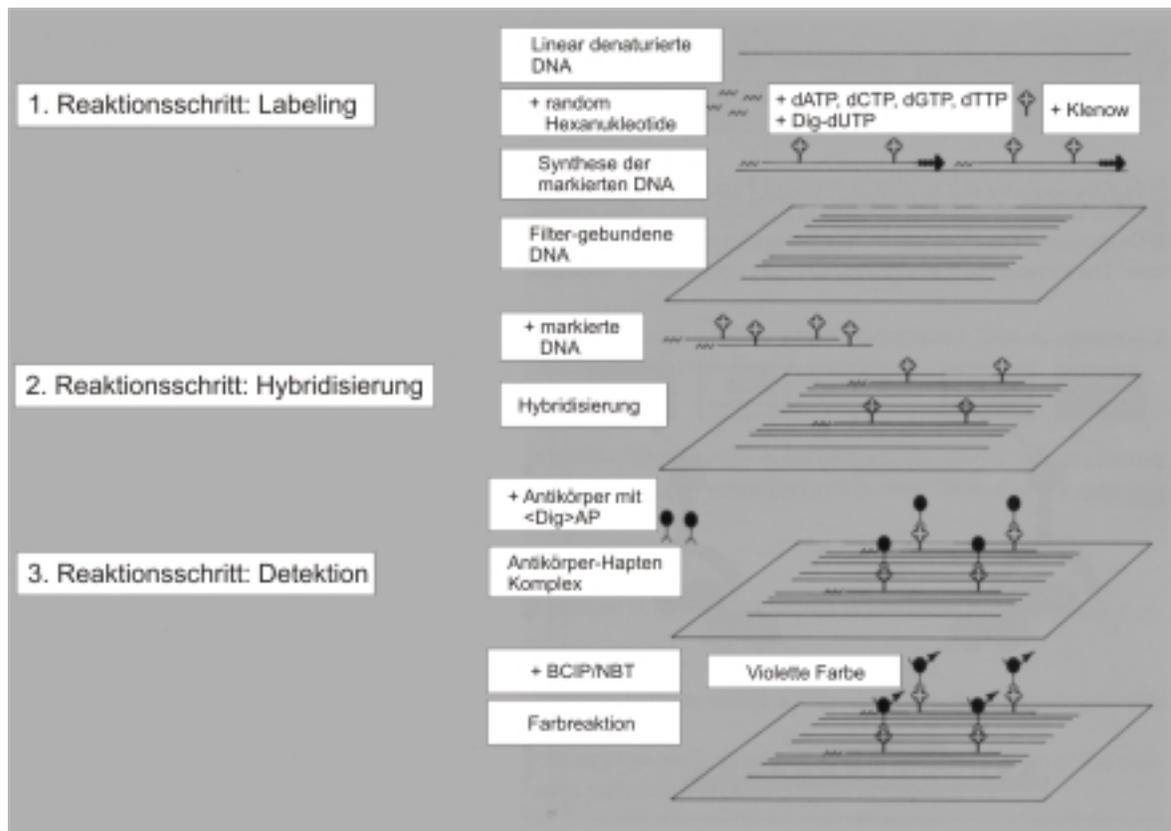


Abb. 1 : Nichtradioaktive DNA-Markierung, Hybridisierung und immunologischer Nachweis von membrangebundener DNA. Zunächst wird in einem ersten Reaktionsschritt die linearisierte und denaturierte DNA nach der sog. "random-primed"-Methode (siehe Abb. 5) mit Digoxigenin-markierten Desoxyuridinnukleotiden gekennzeichnet ("Labeling"). In einem zweiten Reaktionsschritt wird die Digoxigenin-markierte DNA mit der auf einer Membran bzw. auf einem Filter immobilisierten, nachzuweisenden DNA-Probe hybridisiert. Schließlich erfolgt in einem dritten Reaktionsschritt die Detektion der hybridisierten Digoxigenin-markierten DNA mit Hilfe der Enzym-Immunassay-Methode. Hierbei wird ein mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierter Antikörper verwendet, der spezifisch an Digoxigenin bindet. Die Lokalisation dieses Antikörper-Hapten-Komplexes wird durch eine Enzym-vermittelte Farbreaktion visualisiert. Die AP katalysiert hierbei die Umwandlung der farblosen BCIP/NBT-Lösung in ein violette Farbpräzipitat (modifiziert nach Boehringer Mannheim, 1989).

Die alkalische Phosphatase wird in Enzym-Konjugat-Systemen wegen ihrer zahlreichen Vorteile (Jablonski et al., 1986) bevorzugt eingesetzt. Zur Detektion der alkalischen Phosphatase mit Farbstoff bildenden Substraten werden in neuerer Zeit verschiedene Bio- und Chemilumineszenzsubstrate eingesetzt (Hauber und Geiger, 1987; Ureda et al., 1988; Beck et al., 1989; Bronstein et al., 1989a; Schaap et al., 1989; Musiani et al., 1991a).

Ein bekanntes Chemilumineszenzsubstrat ist das 3-(2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy) phenyl-1,2-dioxetane, kurz AMPPD genannt, das von der Firma Tropix entwickelt wurde. Die Herkunft des 1,2 Dioxetans bzw. AMPPDs, seine genaue Wirkungsweise und seine Einsatzmöglichkeiten sind umfassend beschrieben worden (McCapra, 1977; Adam und Cilento, 1983; Bronstein et al., 1989a; Bronstein und McGrath, 1989b).

Unter Chemilumineszenz versteht man im weitesten Sinne einen Reaktionsablauf, bei dem chemische Energie in Licht umgewandelt wird. Die Energie, die für die Emission von Licht benötigt wird, entsteht bei der Oxidation von spezifischen Substraten (Campell, 1988). AMPPD ist ein direktes Chemilumineszenzsubstrat. In Anwesenheit von alkalischer Phosphatase wird es dephosphoryliert und das entstandene Anion AMP-D zerfällt (Abb.2). Dabei wird Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich emittiert. Die Intensität der Lichtemission ist direkt von der Konzentration der vorhandenen alkalischen Phosphatase abhängig.

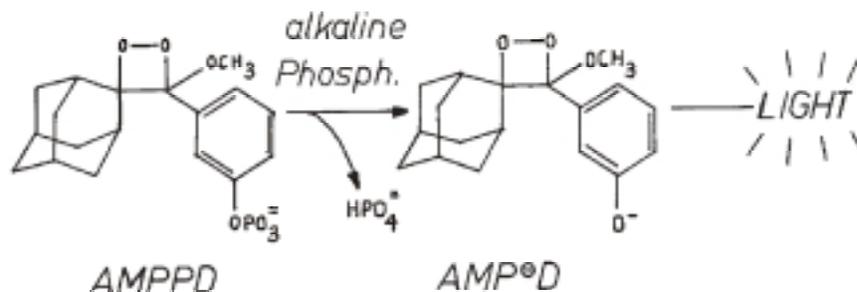


Abb. 2 : Der Zerfall des AMPPDs erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird AMPPD durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Das entstandene Anion zerfällt im zweiten Schritt in Adamantanone und in das angeregte Meta-oxybenzoat-Anion, das Licht emittiert (umgezeichnet nach Bronstein und Mc Grath, 1989b).

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Optimierung eines auf Chemilumineszenz basierenden Verfahrens für den nichtradioaktiven Nachweis hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA.

Hierfür stand mir das Chemilumineszenzsubstrat AMPPD zur Verfügung. Diese Methode sollte dann mit der etablierten Enzym-Immuno-Methode der Firma Boehringer-Mannheim, bezüglich der Sensitivität und der Versuchsdauer verglichen werden.

Als Grundlage für die beiden nichtradioaktiven Nukleinsäurenachweisverfahren verwendete ich humane Cytomegalievirus-DNA und Cytomegalie Plasmid-DNA, pCM 5018.

Es ergaben sich für mich folgende Aufgabenstellungen:

1. Optimierung des nichtradioaktiven DNA-Nachweises mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD nach
 - a) der Expositionszeit
 - b) der einzusetzenden Konzentration und
 - c) der Bedeutung von Lichtverstärkern.

2. Vergleich der beiden DNA-Nachweismethoden, an Hand hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA, bezüglich der Sensitivität und der Versuchsdauer.

3. Direkter, quantitativer Nachweis von Cytomegalieviren in Urinproben an Hand der beiden konkurrierenden Nachweismethoden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien waren, wenn nicht anders vermerkt, von p.A. Qualität.

Agarose (Firma Sigma): Zur Herstellung eines 0,5 % igen Agarosegels werden 1 g Agarose in 180 ml Aqua dest. gelöst (Heizplatte mit Magnetrührer). Der gelösten Agarose wird 20 ml 10-fach konzentrierter TAE-Puffer zugesetzt. Nach dem Abkühlen auf 60⁰C wird der Agaroselösung 20 µl Ethidiumbromidlösung (Stammlösung: 10 mg/ml) zugesetzt und das Gemisch auf die nivilierte Elektrophoresevorrichtung gegossen.

AMPPD (Firma Tropix): 3-(2'-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane, direktes Chemilumineszenzsubstrat.

Chloramphenicol/Leukomycin (Firma Bayer Leverkusen): Zusatz zur YT-Bouillon in einer Endkonzentration von 200 µg/ml.

Chloroform (Firma Merck): In der Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (24:1, v/v) denaturiert das Phenol die Proteine. Der zugesetzte Isoamylalkohol dient der schärferen Phasentrennung und der Reduzierung der Schaumbildung.

CsCl (Firma Serva): Cäsiumchlorid für die Dichtegradienten-Zentrifugation.

Dialysepuffer: 10 mM/l Tris-HCl, 10 mM/l NaCl, 1 mM/l EDTA, pH 7,5 (25⁰C).

EDTA (Firma Serva): Ethylendiamintetraessigsäure.

Ethanol (Firma Merck): Verwendung in der Alkoholpräzipitation, als 70 % Ethanol zum Waschen von DNA-Präzipitaten.

Ethidiumbromid (Firma Serva, reinst): In Aqua dest. gelöst, Stammkonzentration 15 mg/ml für den CsCl-Gradienten, 10 mg/ml für die Gelelektrophorese.

Glucoselösung: 50 mM Glucose (Firma Merck), 25 mM Tris HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA , d.h. 0,9 g Glucose, 2,5 ml 1 M Tris-HCl, 2 ml 0,5 M EDTA für 100 ml Puffer. Diese autoklavierte Lösung musste bei 4⁰C gelagert werden.

Hydroxychinolin (Firma Merck): Verhindert die Oxidation von Phenol und hemmt als Chelatbildner die Nukleasen. In der Phenolextraktion färbt es die Lösung gelblich, so dass die Phasengrenze deutlicher wird.

Inkubationspuffer H (Firma Boehringer-Mannheim): 50 mmol/l Tris-HCl, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l Dithioerythrit, pH 7,5 (bei 37⁰C).

Isopropanol (Firma Merck): Reinst, Verwendung in der Alkoholpräzipitation.

Kaliumacetat-Lösung 5 M (pH 4,8): 29,45 g Kaliumacetat (Firma Merck, reinst)/60 ml Lösung, 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml Aqua dest..

Lysispuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0) und 0,1 % SDS.

Lysozym (Firma Serva): Lysozymbilösung 5 mg/ml, kurz vor Gebrauch zur Gebrauchslösung geben.

MgCl₂ (Firma Merck): 1 M Magnesiumchloridlösung wird zur Ethanolpräzipitation benötigt.

Natriumazetat (Firma Merck): 3 M Natriumazetatlösung (pH 5,7) wird zur Ethanol-fällung benötigt. Der pH-Wert wird mit Eisessig eingestellt.

NaOH/SDS Lösung: 0,2 N NaOH (Firma Merck), 1 % SDS (Firma Serva); 100 ml dieser Lösung setzen sich wie folgt zusammen: 20 ml 1 N NaOH, 10 ml 10 % SDS ad 100 Aqua dest. . Die Lösung immer frisch ansetzen.

Neutraler DNA-Puffer: 10 mM/l Tris-HCl, 10 mM/l NaCl, 0,5 mM/l EDTA, pH 7,5 (25⁰C).

Phenol (Firma Merck): Für die Phenolextraktion werden 10 g Phenol mit 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) und einer Spatelspitze Hydroxychinolin versetzt und bei 60⁰C gelöst.

Probenpuffer: 5 % (w/v) Ficoll, 30 mM/l EDTA, 0,02 % Bromphenolblau, alles in TBE-Puffer gelöst. Aliquots von 1 ml in Eppendorfhütchen abfüllen und bei 4⁰C lagern.

Proteinase K: Stammlösung: 20 mg/ml in H₂O gelöst, bei -20⁰C gelagert, Gebrauchslösung: 200 µg/ml mit Lysispuffer verdünnt, Reaktionstemperatur 37⁰C.

SDS reinst (Firma Serva): Natriumdodecylsulfat, anionisches Detergens, löst Proteinstrukturen auf.

TAE-Puffer: (Tris-Azetat und EDTA) 40 mM/l Tris-Base, 20 mM/l Natriumazetat, 30 mM/l Essigsäure, 2 mM/l EDTA, pH 7,8 (25⁰C).

TBE-Puffer: (Tris-Borat und EDTA) 89 mM/l Tris-Base, 89 mM/l Borsäure, 2 mM/l EDTA, pH 8,0 (25⁰C).

TE-Puffer: 10 mM Tris und 1 mM EDTA, pH 8,0.

Tetracyclin HCl (Firma Serva): Zusatz zur YT-Bouillon in einer Endkonzentration von 20 µg/ml. Die Substanz wird in Aqua dest. gelöst und sterilfiltriert.

Tris-Base (Firma Merck): Trishydroxymethylaminomethan. Zur Herstellung von 1000 ml Tris-HCl-Lösung werden 121,3 g Tris-Base mit ca. 800 ml Aqua dest. versetzt und mit

konzentrierter HCl der gewünschte pH-Wert eingestellt.

YT-Bouillon: 5 g NaCl, 8 g Bactotripton, 5 g Hefeextrakt, (15 g Agar) auf 1 l Aqua dest., autoklavieren.

2.2. Geräte

Alle verwendeten Geräte werden entsprechend ihrem Gebrauch in den verschiedenen Methodenteilen erwähnt und gegebenenfalls genauer erläutert.

2.3. Anreicherung, Isolierung und Reinigung der Cytomegalie Plasmid-DNA

Als Grundlage für die folgenden Versuche verwendete ich Cytomegalie Plasmid-DNA, pCM 5018, die dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene freundlicherweise von Prof. Fleckenstein, Institut für Virologie der Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Plasmid besteht aus dem Vektor pACYC 184 (3,97 kbp) und der ligierten, viralen J-Fragment DNA (10,6 kbp). Die isolierte und markierte J-Fragment DNA ermöglicht durch den Vorgang der Hybridisierung den Nachweis von homologen Sequenzen auf dem humanen Cytomegalie Virusgenom (Rüger et al., 1984).

2.3.1. Anreicherung des Plasmids (pCM 5018)

Das Plasmid bzw. der Vektor pACYC 184 besitzt die Fähigkeit, sich in einer geeigneten Wirtszelle, in diesem Fall das E.coli Bakterium, autonom zu vermehren. Auch nach Ligation der J-Fragment DNA geht diese Eigenschaft nicht verloren. Gleichzeitig besitzt das Plasmid eine Antibiotikaresistenz gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin. Diese Eigenschaft verleiht den E.coli Bakterien die Fähigkeit, sich in tetracyclinhaltigen Nährmedien zu vermehren, im Gegensatz zu nicht plasmidtragenden E.coli Bakterien. Auf diese Weise können sich fast ausschließlich plasmidhaltige E.coli Bakterien vermehren und dadurch zu einem höheren Anteil an Plasmid beitragen.

Die Anreicherung der E.coli Bakterien mit integriertem Plasmid, pCM 5018, erfolgte in YT-Bouillon mit 20 µg/ml Tetracyclinzusatz, in Anlehnung an die Methode von Schleif und Wensink, 1981. Ein größeres Volumen dieser Bouillon wurde mit einer Übernacht-Vorkultur

versetzt und in einem 2 Liter Reaktionsgefäß bei 37⁰C inkubiert. Nach Erreichen der späten logarithmischen Wachstumsphase wurde durch Zugabe von Chloramphenicol bzw. Leukomycin die Proteinsynthese der E.coli Bakterien gestoppt (Winnacker, 1984; Mayr et al., 1989). Dadurch erhöht sich die Anzahl der Plasmide pro Bakterienzelle und deren spätere Ausbeute.

Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei 37⁰C wurde der Vorgang abgebrochen und die Bakteriensuspension der Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA zugeführt. Das genaue Arbeitsprotokoll der Anreicherung der Plasmid-DNA ist dem Anhang 6.2.1. zu entnehmen.

2.3.2. Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA

Nukleinsäuren sind sehr empfindlich gegen Scherkräfte und Verunreinigung z.B. durch Nukleasen. Die Arbeitsschritte, die in irgendeiner Form mit DNA-Material im Zusammenhang standen, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Arbeiten erfolgten mit Einmalhandschuhen, autoklavierten Lösungen, sterilen Glasgeräten und Chemikalien mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“.

Die Isolierung der Plasmid-DNA (pCM 5018) aus den E.coli Bakterien wurde nach der Lysemethode mit alkalischer Lösung (Maniatis et al., 1982) vorgenommen. Das genaue Arbeitsprotokoll ist im Anhang 6.2.2. vermerkt.

Eine Verunreinigung der Plasmidaufarbeitung mit zellulären Bestandteilen kann nach der Lyse nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund mussten weitere Reinigungsschritte vorgenommen werden, um Proteine und zelluläre Nukleinsäuren von der viralen, zirkulären DNA zu trennen.

In der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation, entwickelt von Meselson et al., 1957, ist es möglich, nukleäre Wirtszellkomponenten von den Plasmiden zu trennen. Diese Reinigungsmethode beruht auf der Tatsache, dass die spezifischen Dichten doppelsträngiger Nukleinsäuren in CsCl-Lösung sich direkt proportional zu ihrer Basenzusammensetzung in Prozentgehalt Guanin/Cytosin verhalten (Cooney und Matthews, 1984). Nukleinsäuren unterschiedlicher Basenzusammensetzungen lassen sich somit mittels Ultrazentrifugation trennen. In dem Verfahren der CsCl-Gradientenzentrifugation mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (Radloff et al., 1967) können besonders zirkuläre DNS-Moleküle isoliert werden.

Hierzu versetzte ich 9 ml Plasmid-Aufarbeitungen aus der Lyse mit ca. 8 g CsCl und 0,4 ml Ethidiumbromid (Stammlösung: 15 mg/ml). Durch Zugabe von CsCl konnte ich die genaue Dichte von 1,636 g/cm mit Hilfe des Refraktometers (Firma Zeiss) über den Refraktionsindex von 1,3935 (25⁰C) einstellen. Nach dem Überführen und genauem Austarieren der Proben in den Quick-Seal Zentrifugenröhrchen (Firma Beckman) wurden diese verschlossen und 24 h ins Gleichgewicht zentrifugiert (Firma Beckman, Festwinkelrotor Typ 70, 170.000 g, 22⁰C). Nach Beendigung des Ultrazentrifugenlaufes erschien die entstandene Plasmidbande unter langwelligem UV-Licht (366 nm). Durch Belüften der Zentrifugenröhrchen und seitlichem Einstechen unterhalb der Plasmidbande entnahm ich Fraktionen à 1,5 ml mit einer weitlumigen Kanüle. Aus jeder Fraktion wurden 10 µl auf Filterpapier (Whatman GF/A) getropft, getrocknet, mit Aqua dest. benetzt und abermals unter UV-Licht betrachtet. Diejenigen Fraktionen mit der stärksten Fluoreszenz enthielten große Mengen an pCM 5018-DNA und wurden gesammelt.

Das Gesamtvolumen an Plasmidlösung wurde mit der gleichen Menge in Aqua dest. gesättigtem n-Butanol (n-Buthylalkohol, Firma Merck) solange ausgeschüttelt, bis alles Ethidiumbromid aus der unteren wässrigen DNA-Phase entfernt war.

Durch Dialyse in Dialysepuffer konnten die organischen Lösungsmittelreste in der Plasmidlösung beseitigt werden. Eventuell vorhandene Verunreinigungen mit RNA ließen sich durch eine Inkubation mit Ribonuklease A, DNase frei, (RNase A, Firma Boehringer-Mannheim), entfernen. Die Enzymlösung musste zu diesem Zweck für 10 min bei 70-80⁰C erhitzt werden, um evtl. noch vorhandene DNasen zu zerstören. Der Ansatz aus der RNA-Spaltung wurde der Phenolextraktion unterworfen, um Spaltprodukte und Eiweiße zu extrahieren. Die anschließende Dialyse beseitigte die organischen Lösungsmittelreste.

Als letzter Schritt der Plasmid-DNA Aufarbeitung folgte die DNA-Präzipitation mittels Ethanol. Das durch Ultrazentrifugation (45 min, 40.000 g, 0⁰C) entstandene DNA-Sediment wurde in DNA-Puffer (pH 7,5) aufgenommen, gelöst und bei 4⁰C gelagert.

Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurepräparation verwendete ich das Spektralphotometer der Firma Zeiss (Typ MQ 3). Nukleinsäuren verursachen auf Grund ihres Aufbaus aus heterozyklischen Basen eine starke Absorption im UV-Licht. Im Falle einer sauberen DNA-Präparation liegt das Maximum der Absorption im Wellenlängenbereich von 258-260 nm.

Für die Konzentrationsberechnung der DNA-Präparation wurde somit der Extinktionswert der

Wellenlänge 260 nm verwendet. Gleichzeitig gilt die Beziehung, dass 50µg DNA/ml bei 260 nm die Extinktion 1 besitzen (Felsenfeld und Hirschman, 1965). Über die Dreisatzrechnung konnte die DNA-Konzentration ermittelt werden. Die Schichtdicke der Messküvette, die 1 cm betragen sollte, und die Verdünnungsstufen mussten in der Berechnung mit berücksichtigt werden. Die Berechnung der Extinktionsverhältnisse bei 260 nm und 280 nm gab Aufschluss über eventuelle Proteinverunreinigungen der Probe. War der Faktor 260/280 nm größer als 1,7, konnte die Präparation als weitgehend frei von Verunreinigungen angesehen werden (Mayr et al., 1989).

2.4. Elektrophoretische Isolierung der J-Fragment DNA aus der Cytomegalie Plasmid-DNA

Für den Nachweis von membrangebundener Cytomegalie Plasmid-DNA und humanen Cytomegalieviren mit Hilfe der Hybridisierung benötigte ich isolierte J-Fragment DNA. Diese wurde mit Digoxigenin markiert und als DNA-Sonde in die Hybridisierung eingesetzt.

2.4.1. Spaltung der Cytomegalie Plasmid-DNA mit der Endonuklease Eco R1

Zur Isolierung der J-Fragment DNA aus seinem zirkulären DNA-Verband verwendete ich das Restriktionsenzym Eco R1. Diese Endonuklease erkennt, bindet und schneidet die doppelsträngige DNA an spezifischen Nukleinsäuresequenzen. Durch Spaltung einer Phosphodiesterbindung in jedem Strang entstehen Fragmente mit komplementären, kohäsiven Einzelstrangenden. Die Nukleinsäuresequenzen mit dem 5'Ende sind phosphoryliert, die mit dem 3'Ende hydrolisiert (Stryer, 1985; Winnacker, 1984).

Die Abbildung 3 verdeutlicht den Restriktionsvorgang schematisch.

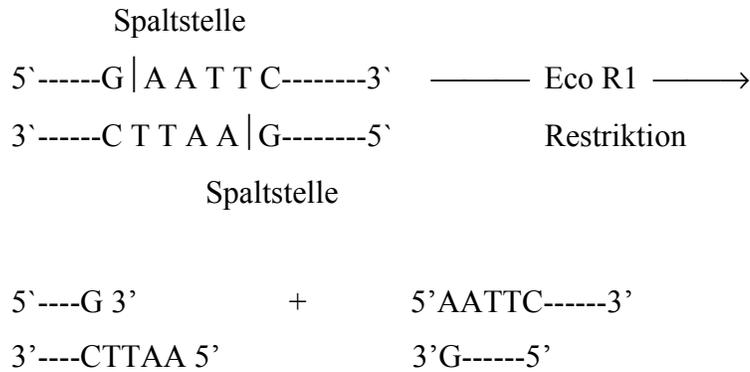


Abb. 3: Basensequenzspezifische Restriktion der Endonuklease Eco R1

Das Plasmid pCM 5018, bestehend aus dem Vektor pACAY 184 und dem J-Fragment, besitzt zwei dieser spezifischen Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym Eco R1, so dass nach der Restriktionsenzyminkubation zwei DNA-Fragmente entstehen.

Zur erfolgreichen Restriktionsspaltung müssen der pH-Wert, die Ionenstärke und die Inkubationstemperatur der Endonuklease optimal angepasst werden (Gingold, 1984).

Die Menge (Einheiten) der einzusetzenden Enzymlösung pro Restriktionsansatz richtet sich nach der Menge der zu spaltenden DNA-Probe. Dabei bezeichnet man die Enzymaktivität als eine Einheit (U), die 1 µg Lambda-DNA bei 37°C in 1 Stunde in einem Gesamtvolumen von 50 µl Inkubationspuffer komplett spaltet.

Um eine sichere Spaltung zu erreichen, verwendete ich immer die doppelte Einheitenmenge Enzym für die Restriktionsansätze.

Beispiel eines Restriktionsansatzes:

142,0 µl Plasmid-DNA	=	155 µg Plasmid-DNA der Konzentration 1090 µl/ml
14,0 µl Puffer H		(10-fach konzentriert)
3,3 µl Eco R1	=	300 U Eco R1 (90 U/µl)
340,0 µl Puffer H		(1-fach konzentriert, pH 7,5)

500,0 µl Gesamtansatz		

Alle Restriktionsansätze wurden 2 Stunden in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach

der Inkubationszeit versetzte ich den Restriktionsansatz mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1. Durch anschließendes Erwärmen des gesamten Ansatzes auf 68⁰C für ca. 15 Minuten wurde die enzymatische Reaktion gestoppt.

2.4.2. Auftrennung der DNA-Fragmente in der horizontalen Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, DNA-Fragmente zu präparativen, als auch zu analytischen Zwecken zu trennen (Southern 1975, 1979; Maniatis et al., 1982). Durch Zugabe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid besteht die Möglichkeit, nach der Elektrophorese die Fluoreszenz der DNA-Farbstoffkomplexe im UV-Licht (Wellenlänge = 254 nm) nachzuweisen (Sharp et al., 1973).

Die präparative Isolierung der J-Fragment DNA von der Vektor-DNA nahm ich an einem horizontalen Elektrophoresegerät GNA-200 der Firma Pharmacia vor.

Durchführung:

Die mit Probenpuffer versetzten und geschnittenen DNA-Fragmente aus dem Restriktionsansatz (siehe 2.4.1.) wurden 15 min bei 68⁰C im Wasserbad erhitzt. Ein schnelles Abkühlen im Eisbad für 2-3 Minuten verhindert ein Wiederaneinanderlagern der komplementären Einzelstränge. Nach kräftigem Durchmischen der Probe wurde diese mit einer Eppendorfpipette luftblasenfrei in die vorgeformte Geltasche (Volumen: 170 x 2 x 4 mm = 1360 µl) pipettiert.

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,5 % iger Agarose in TAE-Puffer gelöst und mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Laufzeit betrug 3 Stunden bei 150 V und Zimmertemperatur. Der TAE-Puffer wurde durch eine Peristaltikpumpe (PLG-Schlauchpumpe, Firma Desaga) umgewälzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die getrennten DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (300-360 nm) dargestellt und die J-Fragment-Bande aus dem Gel herausgeschnitten.

Es existieren verschiedene Verfahren, DNA-Banden aus dem Gel zu isolieren. Die in diesem virologischen Labor angewandte Methode der DNA-Extraktion stellte sich als sehr zeitraubend und quantitativ uneffektiv heraus. Nach Austestung anderer Isolierungsmethoden entschied ich mich für die Elektroelutionsmethode im Dialyseschlauch nach der Vorschrift von Maniatis (1982).

Weitere DNA-Isolierungsprotokolle und deren Effizienz siehe im Anhang unter 6.1.1.

2.4.3. Isolierung der J-Fragment DNA Bande aus dem Gel mit der Elektroelutionsmethode

Die im Gel befindliche DNA-Bande transferierte ich unter Zuhilfenahme eines langen, breiten Spatels in einen ausgekochten, mit 0,2 % TAE-Puffer gefüllten Dialyseschlauch. Der Dialyseschlauch wurde luftblasenfrei verschlossen und waagrecht zur Laufrichtung in die Elektrophoresekammer, gefüllt mit 0,2 % TAE-Puffer, eingebracht. Bei einer Spannung von 300 Volt und 1 Stunde Laufzeit eluierte die J-Fragment DNA aus dem Gel in die Pufferlösung bzw. an die Innenseite des Dialyseschlauches. Durch kurzes Betrachten des Gels mit UV-Licht kontrollierte ich, ob die gesamte DNA aus dem Gel eluiert war. Zweiminütiges Umpolen des Stromes ermöglichte der DNA ein Lösen von der Innenseite des Dialyseschlauches.

Nach vorsichtigem Öffnen des Dialyseschlauches konnte der Puffer rund um das Gel mit einer Kapillare entnommen und aufgefangen werden. Der Dialyseschlauch wurde nochmals mit einer kleinen Menge Puffer versetzt und diese ebenfalls aufgefangen. Kleine Agarosepartikel in dem Eluat konnten abzentrifugiert werden (5 Minuten bei 1.600 g). Durch die anschließende Ethanolpräzipitation konnte die DNA wieder gewonnen werden. Die folgende Aufstellung verdeutlicht die Zusammensetzung der benötigten Reagenzien.

Volumen an DNA-Lösung:

0,10 faches Volumen an 3 M Natriumazetatlösung (pH 5,7)

0,01 faches Volumen an 1 M Magnesiumchloridlösung

2,00 faches Volumen an -20⁰C kaltem Ethanol

Der Präzipitationsansatz musste kräftig geschüttelt und für mindestens 2 Stunden bei -30⁰C gelagert werden. Die gefällte DNA wurde in einer Beckmanzentrifuge mit dem Rotor SW 27 (45 min bei 2⁰C und 40.000 g) zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und das DNA-Pellet getrocknet werden. Im Anschluss löste die DNA in DNA-Puffer (15 Minuten bei Zimmertemperatur, danach für 4 Minuten im 37⁰C warmen Wasserbad).

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten J-Fragment DNA erfolgte mit einem Spektralphotometer (siehe unter 2.3.2.).

2.5. Elektrophoretische Trennung der Cytomegalie Plasmid-DNA für die Versuchsfiler

Für die vergleichenden Nachweismethoden benötigte ich DNA Material, das in unterschiedlichen Konzentrationen auf einem Filter fixiert war und in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand. Ich verwendete die isolierte und gereinigte Cytomegalie Plasmid-DNA (pCM 5018).

Das Plasmid wurde zu diesem Zweck mit dem Restriktionsenzym Eco R1 geschnitten. In den Konzentrationen 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 100 fg wurde es in die Elektrophorese eingesetzt und getrennt. Nach dem modifizierten Blotverfahren nach Southern (1975) konnten die Restriktionsfragmente auf Nylonmembranen transferiert werden.

2.5.1. Restriktionsansatz und elektrophoretische Trennung

1,1 µl Plasmidlösung	= 3 µg pCM 5018 DNA (Ausgangskonzentration = 2660µg/ml)
6,0 µl Eco R1	= 6 U Eco R1 (Stammlösung = 10 U/µl, 1:10 verdünnt = 10 U/10 µl)
7,9 µl Puffer H	

15,0 µl Gesamtvolumen	

Der Restriktionsansatz wurde 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit 15 µl Probenpuffer (1:1) versetzt.

Bei jedem Restriktionsansatz wurden parallel 0,5 ng Lambda-DNA und eine größere Menge an Cytomegalie Plasmid-DNA (0,5 µg) mit Eco R1 geschnitten. Diese Proben dienten als Kontrolle. Die geschnittene Plasmid-DNA verdünnte ich mit Probenpuffer auf die gewünschten Konzentrationen.

Vor dem Auftragen der geschnittenen DNA-Proben in die Geltaschen wurden diese 15 Minuten bei 68°C erhitzt und anschließend 3 Minuten im Eisbad gekühlt. Mit einer Eppendorfpipette konnten die gut geschüttelten Proben luftblasenfrei in die Geltaschen

transferiert werden.

Die elektrophoretische Trennung der Proben erfolgte in 0,5 %igem Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz in TAE-Puffer. Die Laufzeit betrug 1,5 Stunden bei 150 V und fand bei Zimmertemperatur statt.

Die vollständige Spaltung der 0,5 ng Lambda-DNA und der 0,5 µg Cytomegalie Plasmid-DNA mit Eco R1 konnte unter UV-Licht kontrolliert werden. War dies der Fall, konnte ich davon ausgehen, dass auch die Cytomegalie Plasmid-DNA für die Verdünnungsstufen vollständig geschnitten wurde. Gleichzeitig wurde die Laufhöhe der Restriktionsfragmente (J-Fragment DNA mit 10,6 kbp und der Vektor, pACYC 184, mit 3,97 kbp) ausgemessen und dokumentiert.

2.5.2. Blotting der DNA-Fragmente auf Membranen

Das Blotten der DNA nahm ich nach der Methode von Southern (1975) vor. Das Prinzip dieses Blotverfahrens beruht darauf, dass gelelektrophoretisch getrennte DNA-Fragmente in situ denaturiert, auf Membranen transferiert und fixiert werden. Während des Transfers der DNA bleiben die Positionen auf dem Gel erhalten, so dass man auf der Membran ein identisches Replikat des Gels erhält.

Abweichend von der Originalvorschrift verwendete ich keine Nitrocellulosefilter, sondern Nylonfilter/-membran (Biodyne A, Firma Pall). Die Biodyne A - Membran erwies sich aufgrund der geringen Hintergrundsignale und ihrer Strapazierfähigkeit als eine geeignete Membran.

Folgende Lösungen wurden benötigt:

Lösung 1: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Lösung 2: 3 M NaCl, 0,5 M Tris (pH 7,0); autoklaviert

Lösung 3: 20 x SSC: 3,0 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; autoklaviert

Lösung 4: 2 x SSC (20 x SSC, 1:10 verdünnt)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Im UV-Licht wurde das Gel (siehe 2.5.1) auf die zu transferierende Größe zurechtgeschnitten. Anschließend wurde die DNA im Gel durch die Lösung 1 (3-5 fache Menge des Gelvolumens) denaturiert. Das Gel bewegte sich dabei 30 min langsam auf dem Mini-Shaker (Modell Kühner, Firma Braun). Danach neutralisierte die DNA in der gleichen Flüssigkeitsmenge der Lösung 2, ebenfalls 30 min lang. Auf eine Schale, gefüllt mit Lösung 3, wurde eine Glasplatte gelegt. Ein 3 MM Filterpapier (Whatman Chromatographiepapier), getränkt in 20 x SSC, wurde so auf der Glasplatte angeordnet, dass die beiden Enden in die Lösung 2 hineinragten. Das Gel wurde luftblasenfrei auf das Filterpapier angeordnet und wiederum luftblasenfrei mit der Nylonmembran (vorher 30 min in Lösung 4 getränkt) bedeckt. Zwei Filterpapiere, in denselben Ausmaßen wie das Gel und ebenfalls in Lösung 4 getränkt, wurden ohne Lufteinschluss auf die Nylonmembran plaziert. Anschließend wurden Lagen von Papier der gleichen Größe so auf dem Gelturm angeordnet, dass sie nicht mit der Lösung 3 in Berührung kamen. Den Abschluss des Turmes bildete ein Gewicht von 500 g.

Durch diesen Aufbau konnte die Lösung 3 aus der Schale durch das Gel in die Membran diffundieren und dabei die DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Nylonmembran transferieren. 2-3 mal musste der flüssigkeitsgetränkte Papierturm erneuert werden. Das Blotten verlief über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Nylonmembran vom Gel entfernt, wobei die Lage der Geltaschen auf der Membran markiert wurde. 30 Minuten musste die Membran in 2 x SSC gewaschen werden, bevor sie für 2 Stunden bei 80°C fixierte.

Bis zur weiteren Verwendung schweißte ich die Nylonmembranen in einen Gefrierbeutel ein und lagerte sie bei 4°C.

Die Abbildung 4 veranschaulicht den Blottingaufbau.

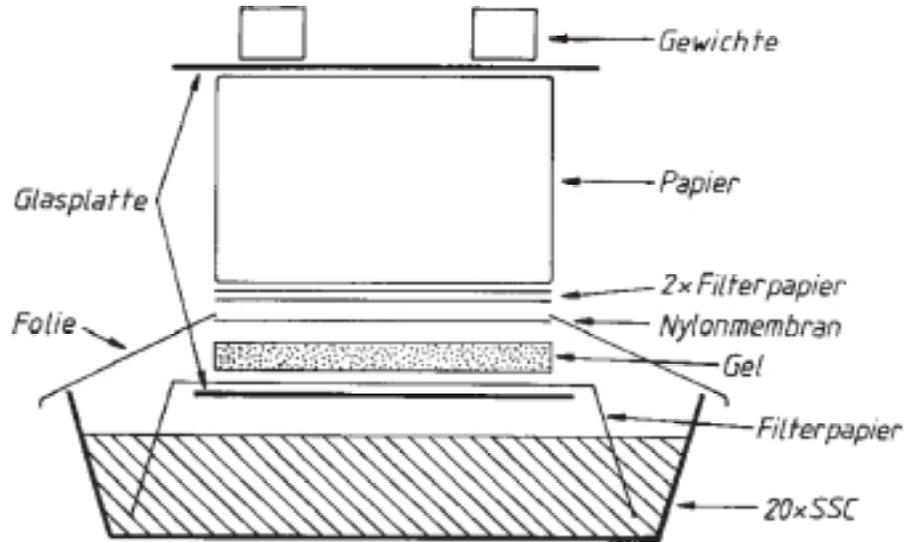


Abb. 4: Schematische Darstellung des Southern-Blot-Transfers, umgezeichnet nach Walker, 1984.

2.6. Dotblotting von Cytomegalie Plasmid-DNA und J-Fragment DNA

Für die Optimierung der nichtradioaktiven Nachweismethode mittels Chemilumineszenz, für andere Vorversuche und als Kontrollen verwendete ich nicht die elektrophoretisch getrennte und geblottete Cytomegalie Plasmid-DNA. Hierfür stellte ich mit Cytomegalie Plasmid-DNA bzw. mit J-Fragment DNA präparierte Nylonmembranen her.

2.6.1. Dotblotting von Cytomegalie Plasmid-DNA

Als Ausgangsmaterial verwendete ich die unter 2.3.2. beschriebene, isolierte und gereinigte Cytomegalie Plasmid-DNA. Die Verdünnungsstufen der linearisierten und denaturierten Cytomegalie Plasmid-DNA von 1 ng-1 fg tropfte ich auf Nylonmembranen (Biodyne B, Firma Pall). Hierzu wurde die DNA mit TE-Puffer auf die verschiedenen Konzentrationsstufen verdünnt und anschließend im Wasserbad hitzedenaturiert. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden dann je 3 µl direkt auf die trockene Nylonmembran pipettiert (Wolf, 1986). Im

Anschluss wurden die Dots an der Luft getrocknet und dann 2 Stunden bei 80°C an die Membran fixiert. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Membranen dunkel und eingeschweißt in Polyethylenbeutel bei 4°C.

2.6.2. Dotblotting von markierter J-Fragment DNA

Ausgangsmaterial war in diesem Fall die unter 2.7. gewonnene Digoxigenin markierte J-Fragment DNA. Ich verfuhr wie unter 2.6.1. beschrieben.

Folgende Verdünnungsreihe soll meine Arbeitsweise beispielhaft verdeutlichen:

Ausgangskonzentration:

$$180 \text{ ng} / 500 \text{ } \mu\text{l J-Fragment DNA} = 100 \text{ ng} / 278 \text{ } \mu\text{l}$$

$$10 \text{ ng} / 27,8 \text{ } \mu\text{l} + 2,2 \text{ } \mu\text{l TE} = 10 \text{ ng} / 30 \text{ } \mu\text{l}$$

$$10 \text{ ng DNA} / 30 \text{ } \mu\text{l} = 1 \text{ ng DNA} / 3 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow 1 : 10 \text{ verdünnt}$$

$$1 \text{ ng DNA} / 30 \text{ } \mu\text{l} = 100 \text{ pg DNA} / 3 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow 1 : 10 \text{ verdünnt}$$

$$100 \text{ pg DNA} / 30 \text{ } \mu\text{l} = 10 \text{ pg DNA} / 3 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow 1 : 10 \text{ verdünnt}$$

$$10 \text{ pg DNA} / 30 \text{ } \mu\text{l} = 1 \text{ pg DNA} / 3 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow 1 : 10 \text{ verdünnt}$$

$$1 \text{ pg DNA} / 30 \text{ } \mu\text{l} = 100 \text{ fg DNA} / 3 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow 1 : 10 \text{ verdünnt}$$

$$100 \text{ fg DNA} / 30 \text{ } \mu\text{l} = 10 \text{ fg DNA} / 3 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow 1 : 10 \text{ verdünnt}$$

$$10 \text{ fg DNA} / 30 \text{ } \mu\text{l} = 1 \text{ fg DNA} / 3 \text{ } \mu\text{l}$$

2.7. Markierung der J-Fragment DNA nach der "random primed" Methode

Für die im Anschluss beschriebenen Hybridisierungsvorgänge benötigte ich Digoxigenin markierte J-Fragment DNA als Sonde. Zu diesem Zweck bediente ich mich der „random primed“ Markierungsmethode, entwickelt von Feinberg und Vogelstein (1983). Ich arbeitete nach der Arbeitsvorschrift der Firma Boehringer. Die zu markierende DNA wurde zunächst linearisiert und denaturiert. Anschließend wurde diese auf enzymatischem Wege unter Zusatz des Klenow Enzyms, einer Mischung von "random"-Hexanukleotiden und einer Mischung einzelner Desoxynukleotide, die unter anderem das Digoxigenin markierte dUTP enthielt, markiert (siehe Abbildung 5).

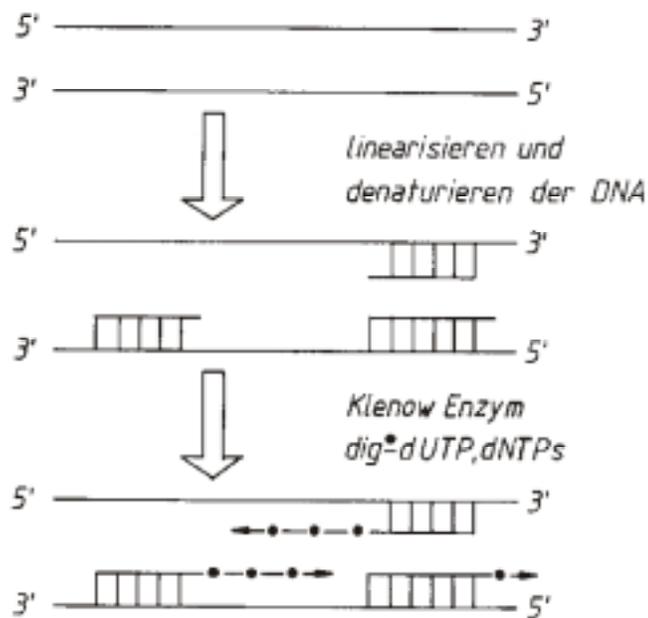


Abb. 5: Schematische Darstellung der DNA-Markierung nach der „random-primed“ Methode. Die linearisierte und denaturierte DNA wird enzymatisch unter Verwendung des Klenow-Enzyms und einem "random" Hexanukleotid-Gemisch, das auch Digoxigenin-markierte Desoxyuridin-Nukleotide (dig-dUTP) enthält, markiert (modifiziert nach Boehringer Mannheim, 1989).

10 ng-3000 ng lineare DNA können pro Standardreaktion markiert werden. Die Inkubationszeit sollte nicht unter einer Stunde liegen. Ich wählte eine Inkubationszeit von 20 h, um höchste Markierungsausbeuten zu erzielen (Boehringer, 1989). Nach dem Stoppen der

Reaktion mit EDTA-Lösung wurde die markierte DNA durch Ethanol präzipitiert und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

Den Gehalt an markierter DNA entnahm ich folgender Tabelle:

Tab. 1: Korrelation zwischen dem Gehalt an zu markierender DNA und der synthetisierten Digoxigenin markierten DNA nach 1 h und 20 h. Die DNA-Konzentration ist in ng angegeben (Boehringer, 1989).

Menge an Template-DNA pro Ansatz in ng	10	30	100	300	1000	3000
Menge an synthetisierter Digoxigenin markierter DNA in ng nach 1 Stunde	15	30	60	120	260	530
nach 20 Stunden	50	120	260	500	780	890

Das genaue Arbeitsprotokoll ist im Anhang unter 6.2.3. zu finden.

2.8. Hybridisierung der filtergebundenen Cytomegalie Plasmid-DNA

Die Nukleinsäurehybridisierung basiert auf dem Bestreben der Nukleinsäure, Doppelstränge auszubilden. Sind komplementäre Sequenzen unter optimalen Bedingungen vorhanden, bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren aus. Sind nun Digoxigenin markierte DNA-Einzelstränge anwesend, können diese die komplementäre DNA renaturieren und dadurch Doppelstränge ausbilden.

Die Hybridisierung von Nukleinsäuren ist von verschiedenen Faktoren bestimmt. Eine große Rolle spielt der Schmelzpunkt (T_m) einer Nukleinsäure, also diejenige Temperatur, bei der die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA aufbricht. Dieser T_m -Wert ist von der Basenpaarzusammensetzung (Stryer, 1985) abhängig. Die gebildeten Hybride können autoradiographisch bzw. durch Immunoassays und anschließender nichtradioaktiver Detektion nachgewiesen werden. Die Prähybridisierung und die Hybridisierung der DNA wurden nach der Vorschrift von Boehringer-Mannheim, 1989 vorgenommen.

Materialien:

20 x SSC:	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0 (20 ⁰ C)
Hybridisierungslösung:	5 x SSC; 0,5 % Blockingreagenz; 0,1 % N-Lauroylsarkosin, Na-salz; 0,02 % SDS (diese Lösung sollte 1 h vor Gebrauch hergestellt werden, da das Blockingreagenz schwer löslich ist)
Waschlösung 1:	2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung 2:	0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

Durch Zugabe von 50 % Formamid zur Hybridisierungslösung konnte die Hybridisierungstemperatur auf 42⁰C gesenkt werden. Formamid als denaturierendes Agenz bewirkt eine Erniedrigung des T_m-Wertes und damit die Möglichkeit, bei geringeren Temperaturen zu hybridisieren. In einem solchen Fall muss die Konzentration an Blockingreagenz auf 5 % erhöht werden.

Durchführung:

Hybridisiert wurden die Filter mit den Cytomegalie Plasmid-DNA Dots (2.6.1.) und die elektrophoretisch getrennten und nach der Southern-Blot-Methode transferierten Cytomegalie Plasmid-DNA (2.5.2.).

Die Flüssigkeitsmengen bezogen sich immer auf eine Filterfläche von 100 cm².

- Die eingeschweißten Filter wurden mit 20 ml Hybridisierungslösung versetzt und 2 h bei 68⁰C (42⁰C bei Zusatz von Formamid) im Schüttelwasserbad prähybridisiert.
- Die Prähybridisierungslösung wurde durch 2,5 ml Hybridisierungslösung, welche frisch denaturierte Digoxigenin markierte J-Fragment DNA enthielt, ersetzt. Die eingesetzte Konzentration an Digoxigenin markierter DNA und die Hybridisierungsdauer beeinflussen den Gehalt an nachzuweisender DNA (Arbeitsanleitung: Boehringer-Mannheim, 1989). Ich wählte eine Konzentration von 30 ng/ml Hybridisierungslösung aus. Die Filter wurden erneut eingeschweißte und 20 Stunden bei 68⁰C bzw. 42⁰C im Schüttelwasserbad inkubiert.
- Anschließend wurden die Filter 2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Waschlösung 1, danach noch 2 x 15 Minuten bei 68⁰C mit Waschlösung 2 gewaschen.
- Die Filter wurden direkt weiterbearbeitet oder bis zur weiteren Verwendung

luftgetrocknet und eingeschweißt bei 4⁰C gelagert.

2.9. Nichtradioaktiver DNA-Nachweis

Die ersten Arbeitsschritte der Nachweisreaktion von Digoxigenin markierter DNA sind bei der kolorimetrischen Methode und bei dem Verfahren mittels Chemilumineszenz gleich.

Zuvor wurden die Filter mit einem Blockingreagenz (Firma Boehringer-Mannheim) behandelt, um die Hintergrundsignale zu unterdrücken. Mit Hilfe der Enzym-Immunoassay-Methode konnten die Digoxigenin markierten DNA-Sequenzen aufgespürt werden. Hierzu wurde das Antikörperkonjugat (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat) benutzt. Nicht an Digoxigenin gebundenes Antikörperkonjugat wurde durch Waschschrirte entfernt. Nach dem Äquilibrieren der Filter in einer alkalischen Lösung konnte mit den unterschiedlichen Nachweisverfahren begonnen werden. Die oben genannten Inkubationsschritte fanden alle bei Zimmertemperatur und unter leichtem Schütteln statt. Das eingesetzte Puffervolumen bezog sich auf eine Filterfläche von 100 cm².

Folgende Lösungen verwendete ich zum DNA-Nachweis:

Puffer 1: Tris-HCl, 100 mmol/l; pH 7,5 (20⁰C)

Puffer 2: Blockingreagenz, 1,0 % (w/v) in Puffer 1 lösen (da das Blockingreagenz schwer löslich ist, sollte es 1 h vor Gebrauch bei 60⁰C hergestellt werden)

Puffer 3: Tris-HCl, 100 mmol/l; NaCl, 100 mmol/l; MgCl, 50 mmol/l; pH 9,5 (20⁰C)

Puffer 4: Tris-HCl, 10 mmol/l; EDTA, 1 mmol/l; pH 8 (20⁰C)

Durchführung:

Die Filter wurden 1 min in Puffer 1 befeuchtet und im Anschluss für 30 min in 100 ml Pufferlösung 2 geblockt. Nach kurzem Spülen der Filter in Puffer 1 wurde 20 ml der Antikörper - Konjugatlösung zugesetzt. Hierzu musste die Stammlösung (750 U/ml) auf 150 mU/ml (1:5000) mit Puffer 1 verdünnt werden, d.h. 0,2 µl auf 1 ml Puffer. Ungebundenes Antikörper-Konjugat konnte durch 2 x 15 min Waschen in 100 ml Puffer 1 entfernt werden. Die Membranen wurden 2 min in 20 ml Puffer 3 äquilibriert.

2.9.1. Kolorimetrischer DNA-Nachweis

Es handelt sich hierbei um eine enzymkatalysierte Farbreaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT). Die am Antikörper-Konjugat gebundene alkalische Phosphatase katalysiert die Umwandlung der farblosen BCIP/NBT Lösung in ein violette Farbpräzipitat. Die Farbreaktion wird bei alkalischem pH-Wert durchgeführt.

Die äquilibrierten Filter wurden in einem geschlossenen Plastikbeutel mit 10 ml frisch angesetzter Farblösung (45 µl NBT-Lösung und 35 µl BCIP-Lösung in 10 ml Puffer 3, pH 9,5) inkubiert. Während der Farbpräzipitation sollte der Filter nicht bewegt werden. Die Farbentwicklung fand im Dunklen statt, da die NBT-Lösung lichtempfindlich ist. Nach Abschluß der Farbpräzipitation wurde die Reaktion durch 5 min Waschen in 50 ml Puffer 4 (pH 8,0) gestoppt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer Polaroid-Kamera. Die noch nassen Filter wurden abgelichtet.

2.9.2. DNA-Nachweis mittels der Chemilumineszenz

Das Chemilumineszenzsubstrat AMPPD wird direkt durch die alkalische Phosphatase der hybridisierten Proben-DNA dephosphoryliert. Das entstandene instabile Anion AMP-D zerfällt und gibt Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich (470 nm) ab (Bronstein und McGrath, 1989b).

Eine schematische Darstellung des Reaktionsablaufes ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

Durchführung:

Die Herstellung der AMPPD-Lösung erfolgte aus der Stammlösung (10 mg/ml, Firma Paesel und Lorei) verdünnt mit Puffer 3. Je nach Versuchsanordnung wurde die Konzentration an AMPPD variiert und eine lichtverstärkende Lösung (Blue- oder Greenamplifier, Firma Paesel und Lorei) zugesetzt. Die äquilibrierten Filter (aus 2.9.) wurden mit der AMPPD-Lösung versetzt und in Polyethylenbeutel luftblasenfrei eingeschweißt.

Zur Detektion der Lichtemission wurden die Filter mit einem Schwarz/Weiß Planfilm (EM-Film, Firma Ilford) abgedeckt und je nach Versuchsanordnung unterschiedlich lang belichtet.

Danach wurden die Planfilme hart entwickelt. Zur Verwendung kamen der Entwickler

Ultrafin-liquid (Firma Tetanal) und ein Fixiersalz der gleichen Firma. Die Entwicklungs- und Fixierungszeiten entnahm ich den Angaben des Herstellers. Zur quantitativen Auswertung der Chemilumineszenzergebnisse wurden die geschwärzten Areale auf dem Planfilm direkt mit Hilfe des Densitometers (Firma Zeiss) gemessen. Die unterschiedliche Intensität der Schwärzungen wurde hierdurch deutlich und als Fläche auf Millimeterpapier übertragen.

Zur Berechnung der Fläche verwendete ich den Flächenintegrator (Digiplan MOP, Firma Kontron) mit dazugehörigem Detektierstift. Mit diesem umfuhr ich dreimal die Konturen jeder entstandenen Fläche bzw. Konzentration und errechnete aus diesen Werten den arithmetischen Mittelwert (angegeben in mm^2) und die sich daraus ergebende Standardabweichung.

2.10. Aufarbeitung von humanen Cytomegalieviren und Urinproben für den direkten Virus-Nachweis

Um die Anwendung der beiden nichtradioaktiven DNA-Nachweisverfahren im diagnostischen Bereich zu demonstrieren, untersuchte ich cytomegalieinfizierte Urinproben.

Um eine quantitative Aussage über den DNA-Gehalt an Cytomegalieviren in dem untersuchten Urin zu treffen, bedurfte es einer Vergleichsreihe an humanen Cytomegalieviren (hCMV). Ich verwendete hierfür das hCMV AD169.

2.10.1. Aufarbeitung von humanen Cytomegalieviren

Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe aus hCMV konnte ich auf eine im virologischen Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene hergestellte Präparation an Cytomegalie-DNA zurückgreifen.

Die Anzucht der hCMV in Zellkulturen (in diesem Fall Fibroblasten), die Extraktion des Virus aus dem Zellmaterial, bis hin zur Ethanolpräzipitation und der anschließenden DNA-Gehaltsmessung waren in Anlehnung an das Arbeitsprotokoll von Reimer (1989) vorgenommen worden. Der DNA-Gehalt an hCMV betrug $124 \mu\text{g/ml}$. Für die Verdünnungsreihe der humanen CMV setzte ich $11,2 \mu\text{g}$ DNA in den Restriktionsansatz mit der Endonuklease Eco R1 ein. Der Anteil an J-Fragment DNA am gesamten hCMV-Genom entspricht $4,5 \%$ (Rüger et al., 1984); somit beinhalten $11,2 \mu\text{g}$ hCMV-DNA ca. $0,5 \mu\text{g}$ J-Fragment DNA. Als positive Kontrolle verwendete ich Cytomegalie Plasmid-DNA, als

negative Kontrolle Fibroblasten-DNA. Ich verfuhr wie unter 2.4.1. beschrieben.

Nach dem Schneiden der hCMV-DNA verdünnte ich diese mit Probenpuffer auf die gewünschten Konzentrationen (von 224 ng hCMV-22,4 fg hCMV). Diese Verdünnungsstufen und die positiven wie negativen Kontrollen aus dem Restriktionsansatz wurden elektrophoretisch getrennt und auf Nylonmembran (Biodyne A) übertragen (siehe dazu 2.5.1. und 2.5.2.). Anschließend wurden die Proben mit 30 ng/ml Digoxigenin markierter J-Fragment DNA hybridisiert und den beiden nichtradioaktiven Nachweisverfahren zugeführt.

2.10.2. Vorbereitung der Urinproben für den Cytomegalie DNA-Nachweis

Als Untersuchungsmaterial standen mir drei Urinproben von zwei verschiedenen Patienten zur Verfügung (Proben 1-3). Beide Patienten waren nachweislich durch eine Infektion mit Cytomegalieviren erkrankt. Eine weitere Urinprobe einer CMV-Antikörper freien Probandin verwendete ich als negative Kontrolle (Probe 4).

Nr.	Material	Volumen	Besonderheiten
1	Urin	1,0 ml	Patient bekam Antibiotika
2	Urinsediment + Medium	1,0 ml	keine Angaben
3	Urin	0,5 ml	Patient bekam Antibiotika
4	Urin	2,0 ml	Keine
5	FH-Zellen	0,5 ml	CMV frei

Probe 2 und 3 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten von demselben Patienten gewonnen.

Alle Urine und die humanen Fibroblasten (FH-Zellen), die als zusätzliche negative Kontrolle verwendet wurden, versetzte ich im Verhältnis 1:1 mit Proteinase K Lösung (200 µg/ml Proteinase K in doppelkonzentriertem Lysispuffer). Die Proben inkubierten 3 Stunden bei 37⁰C im Schüttelwasserbad.

Cytomegalie Plasmid-DNA und hCMV-DNA verwendete ich in je drei verschiedenen Konzentrationen als Positiv-Kontrolle. Für den späteren DNA-Nachweis mussten diese Proben auf Nylonmembranen transferiert werden. Hierfür verwendete ich das Mehrkanalfiltriergerät (Minifold[®] II Gerät) der Firma Schleicher & Schüll. Dieses Gerät ermöglicht den maximalen

Transfer von 96 Proben größerer Volumina (z.B. 200 µl) zur selben Zeit.

Vor der Filtration wurden die DNA-Proben denaturiert. Dazu versetzte ich die vorbereiteten Urinproben und die positiven wie negativen Kontrollen mit dem dreifachen Volumen an 0,5 M NaOH-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Zimmertemperatur wurde jede Probe à 200 µl in jeweils zwei Kanälchen pipettiert und unter einem leichten Vakuum (etwa 50 mbar) auf die Biodyne A Nylonmembran filtrierte. Zur anschließenden Neutralisation der Membran wurde diese aus der Apparatur entnommen und für 10 Minuten auf Filterpapier gelegt, die mit 3 M Natriumacetat-Lösung durchtränkt war. Die Filter wurden getrocknet und 90 Minuten bei 80°C gebacken. Bis zur Hybridisierung mit der Digoxigenin markierter J-Fragment DNA und der anschließenden Detektion lagerten die eingeschweißten Filter bei 4°C.

3. Ergebnisse

3.1. J-Fragmentisolierung aus dem Elektrophoresegel

Die präparative DNA-Isolierung im Anschluss einer Gelelektrophorese kann durch verschiedene Arbeitstechniken vorgenommen werden.

Die im virologischen Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene gebräuchliche Methode der DNA-Isolierung mit Hilfe eines Lysispuffer, beschrieben im Anhang unter 6.1.1., erwies sich als sehr zeitraubend und ineffektiv. Aus diesem Grund suchte ich nach einer in der Handhabung schnelleren und möglichst auch effektiveren Methode.

Folgende DNA-Isolierungsmethoden habe ich verglichen:

1. Elektroelutionsmethode (Maniatis et al., 1982)
2. Elektrophoretisch auf Dialysemembranen (Girvitz, 1980) beschrieben in Maniatis et al., 1982
3. DNA-Isolierung mittels Lyse des Gels

Die unter 1. genannte Methode ist unter 2.4.3. beschrieben. Die Methoden 2. und 3. sind im Anhang unter 6.1.1. erörtert. Die folgende Tabelle informiert über die wichtigsten Ergebnisse.

Tab. 2: Die wichtigsten Ergebnisse der DNA-Isolierungsmethoden aus dem Elektrophoresegel: **1.** Elektroelutionsmethode n = 3,
2. elektrophoretisch auf 3MM/Dialysemembran n = 1,
3. Lysemethode n = 2.

DNA-Isolierungsmethoden	1	2	3
Effizienz in %	32	39	17
Reinheitsgrad E 260 / E 280	1,8	1,6	1,5

Entscheidend für die Beurteilung der Methoden war die Effizienz d.h. der Anteil an isolierter, gereinigter J-Fragment DNA an eingesetzter Cytomegalie Plasmid-DNA und der Reinheitsgrad der Präparationen.

Mit der im virologischen Labor angewandten Methode mittels Lyse des Gels erreichte ich eine durchschnittliche Effizienz von 17 % (n=2). Die Elektroelutionsmethode konnte im Durchschnitt (n=3) 32 % und die elektrophoretische Methode auf eine Dialysemembran sogar 39 % J-Fragment DNA Ausbeute erzielen. Die Berechnung des Extinktionsverhältnisses bei 260 nm und 280 nm gibt Aufschluss über eine eventuelle Proteinverunreinigung der Isolate. Ist das Verhältnis E 260:E 280 größer als 1,8, kann die DNA-Präparation als relativ proteinfrei angesehen werden (Mayr et al., 1989).

Mit Hilfe der Elektroelutionsmethode konnte der geforderte Reinheitsgrad wiederholt erreicht werden. Auch bei späteren J-Fragment DNA Isolierungen wurde bei gleichem Ausgangsmaterial ein Reinheitsgrad von 1,8 erzielt. Die 2.Methode ergab einen Quotient von 1,6, die 3. Methode einen von 1,5 (n=2).

Die Ergebnisse machten deutlich, dass die J-Fragment DNA Isolierung mit Hilfe der Elektroelutionsmethode in meinen Händen das bevorzugte Verfahren darstellte. Die isolierten J-Fragment DNA Konzentrationen überstiegen immer die der Lysemethode und waren im Vergleich zu dieser, durch einen geringeren Zeitaufwand zu erreichen. Auf eine möglichst saubere Aufarbeitung, in Bezug auf Verunreinigungen mit Proteinen, musste besonders geachtet werden, denn die J-Fragment DNA war Ausgangsmaterial für die Sonden-DNA.

Die Elektroelutionsmethode konnte auch diese Anforderung erfüllen, war sogar reiner als die beiden anderen Methoden.

3.2. Optimierung des DNA Nachweises mittels der Chemilumineszenz dargestellt an J-Fragment DNA und Cytomegalie Plasmid-DNA

Die Anwendung des Chemilumineszenzsubstrates AMPPD für den nichtradioaktiven Nachweis membrangebundener DNA (J-Fragment DNA und Cytomegalie Plasmid-DNA) versuchte ich hinsichtlich der Expositionszeit und der einzusetzenden Konzentration an AMPPD zu optimieren.

3.2.1. Nachweis von J-Fragment DNA bei konstanter AMPPD Konzentration und verschiedenen Expositionszeiten

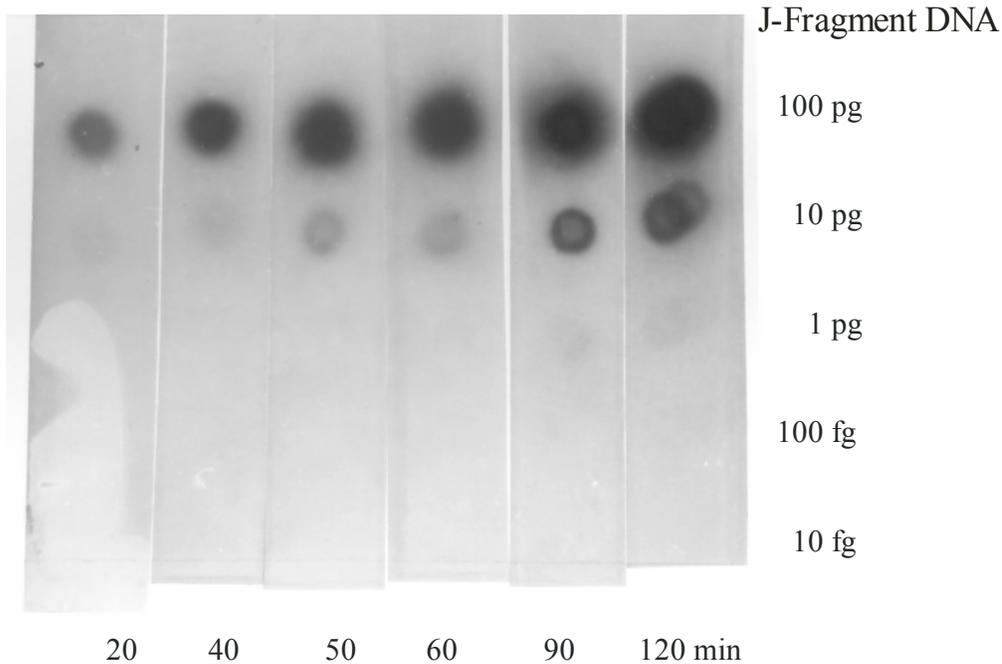


Abb. 6a: Nachweis von Digoxigenin markierter J-Fragment DNA (100 pg - 10 fg) mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD bei konstanter Konzentration (0,5 mM). Die Zeit der Belichtung variierte von 20-120 Minuten.

In der Abb. 6a konnte für die Konzentrationen 100 pg und 10 pg J-Fragment DNA eine deutliche Zunahme der Dichte mit steigender Belichtungszeit beobachtet werden. Bei dem Einsatz von 1 pg J-Fragment DNA wurde nur bei einer Expositionszeit von 90 und 120 Minuten eine schwache Schwärzung des Filmes nachgewiesen. Die DNA-Konzentrationen 100 fg und 10 fg lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Durch die anschließende Dichtemessung der geschwärzten Areale mit Hilfe des Densitometers, dargestellt als Fläche in mm^2 , und die dreimalige Messung jeder Fläche mit dem Detektierstift des Flächenintegrators konnte eine objektive Beurteilung der Schwärzungen vorgenommen werden. Aus den drei Messwerten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Tabelle 3 dokumentiert die gemessenen Werte.

Tab. 3: Die J-Fragment DNA wurde mit konstanter AMPPD- Konzentration (0,5 mM) und unterschiedlichen Expositionszeiten von 20-120 Minuten detektiert. Die quantitative Auswertung der geschwärzten Areale erfolgte densitometrisch, dargestellt als Fläche. Die entstandene Fläche jeder Konzentration wurde dreimal mit dem Flächenintegrator ausgemessen (mm^2) und der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

Expositionszeit in min	J-Fragment DNA		
	100 pg	10 pg	1 pg
20	$574 \pm 15,5$	$46 \pm 5,4$	-
40	$1218 \pm 10,0$	$172 \pm 3,8$	-
50	$1589 \pm 33,4$	$341 \pm 3,2$	-
60	$1686 \pm 20,3$	$317 \pm 10,7$	$24 \pm 1,4$
90	$2185 \pm 36,3$	$666 \pm 16,3$	$97 \pm 7,6$
120	$2221 \pm 17,2$	$1137 \pm 14,4$	$96 \pm 7,4$

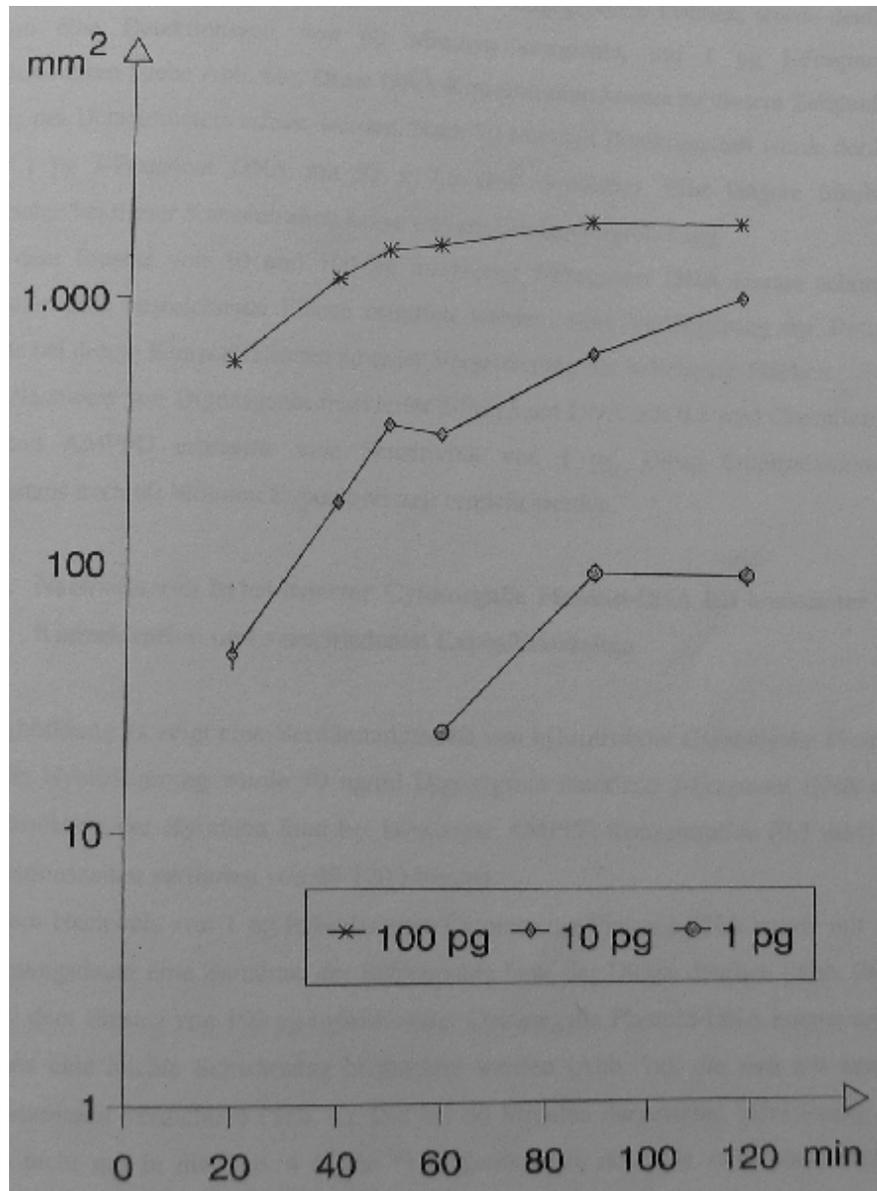


Abb. 6b: Unterschiedliche Konzentrationen an J-Fragment DNA wurden bei gleicher Konzentration an AMPPD (0,5 mM) und verschiedenen Expositionszeiten detektiert (Abb. 6a). Die quantitative Auswertung der belichteten Areale erfolgte densitometrisch (n=3). Die Linien mit unterschiedlichen Konzentrationen an J-Fragment DNA sind folgendermaßen gekennzeichnet: 100 pg -*, 10 pg -◇-, 1 pg -○-.

Bei der grafischen Darstellung, der in Tabelle 3 angegebenen Flächen, wurde deutlich, dass schon eine Detektionszeit von 60 Minuten ausreichte, um 1 pg J-Fragment DNA nachzuweisen (siehe Abb. 6b). Diese DNA-Konzentration konnte zu diesem Zeitpunkt nur mit Hilfe des Densitometers erfasst werden. Nach 90 Minuten Detektionszeit wurde der Nachweis von 1 pg J-Fragment DNA mit $97 \pm 7,6 \text{ mm}^2$ deutlicher. Eine längere Inkubationszeit erbrachte bei dieser Konzentration keine weitere Flächenvergrößerung.

Bei dem Einsatz von 10 und 100 pg markierter J-Fragment DNA konnte schon nach 20 Minuten eine ausreichende Fläche ermittelt werden. Eine Verlängerung der Detektionszeit führte bei diesen Konzentrationen zu einer Vergrößerung der belichteten Flächen.

Der Nachweis von Digoxigenin markierter J-Fragment DNA mit 0,5 mM Chemilumineszenzsubstrat AMPPD erbrachte eine Sensitivität von 1 pg. Diese Empfindlichkeit konnte frühestens nach 60 Minuten Expositionszeit erreicht werden.

3.2.2. Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA bei konstanter AMPPD-Konzentration und verschiedenen Expositionszeiten

Die Abbildung 7a zeigt eine Verdünnungsreihe von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA. Für die Hybridisierung wurde 10 ng/ml Digoxigenin markierte J-Fragment DNA eingesetzt. Die Detektion der Hybriden fand bei konstanter AMPPD-Konzentration (0,5 mM) statt. Die Expositionszeiten variierten von 20-120 Minuten.

Bei dem Nachweis von 1 ng hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA wurde mit steigender Belichtungsdauer eine Zunahme der Schwärzung bzw. der Dichte deutlich (Abb. 7a und Tab. 4). Bei dem Einsatz von 100 pg hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA konnte erst nach 50 Minuten eine leichte Schwärzung beobachtet werden (Abb. 7a), die sich mit zunehmender Inkubationszeit verdichtete (Tab. 4). Die bei 60 Minuten dargestellte Schwärzung (Abb. 7a) wurde nicht mit in die Tab. 4 (siehe *) aufgenommen, denn sie stellt einen Artefakt dar. Darunter werden künstliche Produkte verstanden, die in diesem Fall wahrscheinlich durch eine mechanische Verletzung der Nylonmembran zustande gekommen sind. Mit Hilfe des Densitometers wurde schon bei einer Expositionszeit von 40 Minuten 100 pg hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA nachgewiesen (Tab. 4).

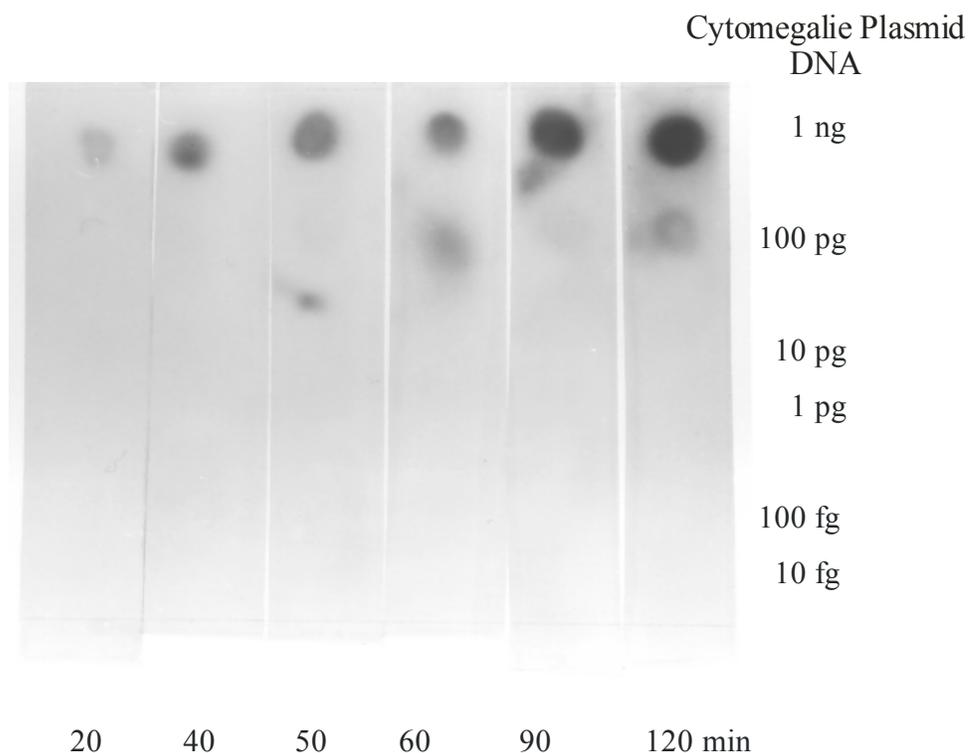


Abb. 7a: Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD bei konstanter Konzentration (0,5 mM). Die Expositionszeiten variierten von 20 min - 120 min.

Tab. 4: Die geschwärzten Areale in der Abb. 7a wurden densitometrisch ausgewertet, der arithmetische Mittelwert (n=3) und die Standardabweichung berechnet (Angaben in mm²).

Expositionszeit in min	pCMV-DNA		
	1 ng	100 pg	10 pg
20	191 ± 8,2	-	-
40	483 ± 15,5	22 ± 1,9	-
50	618 ± 11,4	44 ± 4,9	-
60	608 ± 23,1	*	-
90	1463 ± 12,4	186 ± 9,7	106 ± 6,3
120	1493 ± 9,5	521 ± 16,5	66 ± 2,3

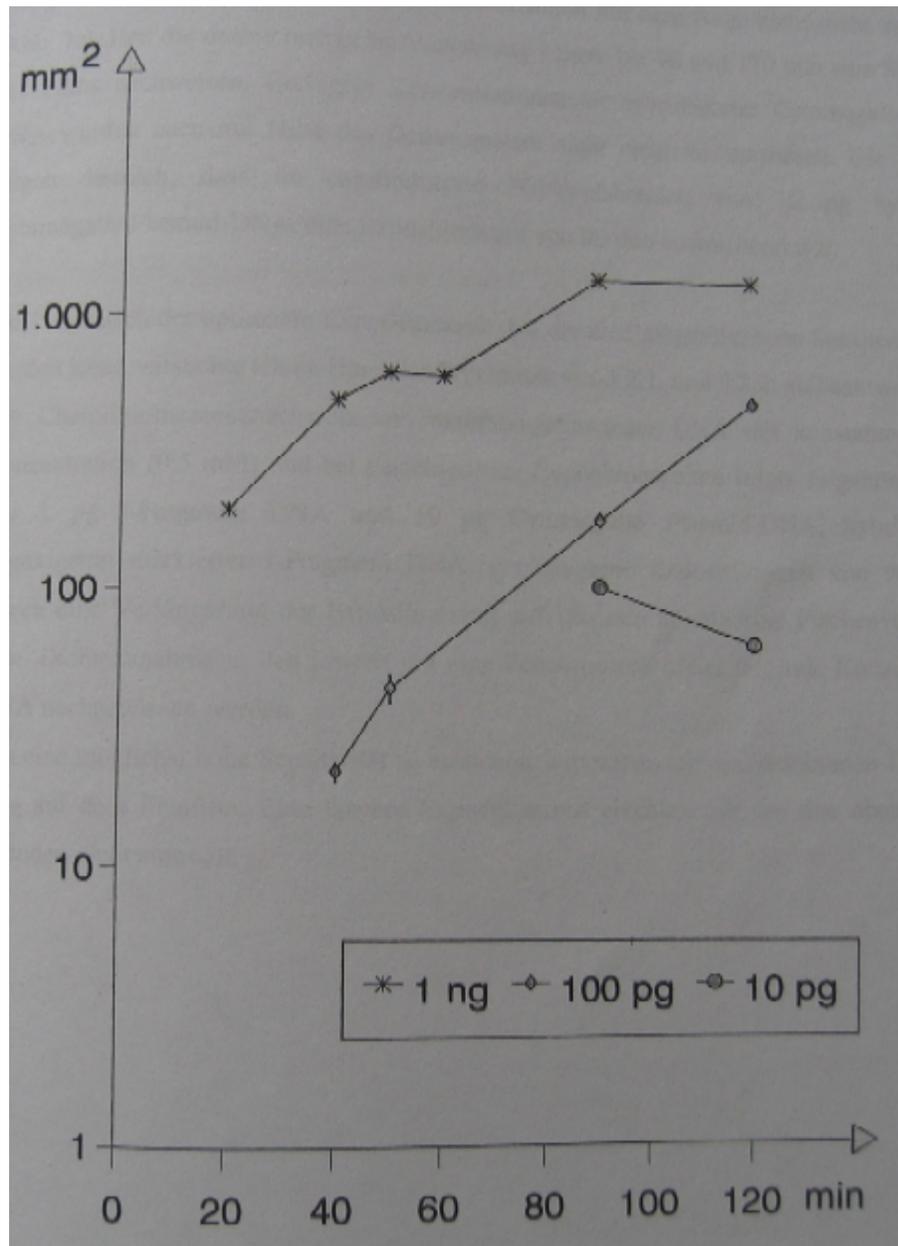


Abb. 7b: Unterschiedliche Konzentrationen an hybridisierter Cytochrome Plasmid-DNA wurden bei gleicher Konzentration an AMPPD (0,5 mM) und verschiedenen Expositionszeiten detektiert (Abb. 7a). Die quantitative Auswertung der belichteten Areale erfolgte densitometrisch. Die Linien geben die Konzentrationen eingesetzter Cytochrome Plasmid-DNA in folgender Weise wieder: 1 ng -*, 100 pg -◇-, 10 pg -○-.

10 pg hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA waren mit dem Auge nicht mehr zu erkennen (Abb. 7a). Erst die densitometrische Auswertung konnte bei 90 und 120 min eine Schwärzung des Films nachweisen. Geringere Konzentrationen an hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA wurden auch mit Hilfe des Densitometers nicht mehr nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass im empfindlichen Nachweisbereich von 10 pg hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA, eine Expositionszeit von 90 min ausreichend war.

Die Frage nach der optimalen Expositionszeit, bei der eine möglichst hohe Sensitivität erreicht werden kann, versuchte ich an Hand der Ergebnisse aus 3.2.1. und 3.2.2. zu beantworten.

Der Chemilumineszenznachweis von membrangebundener DNA mit konstanter AMPPD-Konzentration (0,5 mM) und bei verschiedenen Expositionszeiten zeigte folgendes Ergebnis: Bei 1 pg J-Fragment DNA und 10 pg Cytomegalie Plasmid-DNA, hybridisiert mit Digoxigenin markierter J-Fragment DNA, genügte eine Expositionszeit von 90 Minuten. Durch eine Verlängerung der Expositionszeit auf 120 min konnte eine Flächenvergrößerung bzw. Dichtezunahme in den jeweils um eine Zehnerpotenz höher liegende Konzentration an DNA nachgewiesen werden.

Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, exponierte ich die Membranen 120 Minuten lang auf dem Planfilm. Eine längere Expositionszeit erschien mir aus den oben genannten Gründen nicht sinnvoll.

3.2.3. Nachweis von J-Fragment DNA mit unterschiedlichen AMPPD-Konzentrationen und 2 h Expositionszeit

Um möglichst geringe Mengen Membran gebundener DNA mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD nachzuweisen, versuchte ich nicht nur die Expositionszeit zu optimieren, sondern auch die einzusetzende AMPPD-Konzentration. Zu diesem Zweck verdünnte ich die Stammlösung des Chemilumineszenzsubstrates, die 10 mg/ml AMPPD enthielt, 1:10, 1:30, 1:50, 1:75, 1:100 und 1:150-fach mit dem Puffer 3 (pH 9,5) der Detektionslösung. Die daraus resultierenden Konzentrationen an AMPPD in den einzelnen Verdünnungen betragen 2,4 mM, 0,8 mM, 0,5 mM, 0,3 mM, 0,2 mM und 0,1 mM.

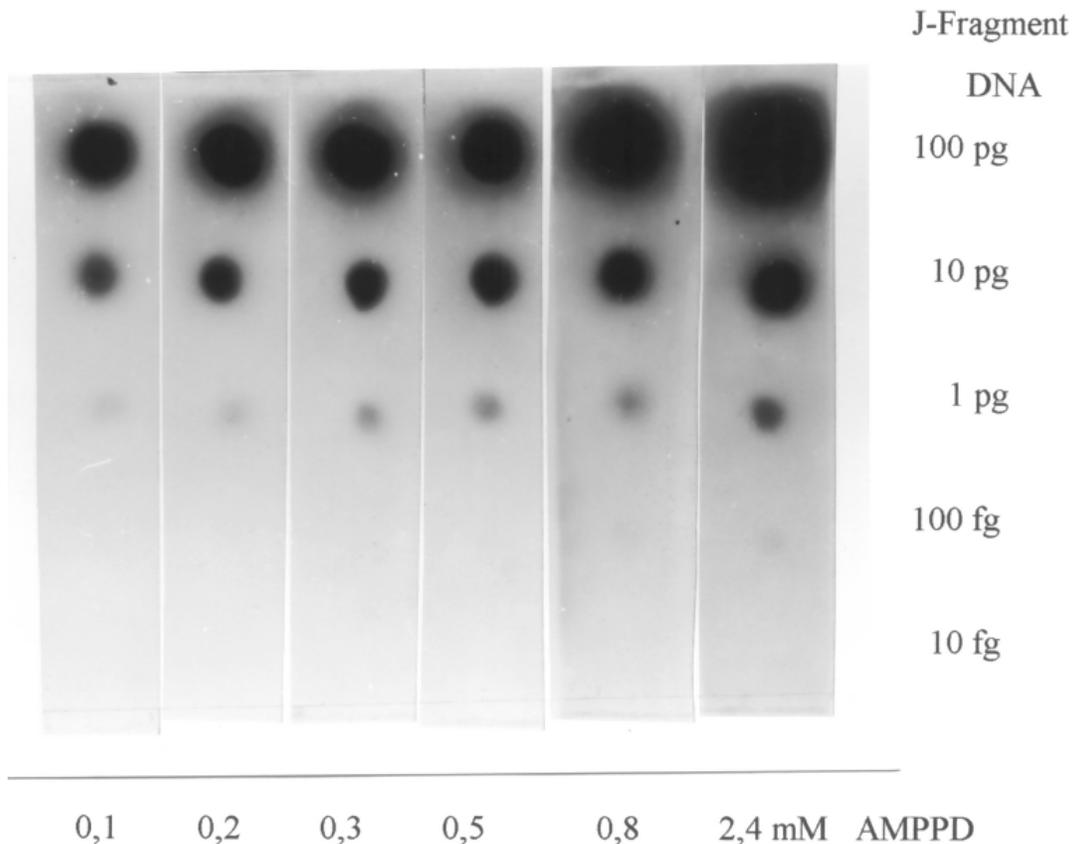


Abb. 8a: Nachweis von Digoxigenin markierter J-Fragment DNA mit unterschiedlichen AMPPD-Konzentrationen (0,1 mM - 2,4 mM) und konstanter Belichtungszeit von 2 Stunden.

Tab. 5: Die geschwärzten Areale der Abb. 8a wurden densitometrisch ausgewertet und daraus der arithmetische Mittelwert (n=3) und die Standardabweichung berechnet. (Angaben in mm²). Die Detektionszeit betrug konstant 2 Stunden. Die eingesetzten Konzentrationen an AMPPD variierte von 0,1 mM bis 2,4 mM.

AMPPD-Konz.	J-Fragment			
	DNA 100 pg	10 pg	1 pg	100 fg
2,4 mM	3247 ± 42,5	1762 ± 22,2	470 ± 23,3	56 ± 2,0
0,8 mM	3151 ± 47,7	1490 ± 15,9	233 ± 4,6	39 ± 1,0
0,5 mM	2532 ± 31,5	952 ± 53,9	190 ± 13,9	17 ± 0,5
0,3 mM	2680 ± 47,6	1147 ± 21,8	168 ± 5,5	-
0,2 mM	2283 ± 36,6	1064 ± 43,1	109 ± 4,4	-
0,1 mM	2076 ± 40,8	831 ± 6,7	84 ± 4,5	-

Die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen an eingesetztem AMPPD-Substrat, bei gleichem J-Fragment DNA Einsatz, zeigte mit steigender Konzentration eine Intensitätszunahme der belichteten Areale. Dies wurde besonders bei der Konzentration 100 pg, 10 pg und 1 pg J-Fragment DNA deutlich.

Zu einer Vergrößerung der geschwärzten Flächen kommt es nur scheinbar, denn die aufgetragenen DNA-Volumina waren immer gleich. Bedingt durch das Volumen an Chemilumineszenzlösung, mit der die Versuchsfilter eingeschweißt waren, entstand ein Abstand zwischen Filter und EM-Film. Durch die divergierende Strahlung des zerfallenen AMPPDs wurde eine größere Fläche auf dem Film belichtet.

Durch den Einsatz von 0,8 und 2,4 mM AMPPD-Substrat war es möglich, 100 fg Membran gebundene J-Fragment DNA nachzuweisen (Abb. 8a). Mit Hilfe des Densitometers gelang es sogar, eine Schwärzung bei 0,5 mM AMPPD zu detektieren (Tab. 5).

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen war keine weitere Sensitivitätssteigerung mehr möglich. Der Einsatz von 10 fg markierter J-Fragment DNA konnte selbst mit 2,4 mM AMPPD-Lösung nicht detektiert werden. Diese Beobachtung bestätigte sich durch die

densitometrische Auswertung (Abb. 8a). Die grafische Darstellung der oben beschriebenen Versuche zeigte für 10 pg und 1 pg J-Fragment DNA eine Zunahme der Flächen mit steigender AMPPD-Konzentration. Bei dem Einsatz von 100 fg J-Fragment DNA wurden erst ab einer AMPPD-Konzentration von 0,5 mM messbare Schwärzungen nachgewiesen.

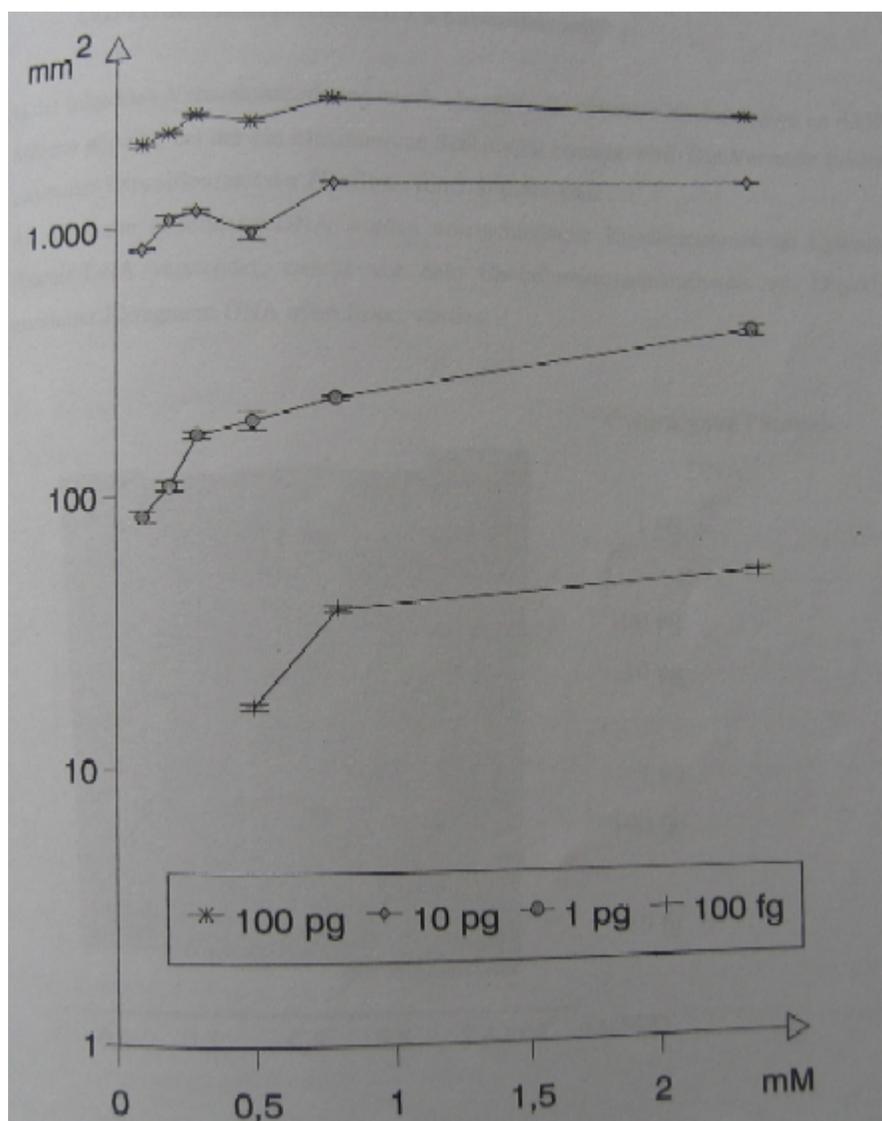


Abb. 8b: Die belichteten Areale aus der Abb. 8a wurden densitometrisch ausgewertet und der Mittelwert ($n = 3$) und die Standardabweichung berechnet (Angaben in mm^2). Der Chemilumineszenznachweis erfolgte mit unterschiedlichen AMPPD-Konzentrationen bei konstanter Belichtungszeit von 2 Stunden. Die Linien repräsentieren die verschiedenen Konzentrationen an markierter J-Fragment-DNA: 100 pg * -, 10 pg $^{-\diamond}$ -, 1 pg $^{-\circ}$ -, 100 fg $^{-+}$ -.

3.2.4. Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA mit unterschiedlichen AMPPD-Konzentrationen und 2 h Expositionszeit

In der folgenden Versuchsanordnung wurde ebenfalls die optimale Konzentration an AMPPD-Substrat gesucht, bei der ein Maximum an Sensitivität erreicht wird. Die Versuche fanden bei konstanter Expositionszeit der Planfilme von 2 Stunden statt.

Als Membran gebundene DNA wurden unterschiedliche Konzentrationen an Cytomegalie Plasmid-DNA verwendet, welche vor dem Chemilumineszenznachweis mit Digoxigenin markierter J-Fragment DNA hybridisiert wurden.

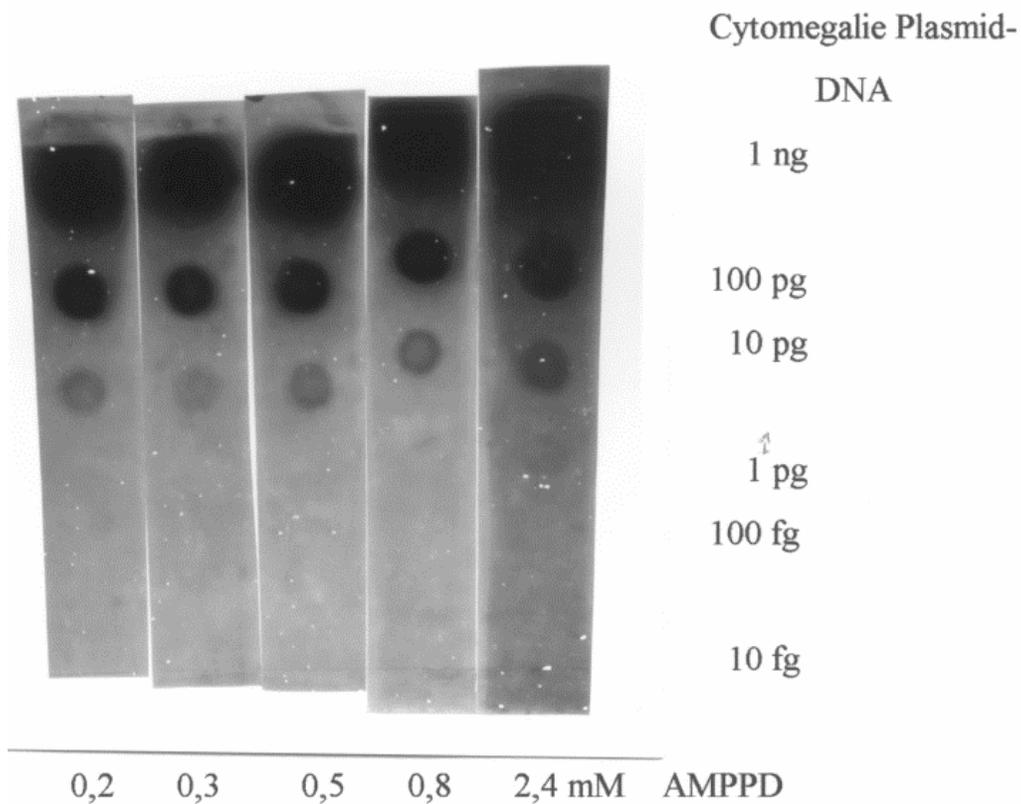


Abb. 9a: Chemilumineszenznachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA mit unterschiedlichen AMPPD-Konzentrationen (0,2 mM-2,4 mM) und gleicher Expositionszeit von 2 Stunden.

Bei dem Einsatz von 1 ng und 100 pg Cytomegalie Plasmid-DNA wurde bei allen AMPPD-Konzentrationen eine deutliche Schwärzung beobachtet. Eine Zunahme der Dichte mit ansteigender AMPPD-Konzentration fand bei 10 pg Cytomegalie Plasmid-DNA statt (Abb. 9a). Um 1 pg pCMV-DNA nachzuweisen, musste 2,4 mM AMPPD-Substrat eingesetzt werden. Niedrigere Konzentrationen an AMPPD ergaben bei dieser Konzentration an DNA keine Schwärzungen auf dem Film. Diese Beobachtung konnte auch durch die Detektion mit Hilfe des Densitometers bestätigt werden (Tab. 6). Unter den angegebenen Versuchsbedingungen waren 100 fg hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA nicht mehr nachzugewiesen.

Tab. 6: Densitometrische Auswertung des Chemilumineszenznachweises der hybridisierten Cytomegalie Plasmid-DNA (Abb. 9a). Berechnung des arithmetischen Mittelwertes ($n = 3$) und der Standardabweichung. Angaben in mm^2 . Die Detektion fand mit unterschiedlichen AMPPD-Konzentrationen (2,4-0,2 mM) und bei einer Expositionszeit von 2 Stunden statt.

AMPPD-Konzentration	pCMV-DNA			
	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg
2,4 mM	>5000	>5000	$560 \pm 8,4$	$73 \pm 1,0$
0,8 mM	>5000	>5000	$423 \pm 12,6$	-
0,5 mM	>5000	$1382 \pm 28,6$	$493 \pm 7,9$	-
0,3 mM	>5000	$1035 \pm 6,8$	$195 \pm 6,7$	-
0,2 mM	>5000	$1042 \pm 28,5$	$377 \pm 5,7$	-

Die grafische Darstellung der oben beschriebenen Ergebnisse verdeutlicht, dass eine hohe Konzentration an AMPPD nötig war, um geringe Mengen an hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA (1 pg) nachzuweisen (Abb.9b).

Die Optimierung des Chemilumineszenznachweises durch den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen an AMPPD ergab folgendes Ergebnis: Zum Nachweis geringer Mengen Membran gebundener DNA (100 fg J-Fragment DNA und 1 pg hybridisierte pCMV DNA) sollten 2,4 mM AMPPD Substrat eingesetzt werden. Geringere Konzentrationen an AMPPD setzten die Sensitivität herab.

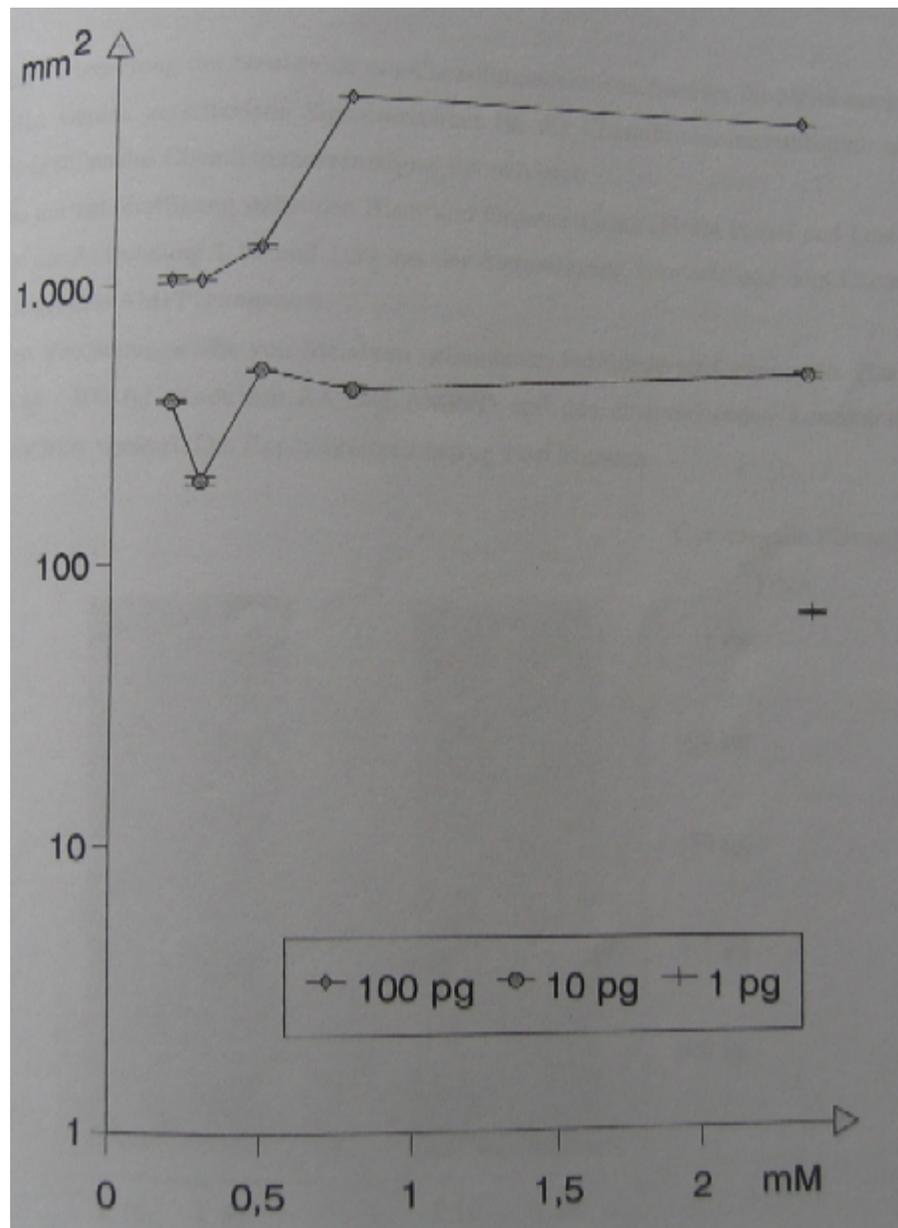


Abb. 9b: Die geschwärzten Areale aus der Abb. 9a wurden mit Hilfe des Densitometers detektiert, der arithmetische Mittelwert ($n=3$) und die Standardabweichung berechnet (Angaben in mm^2). Die dargestellten Linien zeigen die verschiedenen Konzentrationen der hybridisierten Cytomegalie Plasmid-DNA: 100 pg \diamond , 10 pg \circ , 1 pg $+$.

3.2.5. Anwendung von Chemilumineszenzsignalverstärkern

Zur Verbesserung der Sensitivität des Chemilumineszenznachweises für Membran gebundene DNA werden verschiedene Signalverstärker für die Chemilumineszenzsubstrate angeboten. Diese sollen das Chemilumineszenzsignal intensivieren.

Die mir zur Verfügung stehenden Blau- und Grünverstärker (Firma Paesel und Lorei) wurden vor der Anwendung 1:10 und 1:50 aus der Stammlösung verdünnt und dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD zugesetzt.

Eine Verdünnungsreihe von Membran gebundener, hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA (1 ng - 100 fg) wurde mit 2,4 mM AMPPD und den entsprechenden Konzentrationen der Verstärker versetzt. Die Expositionszeit betrug zwei Stunden.

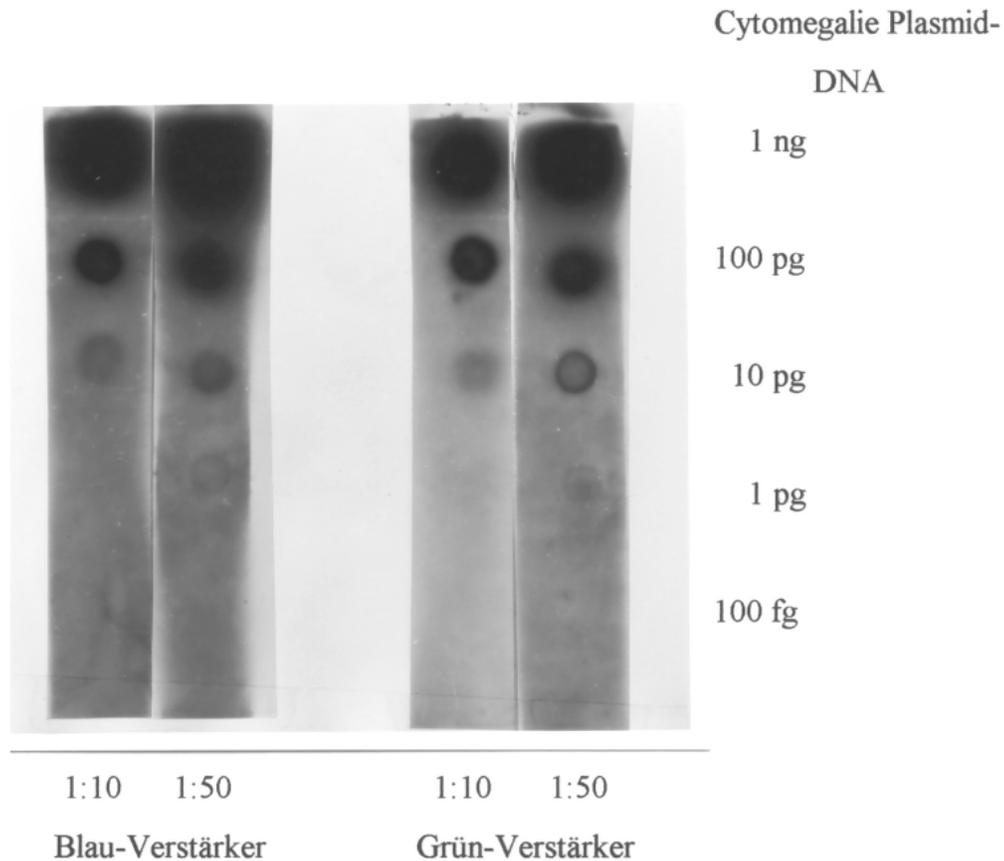


Abb. 10: Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD (2,4 mM) und dem Zusatz von Lichtverstärkern (von links: 1:10 und 1:50 verdünnter Blau-Verstärker, 1:10 und 1:50 verdünnter Grün-Verstärker). Die Expositionszeit betrug 2 Stunden.

Bei der Verwendung des Blau-Verstärkers, 1:50 verdünnt, konnte 1 pg hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA nachgewiesen werden. Der gleiche Verstärker, in höherer Konzentration (1:10 verdünnt) angewandt, detektierte keine DNA in dieser Größenordnung.

Durch den Zusatz des Grünverstärkers (1:50 verdünnt) zum AMPPD war es möglich, ebenfalls 1 pg hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA nachzuweisen. Höhere Konzentrationen (1:10 verdünnt) ergaben keine sichtbaren Schwärzungen.

Bei sonst gleichen DNA Detektionsbedingungen, jedoch ohne den Zusatz eines Signalverstärkers, konnte ebenfalls 1 pg hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA nachgewiesen werden (Abb. 9a). Bei der quantitativen Auswertung ergab sich eine Fläche von $73 \pm 1,0 \text{ mm}^2$.

Unter gleichen Versuchsbedingungen, jedoch mit dem Zusatz des Blauverstärkers (1:50 verdünnt), konnte eine ausgemessene Fläche von $86 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ ermittelt werden.

Bei der densitometrischen Auswertung wurde deutlich, dass der Zusatz von Signalverstärkern keinen entscheidenden Sensitivitätsvorteil bieten konnte.

Tab. 7: Densitometrische Auswertung des Chemilumineszenznachweises von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA (Abb. 10). Berechnung des arithmetischen Mittelwertes (n=3) und der Standardabweichung (Angaben in mm^2). Dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD (2,4 mM) wurden Signalverstärker zugesetzt. Ein Blau- und Grünsignalverstärker, jeweils 1:10 und 1:50 verdünnt, kamen zur Anwendung.

Signalverstärker Verdünnung	pCMV-DNA		
	1 pg	10 pg	100 pg
Blau 1:10	-	$401 \pm 6,8$	$1101 \pm 27,3$
Blau 1:50	$86 \pm 0,4$	$462 \pm 27,3$	>2000
Grün 1:10	$23 \pm 2,4$	$444 \pm 8,3$	$1545 \pm 40,4$
Grün 1:50	$82 \pm 2,0$	$374 \pm 10,3$	$1536 \pm 19,5$
keine Verstärker	$73 \pm 1,0$	$560 \pm 8,4$	>5000

3.3. Vergleich der Chemilumineszenz - und der Enzym-Immuno-Methode dargestellt an elektrophoretisch getrennter Cytomegalie Plasmid-DNA

Nachdem ich das Chemilumineszenzsubstrat AMPPD hinsichtlich seiner einzusetzenden Konzentration und der Expositionszeit optimiert hatte, sollte es mit der etablierten Enzym-Immuno-Methode der Firma Boehringer-Mannheim verglichen werden.

Als nachzuweisende, Membran gebundene Nukleinsäure wurde von mir hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA verwendet. Die pCMV-DNA wurde zuvor zu Konzentrationen von 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 100 fg verdünnt, elektrophoretisch getrennt, auf Nylonmembran transferiert, mit 30 ng/ml markierter J-Fragment DNA hybridisiert und schließlich den beiden Detektionsverfahren zum Vergleich zugeführt.

Die Detektion der Hybride mit dem Chemilumineszenzverfahren erfolgte in 2 Stunden und die Konzentration an eingesetztem AMPPD betrug 2,4 mM.

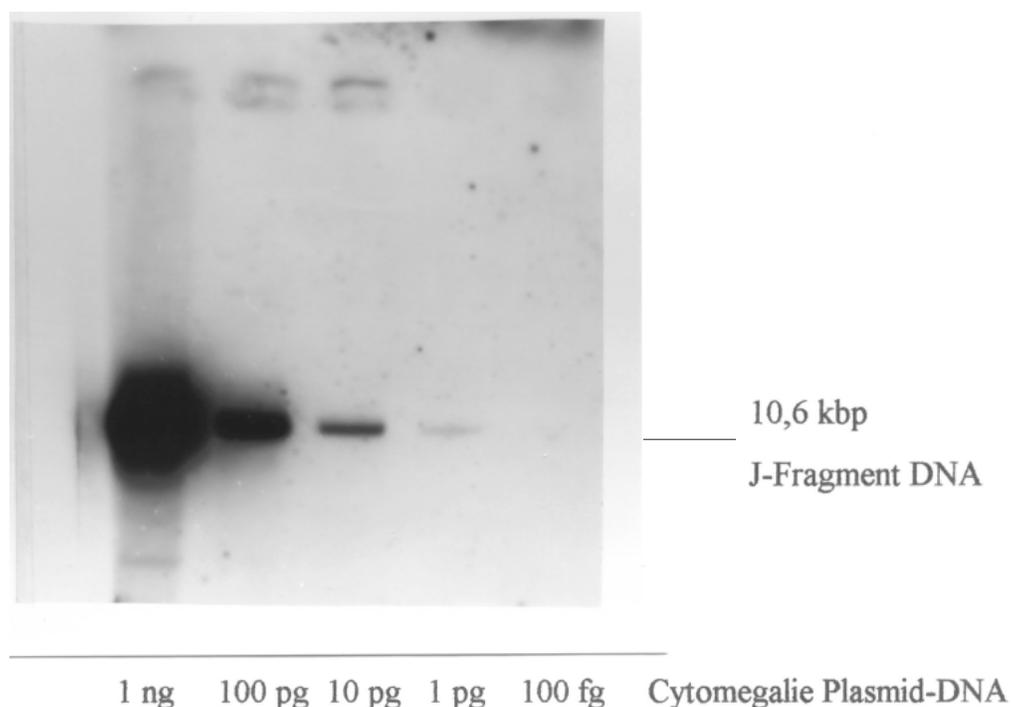


Abb. 11: Chemilumineszenznachweis mit dem AMPPD-Substrat (2,4 mM) von Membran gebundener, elektrophoretisch getrennter und hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA (1ng, 100, 10 und 1pg, 100fg). Die Hybridisierung erfolgte mit 30 ng/ml Digoxigenin markierter J-Fragment DNA. Die Expositionszeit betrug 2 h .

Die in der Abb.11 dargestellten DNA-Banden mit 10,6 kbp entsprechen der J-Fragment DNA, welche mit Digoxigenin markierter Sonden-DNA hybridisiert wurde. Es wird eine proportionale Abnahme des Chemilumineszenzsignales mit geringer werdender Konzentration der Cytomegalie Plasmid-DNA deutlich. Die Nachweisgrenze der optimierten Chemilumineszenzmethode lag bei 1 pg eingesetzter Cytomegalie Plasmid-DNA. Diese Konzentration entspricht $6,2 \times 10^4$ Kopien der Plasmid-DNA.

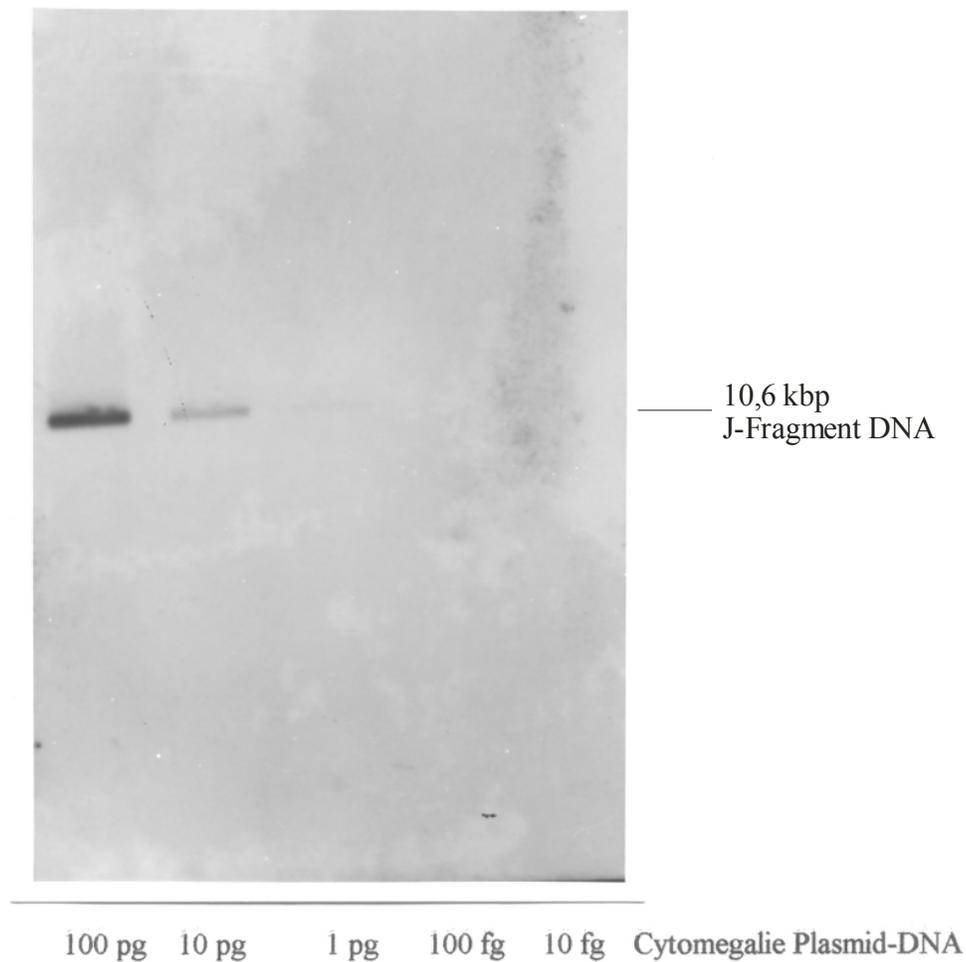


Abb. 12: Elektrophoretisch getrennte und mit 30 ng/ml Digoxigenin markierter J-Fragment DNA hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA (100 pg, 10 pg und 1 pg, 100 fg und 10 fg). Die Detektion erfolgte durch die etablierte Enzym-Immuno-Methode mit den Farbstoffsubstraten BCIP/NBT.

Die vorangegangene Abb. 12 zeigt Cytomegalie Plasmid-DNA, die unter gleichen Bedingungen wie auf Abb. 11, auf Nylonmembran transferiert und hybridisiert wurde. Der DNA-Nachweis erfolgte mit der Enzym-Immuno-Methode durch Zugabe der chromogenen Substrate NBT und BICP und einer anschließenden Farbentwicklung von 18 Stunden. Unter diesen Voraussetzungen konnte ebenfalls 1 pg Cytomegalie Plasmid-DNA nachgewiesen werden. Dies entspricht $6,2 \times 10^4$ Kopien der Ziel-DNA.

Weiteres Bildmaterial über den Vergleich dieser zwei DNA-Nachweismethoden ist im Anhang unter 6.3. dokumentiert.

3.4. Direkter Nachweis von Cytomegalieviren im Urin

Um eine quantitative Aussage über die Cytomegalie-DNA Konzentration im Urin von Cytomegalie infizierten Patienten machen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe von humanen Cytomegalieviren verwendet.

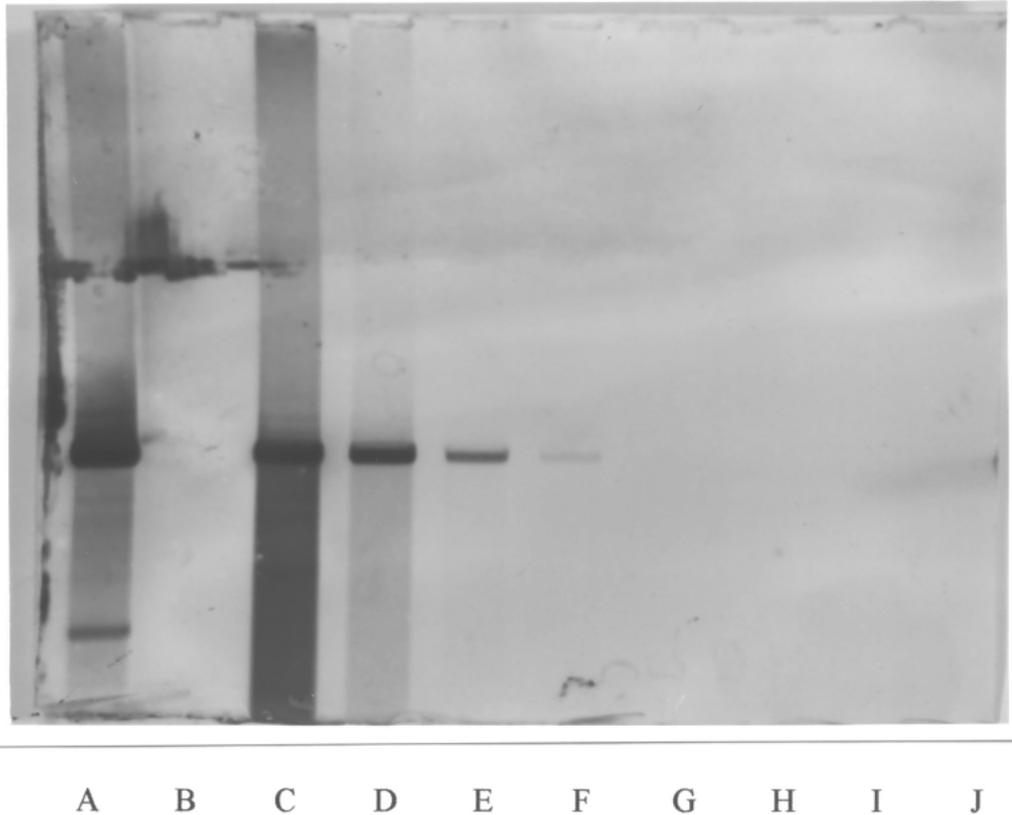


Abb. 13: Detektion elektrophoretisch getrennter, hybridisierter humaner Cytomegalieviren (hCMV AD169), Cytomegalie Plasmid-DNA und humanen Fibroblasten mit der kolorimetrischen Enzym-Immuno-Methode. Die Ziel-DNA wurde nach der elektrophoretischen Trennung auf eine Nylonmembran transferiert und mit 30 ng/ml Digoxigenin markierte J-Fragment DNA-Sonde hybridisiert. Die eingesetzte Konzentration der nachzuweisenden DNA betrug: **A:** 1 ng pCMV DNA; **B:** 1 ng humane Fibroblasten DNA; **C:** 224 ng, **D:** 22,4 ng, **E:** 2,24 ng, **F:** 224 pg, **G:** 22,4 pg, **H:** 2,24 pg, **I:** 224 fg und **J:** 22,4 fg hCMV.

Die Aufarbeitung der humanen Cytomegalievirus DNA und die Herstellung der Verdünnungsstufen für die Proben C-J sind unter 2.10.1. beschrieben. Die pCMV-Probe der Bahn A verwendete ich als positive Kontrolle. Die humanen Fibroblasten auf Bahn B stellten die negative Kontrolle dar.

Die Hybridisierung der humanen Cytomegalieviren (hCMV), einschließlich der positiven und negativen Kontrollen, erfolgte mit 30 ng/ml Digoxigenin markierter J-Fragment DNA. Die DNA-Fragmente wurden mit der Enzym-Immuno-Methode detektiert. Die Abb. 13 zeigt in der Verdünnungsreihe der hCMV-Proben (Bahn C-J) eine kontinuierlich schwächer werdende Bande bei 10,6 kbp. Diese entspricht der J-Fragment-Bande, wie der Vergleich mit der pCMV-Probe auf Bahn A verdeutlicht. Es konnten 224 ng hCMV (Bahn C), 22,4 ng (Bahn D), 2,24 ng (Bahn E) und 224 pg hCMV-DNA (Bahn F) nachgewiesen werden. Die maximale Nachweisgrenze lag bei $8,7 \times 10^5$ Kopien an humanen Cytomegalieviren (= 224 pg hCMV).

Die auf Bahn B aufgetrennten humanen Fibroblasten repräsentieren stellvertretend im Urin vorhandene Zellen. Diese cytomegaliefreie Probe mit ihren Hintergrundsignalen verwendete ich als negative Kontrolle. Die Hintergrundsignale ober- und unterhalb der J-Fragment-Bande, gut sichtbar auf Bahn A, C und D, sind auf zu große Mengen eingesetzter DNA zurückzuführen.

Die folgende Abb. 14 beschreibt die gleiche Versuchsanordnung wie die der Abb. 13. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte jedoch mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD unter optimierten Bedingungen.

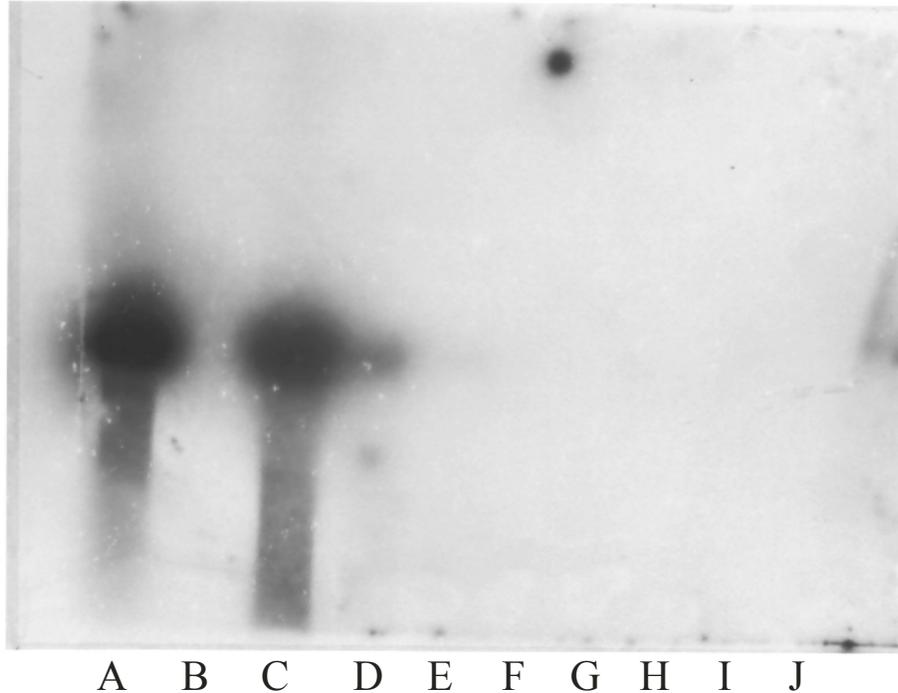


Abb. 14: Detektion der hybridisierten hCMV-DNA, Cytomegalie Plasmid-DNA und humanen Fibroblasten mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD. Die Konzentration an AMPPD betrug 2,4 mM, die Expositionszeit zwei Stunden. Die eingesetzte Konzentration an nachzuweisender DNA betrug unter **A:** 1 ng pCMV DNA; **B:** 1 ng humane Fibroblasten; **C:** 224 ng, **D:** 22,4 ng, **E:** 2,24 ng, **F:** 224 pg, **G:** 22,4 pg, **H:** 2,24 pg, **I:** 224 fg, **J:** 22,4 fg hCMV.

Die maximal nachgewiesene Konzentration an eingesetzter hCMV-DNA liegt bei 2,24 ng. Dies entspricht $8,7 \times 10^6$ Kopien an humanem Cytomegalievirus. Die Übersicht der Abb. 14 ist durch die starken Hintergrundsignale erschwert. Weiteres Bildmaterial liegt im Anhang unter 6.3. vor.

Der direkte Cytomegalievirusnachweis aus Urinproben von infizierten Probanden wurde an Hand der beiden oben genannten Detektionsverfahren vorgenommen. Die Urinproben, sowie die positiven und negativen DNA-Kontrollen wurden, wie unter 2.10. beschrieben, aufgearbeitet, auf Nylonmembran transferiert und hybridisiert.

Nach folgendem Schema wurden die Proben auf die Nylonmembran mit Hilfe des Mehrkanalfiltriergerätes übertragen:

100 pg pCMV DNA	10 pg pCMV DNA	1 pg pCMV DNA
100 pg hCMV DNA	10 pg hCMV DNA	1 pg hCMV DNA
Urinprobe 1 2 ml	Urinprobe 1 1 ml	Fibroblasten DNA
Urinprobe 2 2 ml	Urinprobe 2 1 ml	/
Urinprobe 3 1,5 ml	Urinprobe 3 0,5 ml	/
Urinprobe 4 1 ml	Urinprobe 4 0,5 ml	/

Die folgende Abb. 15 zeigt den Nachweis mit der Enzym-Immuno-Methode.

Die positiven Kontrollen (pCMV und hCMV) wurden deutlich sichtbar und zeigten in den unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen eine Farbintensitätsabstufung.

Die Urinproben 1, 2 und 3 konnten nicht exakt beurteilt werden, denn die aufgetragenen Proben diffundierten in die Umgebung der Auftragsstellen. Eine quantitative Aussage war aus diesem Grund nicht möglich. Die dunkle Verfärbung der Ränder ließ allerdings vermuten, dass Cytomegalievirus DNA in den Urinproben vorhanden war. Eine mögliche Verunreinigung mit Proteinen konnte nicht ausgeschlossen werden.

Die halbierten Urinvolumina der mittleren Spalte zeigten kleinere Kreise um die Auftragsstelle und gleichzeitig eine geringere Verfärbung der Ränder. Dies deutet ebenfalls auf das Vorhandensein von Cytomegalie DNA hin. Die Urinprobe 4, die als negative Kontrolle diente, zeigte erwartungsgemäß keine Verfärbungen an. Anders verhielt sich die Fibroblasten DNA, sie zeigte eine leichte, unspezifische Verfärbung der Bande.

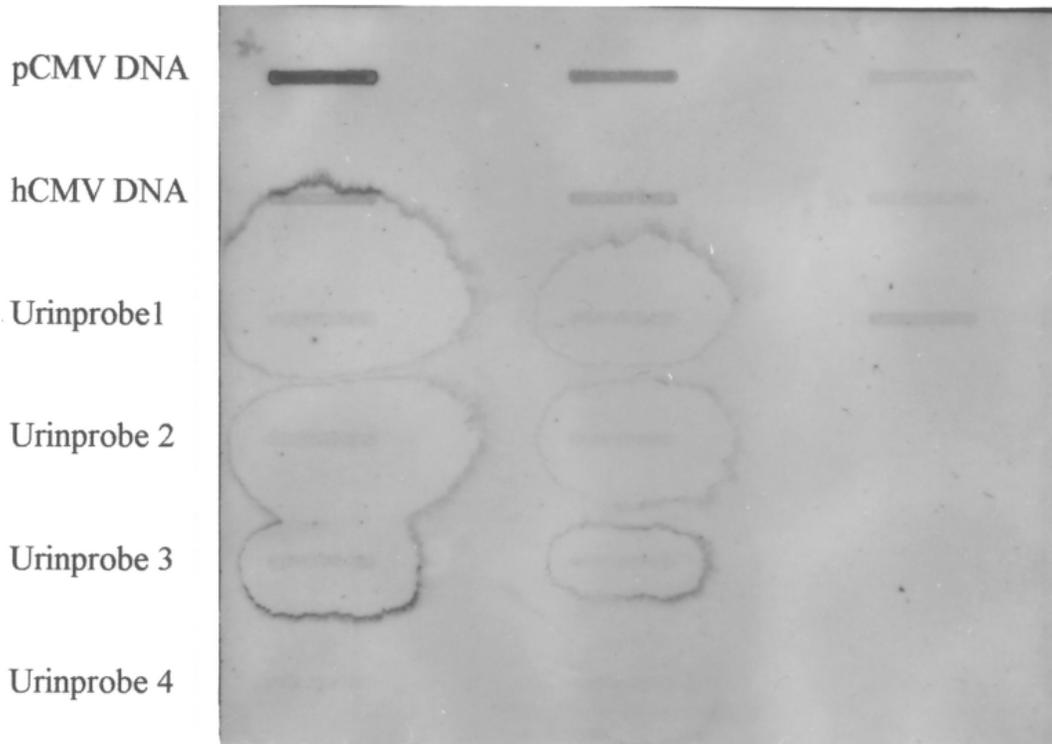


Abb. 15: Nachweis von Cytomegalievirus DNA in Urinproben, pCMV DNA und hCMV DNA. Die Proben sind nach dem oben dargestellten Schema aufgetragen und mit der Enzym-Immuno-Methode detektiert worden.

Die Detektion mit der Chemilumineszenzmethode erbrachte folgende Ergebnisse (Abb. 16). 100 pg pCMV-DNA und 100 pg hCMV-DNA konnten nachgewiesen werden. Der Einsatz von geringeren Konzentrationen DNA lag unterhalb der Nachweisgrenze. Die Urinproben 1 und 3 zeigten in der ersten Spalte kreisförmig angedeutete Schwärzungen des Films, die auf eine Detektion von Cytomegalievirus-DNA zurückzuführen sein könnte. Bei der Urinprobe 2 wurde keine Schwärzung nachgewiesen.

Eine quantitative Aussage über den Gehalt an Cytomegalievirus-DNA konnte aus den gleichen Gründen wie in dem Enzym-Immuno-Nachweis nicht vorgenommen werden. Die negativen Kontrollen, Urinprobe 4 und die Fibroblasten-DNA zeigten keine Schwärzungen.

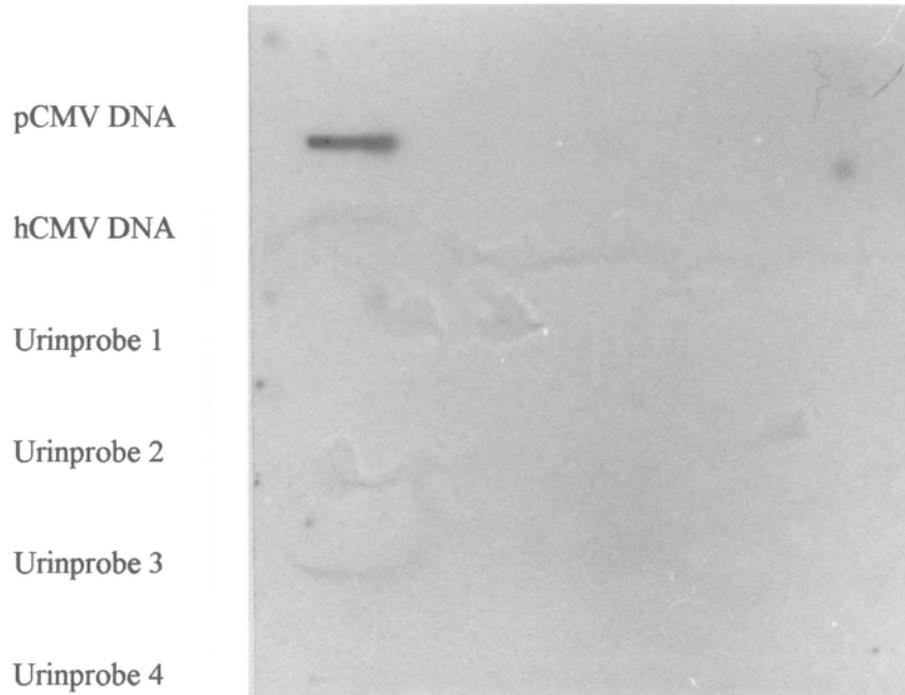


Abb. 16: Nachweis von Cytomegalievirus-DNA in Urinproben, pCMV DNA und hCMV DNA mit der Chemilumineszenzmethode. Die eingesetzte AMPPD-Konzentration betrug 2,4 mM, die Detektionszeit 2 Stunden. Die Anordnung der Proben erfolgte nach dem oben dargestellten Schema.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung eines auf Chemilumineszenz basierenden nichtradioaktiven Nachweisverfahrens für Nukleinsäuren. Als Chemilumineszenzsubstrat verwendete ich AMPPD.

In einem anschließenden Vergleich mit einer etablierten colorimetrischen Enzym-Immuno-Methode sollte geklärt werden, welche der beiden nichtradioaktiven DNA-Nachweismethoden sensitiver ist und in der Handhabung schneller zu einem Ergebnis führt.

Für die Versuche wählte ich markierte J-Fragment DNA, hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA, humane Cytomegalieviren und Urinproben von cytomegalieinfizierten Patienten aus.

4.1. Stand der Forschung

Seit der Einführung des Nukleinsäurenachweises mit Hilfe eines Enzym-Konjugat- Systems (Biotin/Avidin bzw. Streptavidin) durch Langer et al. (1981) hat die Anwendung und die Weiterentwicklung des nichtradioaktiven DNA-Nachweises deutlich zugenommen.

Zwadyk et al. (1986) konnten durch die Hybridisierung mit Biotin markierter Sonden-DNA und der anschließenden Detektion mit Streptavidin plus alkalischer Phosphatase 100 ng gereinigte pBR 322 Plasmid DNA nachweisen. Im direkten Vergleich zur Detektion mit ³²P markierter DNA lag die Sensitivität jedoch um eine 10er Potenz niedriger. Drei Jahre zuvor gelang Leary et al. (1983) der Nachweis von membrangebundener DNA mit biotinylierten DNA-Proben. 1-10 pg DNA konnten mit der nachfolgenden enzymkatalysierten Farbreaktion visualisiert werden. Neumann et al. (1986) detektierte mit der gleichen Methode maximal 5 pg an homologer DNA.

Die Kombination des Enzym-Konjugat-Systems (Biotin/Streptavidin gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) mit einem Chemilumineszenzsubstrat konnte die Sensitivität in den verschiedenen DNA-Nachweisverfahren noch verbessern (Beck et al., 1989; Pollard-Knight et al., 1990; Bronstein et al., 1990). So war es Bronstein et al. 1990 möglich, weniger als 0,5 pg an DNA mit dem Enzym-Konjugat-System, komplettiert mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD, nachzuweisen. Pollard-Knight et al. gelang 1990 der Nachweis von 180 fg Hind III verdauter und elektrophoretisch getrennter Lambda-DNA mit biotinylierter Sonden-DNA und der anschließenden Detektion mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase und dem Chemilumi-

neszenzsubstrat PPD. Die italienische Arbeitsgruppe um Musiani, die ebenfalls das Chemilumineszenzsubstrat AMPPD bzw. PPD favorisiert, verwendete nicht Biotin markierte DNA-Sonden, sondern benutzte Digoxigenin markierte DNA für die Hybridisierungsversuche. Die nachgeschaltete Detektion erfolgte mit den Anti-Digoxigenin Fab Fragmenten, konjugiert mit alkalischer Phosphatase. Musiani konnte unter diesen Bedingungen in einem Dot-blot Hybridisierungsversuch 0,02 pg Parvovirus B19 DNA detektieren (Musiani et al., 1991b). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei den Dot-blot Hybridisierungsversuchen mit der eingesetzten Plasmid-DNA pBR328 und Cytomegalievirus-DNA erreicht (Musiani et al., 1991a).

Der Einsatz von Digoxigenin markierter Sonden DNA zur Hybridisierung, sowie Anti-Digoxigenin Fragment gekoppelt mit alkalischer Phosphatase und dem Zusatz des Chemilumineszenzsubstrates AMPPD bzw. PPD für die Visualisierung der nachzuweisenden DNA wurde in klinischen Proben erfolgreich praktiziert. Dieses Verfahren konnte für den Nachweis von Cytomegalievirus-DNA in Urinproben (Musiani et al., 1992), für in situ Hybridisierung (Musiani et al., 1996; Gentilomi et al., 1997), aber auch für den HIV-DNA Nachweis in Blutproben (Zachar et al., 1991) verwendet werden. Geiger und Caselmann gelang mit dieser Methode 1992 der direkte Nachweis von Hepatitis C Virus RNA durch PCR amplifizierte Fragmente. Auch in aktuellen Verfahren der diagnostischen und quantitativen PCR-Methodik zum Nachweis humaner CMV-DNA in Serum oder Plasma wird das Chemilumineszenzsystem oder die Elektrochemilumineszenz zur Visualisierung verwendet (Boom et al., 1999). Ein nicht zu vernachlässigender Vorteil der Verwendung des Chemilumineszenzverfahrens gegenüber der radioaktiven Detektionsmethoden scheint die Zeitersparnis zu sein (Schmidt et al., 1991). Bei Sequenzanalysen von Nukleinsäuren konnte die Visualisierungszeit noch weiter verringert werden (Beck et al., 1989; Tizard et al., 1990).

4.2. Diskussion der Methode

In beiden nichtradioaktiven DNA-Nachweismethoden wurde die Membran gebundene Cytomegalie Plasmid-DNA mit Digoxigenin markierter J-Fragment DNA hybridisiert. Die Hybride wurden mit dem Anti-Digoxigenin Antikörperkonjugat, welches mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, detektiert und anschließend entweder mit dem AMPPD-Substrat oder mit den chromogenen Substraten, BCIP und NBT, visualisiert.

Die Herstellung der Sonden-DNA für die Hybridisierung kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Ich verwendete für die Herstellung der Digoxigenin markierten J-Fragment DNA die "random-primed" Markierungsmethode nach Feinberg und Vogelstein (1983). Diese Methode erlaubt eine effiziente Markierung von DNA in einer Größenordnung von 10 ng bis 3 µg DNA und weist eine kurze Markierungsdauer von einer Stunde auf. Die hohe Dichte von Digoxigenin-dUTP in dem neu synthetisierten DNA-Strang (ca. jedes 20. bis 25. Nukleotid trägt Digoxigenin) ermöglicht eine sehr hohe Sensitivität im Vergleich zu der Markierungsmethode mittels "nick"-Translation (Rigby et al., 1977). Die "random-primed" Markierungsmethode wird von vielen Autoren wegen dieser hervorragenden Eigenschaften verwendet (Gentilomi et al., 1989; Musiani et al., 1991a; Musiani et al., 1992).

Bei der klassischen Markierungsmethode, der "nick"-Translation, werden durch sehr geringe Mengen an DNAsen kleine Brüche in die doppelsträngige DNA gesetzt. Zugesezte Polymerase 1 erweitert die Brüche vom 5'- Ende zum 3'- Ende und synthetisiert am freien 3'- Ende unter Verwendung von markierten Nukleosidtriphosphaten (z.B. mit Digoxigenin, Biotin oder ³²P) einen neuen DNA-Strang (Wolf et al., 1986).

Ein sehr bedeutsames Verfahren zur Herstellung spezifischer DNA-Sonden stellt die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) dar. Dieses Verfahren nutzt die Fähigkeit der DNA-Polymerase aus, anhand eines DNA-Einzelstranges als Matrize einen komplementären zweiten DNA-Strang zu synthetisieren. Voraussetzung hierfür ist ein kurzer doppelsträngiger Bereich aus Oligonukleotiden, dem sog. Primer, der als Startpunkt der DNA-Synthese dient. Diese Primer umrahmen den zu amplifizierenden DNA-Bereich. Durch mehrfaches Wiederholen (20-30 mal) eines PCR-Zykluses, der Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese beinhaltet, lässt sich eine Vermehrung des spezifischen DNA Abschnittes um ca. das Millionenfache ermöglichen. Durch den Einsatz digoxigeninmarkierter Nukleotide (z.B. Dig-11-dUTP) in den DNA-Synthesevorgang der PCR, kann eine spezifische digoxigeninmarkierte Sonden-DNA hergestellt werden (Lanzillo, 1991; Nevinny-Stickel et al., 1991; Escarceller M. et al., 1992; Stevens et al., 1996).

Eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung für die Sensitivität des DNA-Nachweises, kommt der Auswahl des Markers für die Sonden-DNA zu. Ich verwendete Digoxigenin als Marker.

Digoxigenin markierte DNA-Sonden zeichnen sich beim Nachweis von homologer DNA durch besonders hohe Sensitivität aus, welche sonst nur durch radioaktiv markierte Proben (³²P) erreicht wurde (Kimpton et al., 1989; Azzi et al., 1990). Kimpton und Mitarbeiter (1989)

verglichen die Marker Biotin, ^{32}P und Digoxigenin hinsichtlich ihrer Sensitivität. Sie stellten fest, dass Biotin markierte AD169 CMV-DNA 10-50 pg homologe DNA detektieren konnte. Durch den Einsatz von ^{32}P bzw. Digoxigenin markierte AD169 CMV-DNA war jedoch der Nachweis von 0,1 pg homologer DNA möglich. Meine Ergebnisse bezüglich der Sensitivität stimmen mit denen von Kimpton überein. Bei dem Einsatz von Digoxigenin markierter J-Fragment DNA konnte ich ebenfalls 0,1 pg CMV Plasmid DNA nachweisen.

Bei der Verwendung von Biotin markierter Sonden-DNA berichten einige Autoren über störende Hintergrundsignale (Zwadyk P. et al., 1986; Bronstein et al., 1990), die die Empfindlichkeit des Tests limitieren können. Die Zusammensetzung der verwendeten Membranen spielen dabei eine große Rolle. Besonders bei In-Situ Hybridisierungsversuchen konnten unspezifische Bindungen des Biotin/Avidin Systems an zellulärem Chromatin und endogene Avidinbindungen in Zellkulturen von Leber und Nieren beobachtet werden (Wood und Warnke, 1981; Banarjee und Pettit, 1984). Gentilomi und seine Arbeitsgruppe (1989) favorisierten aus diesem Grund ebenfalls Digoxigenin als Nukleotidmarker für In-Situ Hybridisierungstests.

In der vorliegenden Arbeit verwendete ich für die Detektion hybridisierter Cytomegalie DNA das Anti-Digoxigenin alkalische Phosphatase Konjugat. Dieser Enzymkomplex katalysiert im Anschluss an die Hybridisierung die Farbpräzipitation bzw. den Chemilumineszenznachweis. Der alkalischen Phosphatase kommt als Enzym zwischen der nachzuweisenden DNA und dem Chemilumineszenzsubstrat bzw. den Farbstoffsubstraten eine besondere Bedeutung zu. Es kann jedoch auch direkt an die Sonden-DNA konjugiert sein (Jablonski et al., 1986; Bronstein et al., 1990).

Die Verwendung von "cooled" CCD-Kameras zur Detektion der Lichtsignale, die bei dem Zerfall des AMPPD in Anwesenheit der alkalischen Phosphatase entstehen, soll eine genauere quantitative Aussage über die Chemilumineszenzsignale im Vergleich mit densitometrischen Auswertungen von belichtetem Filmmaterial erbringen (Martin et al., 1994; Karger et al., 1992). Um einem möglichen Sensitivitätsverlust vorzubeugen, wurden alle densitometrischen Messungen dreifach durchgeführt und der arithmetische Mittelwert errechnet. Auch auf Peroxidase basierende Chemilumineszenzsysteme in Kombination mit den "cooled" CCD-Kamera erbringen höchste Sensitivität bei geringer Detektionszeit (Vlieger et al., 1992). Durch eine Kombination von Luminographen mit einem Mikroskop und einem PC können quantitative Auswertungen von In-situ Hybridisierungen erfolgen (Musiani et al., 1996). Zum

Zeitpunkt der Durchführung meiner Versuche standen derartige Kamerasysteme zur Detektion Membran gebundener DNA allerdings nicht zur Verfügung.

4.3. Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.3.1. Expositionszeit von AMPPD

Bei dem Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA und markierter J-Fragment-DNA mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD konnte ich feststellen, dass eine längere Kontaktzeit als zwei Stunden keine weitere Sensitivitätssteigerung mehr erbrachte (3.2.1. und 3.2.2.). Eine längere Expositionszeit verstärkte die Intensität an Hintergrundsignalen, so dass das Erkennen von detektierter DNA erschwert wurde. Lag die Detektionszeit unter zwei Stunden musste ein unerwünschter Sensitivitätsverlust einkalkuliert werden. Eine Kontaktzeit zwischen dem Planfilm und der AMPPD umspülten DNA-Membran von zwei Stunden war optimal. In der Weiterentwicklung der Detektion von Lichtsignalen, hervorgerufen durch dephosphorylierte Chemilumineszenzsubstrate, konnten in sog. "low intensity light imaging" Luminographen, Signale nach 45 minütiger Inkubationszeit reproduzierbar gemessen werden (Girotti et al., 1995).

Die Hintergrundsignale wurden wahrscheinlich durch unspezifische Bindungen von alkalischer Phosphatase an den Membranen hervorgerufen. Auch andere Autoren (Bronstein et al., 1989; Musiani et al., 1991) berichten über unspezifische Bindungen auf den Membranen, die die Nachweisgrenze von DNA limitieren. Durch den Einsatz von verschiedenen Blockungsmitteln können die unspezifischen Hintergrundsignale erheblich reduziert werden. Bronstein et al. (1989) setzten 0,5 % BSA während der Hybridisierung und nochmals 0,1% BSA in die AMPPD-Lösung ein. Ich verwendete 50 µl/ml Lachs-DNA bei dem Detektionsvorgang und ein sog. "Blocking"-Reagenz der Firma Boehringer bei den Hybridisierungsvorgängen.

Die Verwendung von Nylonmembranen gegenüber Nitrocellulosemembranen für die Detektion mittels Chemilumineszenz hat sich aus Sensitivitätsgründen bewährt (Höltke et al., 1992; Dubitsky et al., 1992). Deshalb verwendete ich für meine Analysen ebenfalls Nylonmembranen.

4.3.2. Konzentration des Chemilumineszenzsubstrates AMPPD

Der Einsatz von AMPPD zum Nachweis der alkalischen Phosphatase sollte laut Vertreiber 0,4 mM AMPPD betragen. Für membrangebundene alkalische Phosphatase genügen 0,2 mM AMPPD.

Bei der Optimierung der Chemilumineszenzmethode für die Detektion von Membran gebundener DNA konnte ich feststellen, dass 2,4 mM AMPPD die höchste Empfindlichkeit erbrachten. Durch diese Konzentration an eingesetztem Chemilumineszenzsubstrat war es möglich, 100 fg Digoxigenin markierte J-Fragment DNA bzw. 1 pg hybridisierte Cytomegalie Plasmid-DNA zu detektieren. Eine zum gleichen Zeitpunkt veröffentlichte Studie verwendete 1,6 mM AMPPD zum Nachweis von Hepatitis B Virus DNA (Bronstein et al., 1989). Tendenziell ist eine Reduktion der einzusetzenden Konzentration an Chemilumineszenzsubstrat zu verzeichnen. Ein wesentlicher Grund hierfür könnte in der Weiterentwicklung der Detektion des Chemilumineszenzsignals zu sehen sein.

Zur weiteren Optimierung des Chemilumineszenznachweises testete ich die Signalverstärker für das Chemilumineszenzsubstrat AMPPD. Weder der Grün-, noch der Blauverstärker konnten im Vergleich zu der alleinigen Verwendung von AMPPD einen Sensitivitätsvorteil erbringen. Einen Nachteil bei der Verwendung von Signalverstärkern zum AMPPD bestand jedoch nicht. Andere Hersteller von Chemilumineszenzsubstraten kombinieren das Chemilumineszenzsubstrat festgebunden mit einem Fluoreszenzverstärker (Lumi-Phos 530 der Firma LumiGen).

4.3.3. Vergleich der Chemilumineszenzmethode mit der Farbstoffmethode

Die hohe Sensitivität und die unproblematische Anwendung von AMPPD mit dem Enzym-Konjugat-System, Anti-Digoxigenin alkalische Phosphatase, machen die Chemilumineszenz Methode zu einem etablierten Nukleinsäurenachweisverfahren.

Verwendung findet diese nichtradioaktive DNA-Nachweismethode in vielen Bereichen der Molekularbiologie. Pollard-Knight et al. (1990) nutzten sie zum DNA-Nachweis in Southern Blots, andere Autoren zur DNA Sequenzanalyse (Tizard et al., 1990). Wiederum andere Autoren berichten über den DNA-Nachweis in Dot-Blots (Bronstein et al., 1989; Musiani et

al., 1991; Musiani et al., 1992; Girotti et al., 1995) und in der In-situ Hybridisierung (DeLong et al., 1989; Musiani et al., 1996). Für den Nachweis von Proteinen wurde diese Methode ebenfalls erfolgreich eingesetzt und favorisiert (Bronstein et al., 1989).

Nach meinen Ergebnissen konnte die Sensitivität für den Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA durch das Chemilumineszenzsubstrat AMPPD nicht wesentlich verbessert werden.

Mit der von mir optimierten Chemilumineszenzmethode war es möglich, 1 pg der elektrophoretisch getrennten und hybridisierten Cytomegalie Plasmid-DNA nachzuweisen. Diese Konzentration entsprach $6,2 \times 10^4$ Kopien der Cytomegalie DNA. Im Vergleich dazu konnten mit der etablierten, colorimetrischen Enzym-Immuno-Methode ebenfalls $6,2 \times 10^4$ Kopien auf gleiche Weise getrennte Cytomegalie Plasmid-DNA detektiert werden.

Der Nachweis von elektrophoretisch getrennten und hybridisierten humanen Cytomegalieviren (hCMV AD 169) mit der optimierten Chemilumineszenzmethode war bis maximal 2,24 ng möglich, dies entspricht $8,7 \times 10^6$ Kopien an hCMV. Mit der etablierten colorimetrischen Enzym-Immuno-Methode konnte 224 pg humane CMV-DNA detektiert werden, dass entspricht $8,7 \times 10^5$ Kopien an hCMV.

Allerdings ist hervorzuheben, dass die Chemilumineszenzmethode dieses Ergebnis schon nach zwei Stunden Detektionszeit erzielte, hingegen die Farbstoff-Methode dies erst nach 18 Stunden erreichen konnte.

Meine Ergebnisse waren bezüglich der Sensitivität des DNA-Nachweises mit denen zur gleichen Zeit veröffentlichten Ergebnissen anderer Autoren durchaus vergleichbar. Bronstein et al. (1990) konnten 3 pg elektrophoretisch getrennte und hybridisierte pBR322 DNA mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD nachweisen. Dies entsprach 6×10^6 Kopien an Ziel-DNA. In weiteren Versuchen gelang ihnen der Nachweis von 0,38 pg pBR322 DNA. Diese Konzentration korrespondierte mit $7,9 \times 10^4$ Kopien an Plasmid DNA. Die Ergebnisse konnten durch eine Detektionszeit von nur einer Stunde erzielt werden.

Bereits ein Jahr zuvor war es derselben Arbeitsgruppe möglich gewesen, die Sensitivität für Hybridisierungsversuche und der anschließenden Detektion mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD, um zwei Zehnerpotenzen zu verbessern (Bronstein et al., 1989). Mit dieser Chemilumineszenzmethode konnten innerhalb von zwei Stunden $4,39 \times 10^4$ Kopien an HBVc Plasmid DNA detektiert werden. (Bronstein et al., 1989). Diese Sensitivität wurde mit der parallel laufenden farbstoffgekoppelten Enzym-Immuno-Methode zu keiner Zeit erreicht.

Der Einsatz neuer Chemilumineszenzsubstrate (PPD, PPD-Plus und CSPD) und die Detektion der Lichtsignale durch sensitive Luminometer erlaubt mittlerweile den Nachweis von 10 fg homologe Virus DNA (Girotti et al., 1995).

Die mit der Chemilumineszenzmethode erreichte Zeitersparnis gegenüber der Farbstoffmethode wird von vielen Autoren bestätigt (Bronstein et al., 1990; Martin et al., 1990; Hölzke et al., 1992). Um höchste Sensitivität mit der Farbstoffmethode zu erreichen, benötigt man mindestens 16 Stunden (Hölzke et al., 1992). Noch deutlicher wird die Zeitersparnis mit der Chemilumineszenzmethode im Vergleich zur radioaktiv markierten Nachweismethode (Tizard et al., 1990).

4.3.4. Nachweis von humanen Cytomegalieviren in Urinproben

Der direkte Cytomegalievirusnachweis aus Urinproben von infizierten Probanden erfolgte durch die beiden nicht-radioaktiven Detektionsverfahren. Um eine quantitative Aussage über den Gehalt an hCMV in Urinproben zu erlangen, wurden verschiedene Konzentrationen von Plasmid-CMV DNA und hCMV-DNA als Kontrollen eingesetzt. In der ausgewählten Versuchsanordnung mit einem Mehrkanalfiltriergerät konnte keine quantitative Aussage über die Anwesenheit von CMV-DNA in den Urinproben gemacht werden. Als Ursache hierfür kommen entweder Verunreinigungen oder ein zu großes Probenvolumen in Betracht.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Optimierung eines auf Chemilumineszenz basierenden nicht radioaktiven DNA-Nachweisverfahrens und der Vergleich mit einer etablierten kolorimetrischen Enzym-Immuno-Methode. Die Gegenüberstellung der Methoden wurde an Hand der Analyse von hybridisierter Cytomegalie-DNA durchgeführt.

Die Optimierung des DNA-Nachweises mit dem Chemilumineszenzsubstrat AMPPD erfolgte hinsichtlich der zu verwendenden AMPPD-Konzentration und der optimalen Expositionszeit. Zur Verwendung kamen auf Nylonmembran fixierte Digoxigenin markierte J-Fragment DNA und Cytomegalie Plasmid-DNA, die mit Digoxigenin markierter J-Fragment DNA hybridisiert wurden. Der DNA Einsatz erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen im Dot-blot Verfahren. Anschließend wurden die Digoxigenin markierten DNA-Sequenzen mit Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat versetzt und durch den Zusatz des Chemilumineszenzsubstrates AMPPD, das in Anwesenheit von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und Licht emittiert, detektiert.

Meine Untersuchungen ergaben, dass bei konstanter AMPPD-Konzentration von 0,5mM mit einer Expositionszeit von zwei Stunden optimale Ergebnisse erzielt werden können. Weiterhin konnte ich zeigen, dass für den Nachweis von 100 fg markierter J-Fragment DNA, sowie 1 pg hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA 2,4 mM AMPPD Substrat eingesetzt werden sollten. Geringere Konzentrationen an AMPPD reduzierten die Sensitivität.

Durch den Vergleich der von mir optimierten Chemilumineszenz-DNA-Nachweismethode mit dem etablierten, kolorimetrischen Enzym-Immuno-Assay konnte ich deutlich machen, dass die Chemilumineszenz-Methode hinsichtlich der Sensitivität dem etablierten Verfahren gleichwertig war. Ein Vorteil des Chemilumineszenz-Verfahrens gegenüber dem etablierten Verfahren war eine deutlich verkürzte Versuchsdauer. Die durchgeführten Versuche zum quantitativen Nachweis von hCMV in Urinproben erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse.

6. Anhang

6.1. Arbeitsprotokolle der Vorversuche

6.1.1. J-Fragmentisolierung aus elektrophoretisch getrennter Cytomegalie Plasmid-DNA

DNA-Isolierung mittels Lyse des Gels:

- Die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelvolumen bestimmt.
- Die grob zerkleinerten Gelstücke wurden mit dem 7-fachen Volumen an Lysispuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 8,0) versetzt und über Nacht bei 45⁰C im Wasserbad inkubiert.
- Anschließend wurde das Lysat in der SW 27 Beckman Zentrifuge (5⁰C, 10.000 U/min, 20 min) zentrifugiert.
- Die Überstände wurden der Phenolextraktion unterzogen. Dazu versetzt man die Proben mit der Phenollösung im Verhältnis 1:1, schwenkt einige Minuten, lässt die Proben 5 min im Eis ruhen und zentrifugiert (688 g, 0⁰C, 5 min).
- Die im Überstand befindliche DNA wurde mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Ebenfalls 1:1 mit dem Gemisch versetzt und wie in der Phenolextraktion bearbeitet.
- Anschließend wurde über Nacht gegen Dialysepuffer dialysiert, wobei der Puffer zweimal gewechselt wurde.
- Die DNA konnte schließlich durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, 1/100 Volumen 1 M Magnesiumchlorid und das 2-fache Volumen absoluten Ethanol präzipitiert werden (über Nacht bei - 30⁰C).
- Nach dem Zentrifugieren bei 40.000 g und 0⁰C für 45 min (Beckmann Ultrazentrifuge, SW 27) wurde das DNA-Pellet getrocknet und danach in DNA-Puffer gelöst.
- Zur Konzentrationsbestimmung und zur Bestimmung der Ausbeute der DNA-Extraktion ermittelte ich den Extinktionswert bei 260 nm (Spektralphotometer der Firma Zeiss).

Exemplarisch eine Berechnung :

a) Konzentrationsberechnung:

Wellenlänge 260 nm Extinktion 1,000 = 50 µg DNA/ml

Wellenlänge 260 nm Extinktion 0,247 = 12,35 µg DNA/ml

Schichtdicke der Küvette 0,5 cm = DNA-Gehalt x 2

12,35 µg DNA/ml x 2 = 24,70 µg DNA/ml

22,23 µg DNA / 900 µl

DNA = J-Fragment

b) Effizienz:

pCMV 14,57 kbp = 100 %

J-Fragment 10,6 kbp = 73 %

155 µg pCMV-DNA-Einsatz in die Extraktion entspricht einem J-Fragmentgehalt von 113,2 µg.

113,20 µg J-Fragment = 100 %

22,23 µg J-Fragment = 19,7 %

Elektrophoretische DNA-Isolierung auf Dialysemembran:

Diese Methode der Isolierung von DNA-Banden aus Gelelektrophoresen wurde von Girvitz et al. (1980) entwickelt.

- Ca. 2 mm hinter der zu isolierenden DNA-Bande wird ein Schlitz ins Gel geschnitten.
- Ein auf Maß zugeschnittener Dialyseschlauch und 3 MM Papier (so lang wie der Schlitz und 1 cm höher als das Gel) weichen 5 min in 1 x TAE-Puffer ein.
- Das 3 MM Papier und die Dialysemembran werden hintereinander in den Schlitz plaziert, so dass das 3 MM Papier zur DNA-Bande zeigt.
- Die Elektrophorese fortfahren, bis die gesamte DNA vom Gel in das Papier gewandert ist.
- Mit einer glühenden Nadel wird in die Spitze eines 400 µl Eppendorfgefäßes ein Loch

geschmolzen.

- Das DNA-haltige 3 MM-Papier und die Dialysemembran werden in das kleine Eppendorfggefäß plaziert und in ein 1,5 ml fassendes Eppendorfggefäß gestellt.
- Nach 15 sec Zentrifugieren in der Tischzentrifuge wird das Eluat entnommen.
- Zweimal wird das kleine Eppendorfggefäß mit je 100 µl Elutionspuffer gefüllt, zentrifugiert und das Eluat entnommen.
- Die gesammelten Eluate werden mit Phenol extrahiert, die wässrige Phase nochmals mit Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform gereinigt.
- Die DNA wird mit Ethanol präzipitiert.
- Das Pellet wird in neutralem DNA-Puffer gelöst.

Konzentrationsbestimmung: 43,0 µg J-Fragment / ml

8,6 µg J-Fragment / 200 µl

J-Fragment Gehalt: 39,3 %

DNA-Isolierung mit der Elektroelutionsmethode:

Die unter 2.4.3. beschriebene DNA-Isolierung durch die Elektroelutionsmethode ergab folgende Ergebnisse.

Konzentrationsbestimmung: 34,0 µg J-Fragment DNA / ml

13,4 µg J-Fragment DNA / 400µl

J-Fragment Gehalt: 37 %

6.2. Arbeitsprotokolle der Hauptversuche

6.2.1. Anreicherung des Plasmids pCM 5018

Die autoklavierte YT-Bouillon, bestehend aus 5 g NaCl, 8 g Bactotripton und 5 g Hefeextrakt auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt, wurde mit 20 µg/ml steril filtrierter Tetracyclinlösung versetzt. 20 ml dieser Bouillon wurden mit den plasmidtragenden E.coli Bakterien beimpft und über Nacht bei 37⁰C im Schüttelwasserbad bebrütet. Diese Vorkultur wurde zu 2000 ml der Bouillon gegeben und weiterhin bei 37⁰C in einem 2 Liter Reaktionsgefäß inkubiert.

Nach 6 Stunden erfolgten die Leukomycingabe (200 µg/ml) zu der Kultur und eine weitere Inkubationszeit von 18 Stunden.

6.2.2. Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA

Jeweils 500 ml der unter 2.3.1. entstandenen Bakteriensuspension wurden in der JA 14 Beckman Zentrifuge im vorgekühlten Rotor 10 min bei 5⁰C und 3.500 g zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde mit 10 ml steriler Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) versetzt und mit 5 mg/ml Lysozym resuspendiert. Zugewetztes Lysozym lysiert die Bakterienwand. Nach dem Transfer der Bakterienlösung in die Beckman JA 20 Polyallomertubes inkubierten diese 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 20 ml der frisch hergestellten Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) zugesetzt. Es folgte ein vorsichtiges Mischen der Inhaltsstoffe. 10 Minuten ruhten die Proben auf Eis. Nach Zugabe von 15 ml eiskalter Kaliumacetatlösung (60 ml einer 5 M Kaliumacetatlösung, 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml H₂O) wurden die geschlossenen Proben mehrmals kräftig geschüttelt und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben in der Beckman JA 20 Zentrifuge 25 min bei 48.300 g und 4⁰C zentrifugiert. Der plasmid-haltige Überstand wurde zu gleichen Teilen in zwei 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen dekantiert. Im zurückbleibenden Pellet befanden sich die Zell-DNA und der Bakteriendebris. Um die Plasmid DNA aus dem Überstand zurück zu gewinnen, wurde eine Alkoholpräzipitation angeschlossen.

Im Folgenden ist der Vorgang beschrieben: Zugabe von Isopropanol (0,6faches Volumen), gut schütteln; 15 min bei Zimmertemperatur ruhen lassen. Präzipitierte Plasmid-DNA 30 min bei 12000 g bei Raumtemperatur zentrifugieren. Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol,

nochmals zentrifugieren. Ethanol dekantieren und das Pellet vorsichtig trocken fächeln. Das Pellet in 8 ml TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) lösen.

6.2.3. Markierungsansatz

1. DNA denaturieren (10 min bei 95⁰C im Wasserbad erhitzen) und schnelles Abkühlen auf Eis (5 min).
2. Einzusetzendes DNA-Volumen bestimmen:
DNA-Gehalt : 127,5 µg/ml
DNA-Einsatz : 1 µg
Berechnung : 1 µg = 7,8 µl
3. Markierungsansatz vorbereiten (auf Eis):
1,0 µg frisch hitzedenaturierte J-Fragment DNA
7,8 µl DNA-Volumen
2,0 µl Hexanukleotid-Gemisch
2,0 µl dNTP-Markierungsgemisch
7,2 µl Aqua bidest. (auf 19 µl mit Aqua bidest. auffüllen)
1,0 µl Klenow Enzym
4. Inkubationszeit des Markierungsansatzes:
Mindestens 1 h bei 37⁰C inkubieren (besser über Nacht).
5. Stoppen der Reaktion:
2 µl EDTA-Lösung (0,2 mol/l, pH 8,0)
6. Präzipitation:
2 µl LiCl-Lösung (4,0 mol/l)
60 µl Ethanol (- 20⁰C)
gut schütteln und mindestens 30 min bei -70⁰C oder 2 h bei -20⁰C lagern (auch über Nacht möglich)
7. Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge:
10 min bei 12.000 g, dekantieren und mit gekühltem 70 %igen Ethanol waschen, nochmals

zentrifugieren, dekantieren und anschließend trocknen lassen.

8. Lösen der DNA:

DNA in 50 µl TE-Puffer 15 min bei Raumtemperatur lösen oder für 4 min bei 37°C.

9. Ermitteln des synthetisierten und markierten DNA-Gehaltes:

Synthetisierter DNA-Gehalt: 530 ng / 50 µl TE-Puffer

Lagerung der Probe bei -30°C.

6.3. Weiteres Bildmaterial über den Nachweis von hybridisierter Cytomegalie Plasmid-DNA durch das Chemilumineszenzverfahren und der Enzym-Immuno-Methode

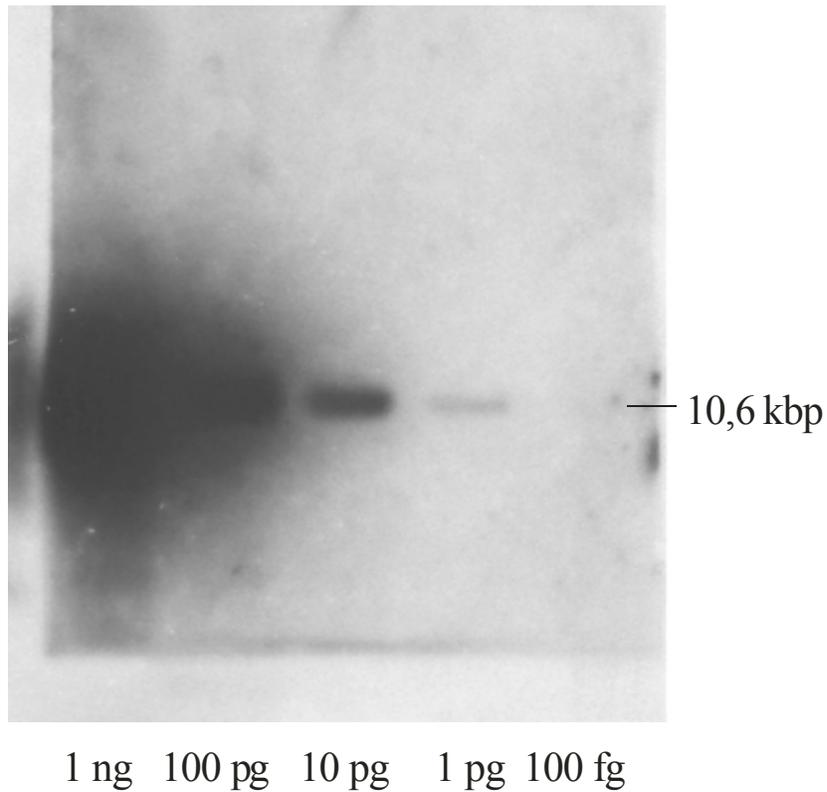


Abb. 17: Elektrophoretisch getrennte und mit 30 ng/ml Digoxigenin markierter J-Fragment DNA hybridisierte pCMV-DNA (Konzentrationen: 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 100 fg). Der Chemilumineszenznachweis erfolgte mit 2,4 mM AMPPD und einer 2-stündigen Detektionszeit.

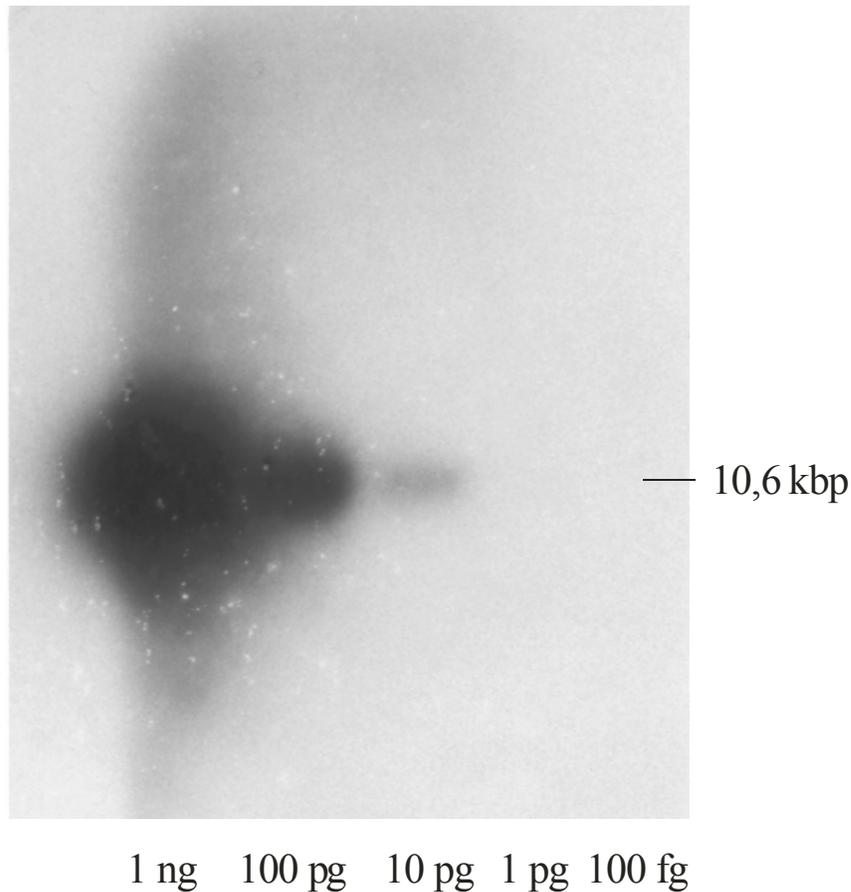


Abb. 18: Der Chemilumineszenznachweis von elektrophoretisch getrennter und hybridisierter pCMV-DNA erfolgte mit 2,4 mM AMPPD, zuzüglich des 1:50 verdünnten Blauverstärkers, und einer Detektionszeit von 2 Stunden. Die Konzentrationen an eingesetzter pCMV-DNA betragen 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 100 fg.

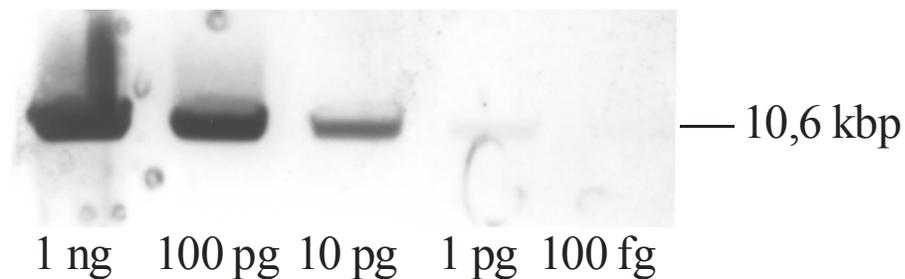


Abb. 19: Elektrophoretisch getrennte und mit 30 ng/ml J-Fragment DNA hybridisierte pCMV-DNA. Der DNA-Nachweis erfolgte durch die Enzym-Immuno-Methode. Die Konzentrationen an eingesetzter pCMV-DNA betragen 1 ng, 100pg, 10 pg, 1 pg und 100 fg.

7. Literaturverzeichnis

Adam W., Cilento G.:

Viergliedrige cyclische Peroxide als Äquivalente angeregter Zustände: Eine neue Dimension der Bioorganischen Chemie.

Angew. Chem. 95, 525-538 (1983)

Azzi A., Zakrewska K., Gentilomi G., Musiani M., Zerbini M.:

Detection of B19 parvovirus infections by a dot-blot hybridization assay using a digoxigenin-labelled probe.

J. Virol. Methods 27, 125-134 (1990)

Beck S., O'Keeffe T., Coull J.M., Köster H.:

Chemiluminescent detection of DNA: application for DNA sequencing and hybridization.

Nucleic Acids Res. 17, 5115-5123 (1989)

Boehringer Mannheim:

DNA labeling and detection nonradioactive.

Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica (1989)

Boom R., Sol C., Weel J., Gerrits Y., de Boer M., Wertheim van Dillen P.:

A highly sensitive assay for detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in serum and plasma by PCR and elektrochemiluminescence.

J. Clin. Microbiol. 37, 1489-97 (1999)

Bronstein I., Edwards B., Votya J.C.:

1,2-Dioxetanes: novel chemiluminescent enzyme substrates. applications to immunoassays.

J. Biolumin. Chemilumin. 4, 99-111 (1989a)

Bronstein I., McGrath P.:

Chemiluminescence lights up.

Nature 338, 599-600 (1989b)

Bronstein I., Voyta J.C., Edwards B.:

A comparison of chemiluminescent and colorimetric substrates in a Hepatitis B virus DNA hybridization assay.

Anal. Biochem. 180, 95-98 (1989c)

Bronstein I., Voyta J.C., Lazzari K.G., Murphy O., Edwards B., Kricka L.J.:

Rapid and sensitive detection of DNA in southern blots with chemiluminescence.

Biotechniques 8, 310-314 (1990)

Campbell A. K.:

Chemiluminescence: principles and applications in biology and medicine.

1. Aufl., 15-65, VHC Verlagsgesellschaft Weinheim (1988)

Chan V.T.-W., Fleming K.A., McGee J.O'D.:

Detection of subpicogram quantities of specific DNA sequences on blot hybridization with biotinylated probes.

Nucleic Acids Res. 13, 8083-8091 (1985)

Cooney C.A., Matthews H.R.:

The isolation of Satellite-DNA by density gradient centrifugation.

In: Walker J.M.: Methods in Molecular Biology. Vol.2, 21-29, Humana Press, New York (1984)

DeLong E.F., Wickham G.S., Pace N.R.:

Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells.

Science 243, 1360-1363 (1989)

Dubitsky A., Brown J., Brandwein H.:

Chemiluminescent detection of DNA on nylon membranes.

Biotechniques 13, 392-399 (1992)

Escarceller M., Rodriguez-Frias F., Jardi R., San Segundo B., Eritja R.:
Detection of Hepatitis B virus DNA in human serum samples: use of digoxigenin-labeled oligonucleotides as modified primers for polymerase chain reaction.
Anal. Biochem. 206, 36-42 (1992)

Feinberg A.P., Vogelstein B.:
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. 132, 6-13 (1983)

Felsenfeld G., Hirschman S.Z.:
A neighbour-intracation analysis of the hypochromism and spectra of DNA.
J. Mol. Biol. 13, 407 (1965)

Geiger C.P., Caselmann W.H.:
Non radioactive hybridization with hepatitis C virus-specific probes created during polymerase chain reaction: a fast and simple procedure to verify hepatitis C virus infection.
J. Hepatol. 15, 387-390 (1992)

Gentilomi G., Musiani M., Roda A., Pasini P., Zerbini M., Gallinella G., Baraldini M., Venturoli S., Manaresi E.:
Co-localization of two different viral genomes in the same sample by double-cheminulimescence in situ hybridization.
Biotechniques 23, 1076-1080 (1997)

Gentilomi G., Musiani M., Zerbini M., Gallinella G., Gibellini D., La Placa M.:
A hybrido-immunocytochemical assay for the in situ detection of cytomegalovirus DNA using digoxigenin-labeled probes.
J. Immunol. Methods 125, 177-183 (1989)

Gingold E.B.:

The use of restriction endonucleases.

In: Walker J.M.: Methods in Molecular Biology. Vol. 2, 217-223, Humana Press, Clifton, New Jersey (1984)

Girotti S., Musiani M., Pasini P., Ferri E., Gallinella G., Zerbini M.L., Roda A., Gentilomi G., Venturoli S.:

Application of a low-light imaging device and chemiluminescent substrates for quantitative detection of viral DNA and hybridization reactions.

Clin. Chem. 41, 1693-1697 (1995)

Girvitz S.C., Bacchetti S., Rainbow A.J., Graham F.L.:

A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels.

Anal Biochem. 106, 492-496 (1980)

Gregersen N., Koch J., Kolvraa S., Petersen K.B., Bolund L.:

Improved methods for the detection of unique sequences in Southern blots of mammalian DNA by nonradioactive biotinylated DNA hybridization probes.

Clin. Chemica. Acta 169, 267-280 (1987)

Hauber R., Geiger R.:

A new, very sensitive, bioluminescence-enhanced detection system for protein blotting.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 25, 511-514 (1987)

Höltke H. J., Sagner G., Kessler C., Schmitz G.:

Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: A fast and simple protocol and its applications.

Biotechniques 12, 104-113 (1992)

Jablonski E., Moomaw E.W., Tullis R.H., Ruth J.L.:

Preparation of oligonucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes.

Nucleic Acids Res. 14, 6115-6128 (1986)

Karger A. E., Weiss R., Gesteland R. F.:

Digital chemiluminescence imaging of DNA sequencing blots using a charge-coupled device camera.

Nucleic Acids Res. 20, 6657-6665 (1992)

Kimpton C.P., Corbitt G., Morris D.J.:

Detection of cytomegalovirus DNA using probes labelled with digoxigenin.

J. Virol. Methods 24, 335-346 (1989)

Kincaid R.L., Nightingale M.S.:

A rapid nonradioactive procedure for plaque hybridization using biotinylated probes prepared by random primed labeling.

Biotechniques 4, 42-49 (1988)

Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C.:

Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes.

Natl. Acad. Sci. 78, 6633-6637 (1981)

Lanzillo J.J.:

Chemiluminescent nucleic acid detection with digoxigenin-labeled probes: A model system with probes for angiotensin converting enzyme which detect less than one attomole of target DNA.

Anal. Biochem. 194, 45-53 (1991)

Leary J.J., Brigati D.J., Ward D.C.:

Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose:bio-blots.

Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 4045-4049 (1983)

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.:

Molecular cloning: a laboratory manual.

Gold Spring Harbor Laboratory, 164-169 , Gold Spring Harbor, New York, (1982)

Martin C.S., Bronstein I.:

Imaging of chemiluminescent signals with cooled CCD camera systems.

J. Biolumin. Chemilumin. 9, 145-153 (1994)

Martin R., Hoover C., Grimme S., Grogan C., Höltke J., Kessler C.:

A highly sensitiv, nonradioactive DNA labeling and detection system.

Biotechniques 9, 762-768 (1990)

Mayr A., Bachmann P.A., Bibrack B., Wittmann G.:

Virologische Arbeitsmethoden, Band III.

1.Auflage, 20-112, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1989)

McCapra F.:

Alternative mechanism for dioxetan decomposition.

J.C.S. Chem. Comm., 946-948 (1977)

Meselson M., Stahl W., Vinograd J.:

Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients.

Proc. Natl. Acad. Sci. 43, 581 (1957)

Musiani M., Zerbini M., Gibellini D., Gentilomi G., LaPlaca M., Ferri E., Girotti S.:
Chemiluminescent assay for the detection of viral and plasmid DNA using digoxigenin-labeled probes.

Anal.Biochem. 194, 394-398 (1991a)

Musiani M., Zerbini M., Gibellini D., Gentilomi G., Venturoli S., Gallinella G., Ferri E., Girotti S.:

Chemiluminescence dot blot hybridization assay for detection of B19 parvovirus DNA in human sera.

J. Clin. Microbiol. 29, 2047-2050 (1991b)

Musiani M., Zerbini M., Gentilomi G., Gibellini D., Gallinella G., Venturoli S., LaPlaca M.:
Detection of CMV DNA in clinical samples of AIDS patients by chemiluminescence hybridization.

J. Virol. Methods 38, 1-10 (1992)

Musiani M., Roda A., Zerbini M., Pasini P., Gentilomi G., Galinella G., Venturoli. S.:
Chemiluminescent in situ hybridization for the detection of cytomegalovirus DNA.

Am J. Pathol. 148, 1105-1112 (1996)

Neumann R., Rudloff P., Eggers H.J.:

Biotinylated DNA probes: Sensitivity and applications.

Naturwissenschaften 73, 553-555 (1986)

Nevinny-Stickel C. Hinzpeter M., Andreas A., Albert E.D.:

Non-radioactive oligotyping for HLA-DR1-DRw10 using polymerase chain reaction, digoxigenin-labelled oligonucleotide and chemiluminescence detection.

Eur J. Immunogenet. 18: 323-332 (1991)

Pollard-Knight D., Simmonds A.C., Schaap A.P., Akhavan H., Brady M.A.W.:
Nonradioactive DNA detection on Southern blots by enzymatically triggered
chemiluminescence.

Anal. Biochem. 185, 353-358 (1990)

Radloff R.W., Bauer W., Vinograd J.:

A dye-buoyand density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA:
The closed circular DNA in HeLa cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 57, 1514 (1967)

Reimer V.:

Vergleichende Untersuchungen der DANN von Herpes-simplex-Virus-Typ-I-Isolaten mittels
Restriktionsenzymanalyse zur Differenzierung intratypischer Genomvarianten.

Med. Diss. Lübeck, (1989)

Rüger R., Bornkamm G.W., Fleckenstein B.:

Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome.

J. gen. Virol. 65, 1351-1364 (1984)

Schaap A.P., Akhavan H., Romano L.J.:

Chemiluminescent substrates for alkaline phosphatase: application to ultrasensitive enzyme-
linked immunoassays and DNA probes.

Clin. Chem. 35, 1863-1864 (1989)

Schleif R.F., Wensink P.C.:

Practical Methods in Molecular Biology.

101-106, Springer-Verlag, New York (1981)

Schmidt B.L., Gschnait F.:

Erregernachweis von AIDS mittels Polymerasekettenreaktion und Chemilumineszenz-
messung.

Hautarzt 42, 754-758 (1991)

Schneider J., Müller L.:

DNA-DNA-Hybridisierung mit biotinylierten DNA-Sonden.

Forum Mikrobiol. 6, 254-262 (1988)

Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J.:

Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis.

Biochemistry 12, 3055-3063 (1973)

Southern E.M.:

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

Southern E.M.:

Gel electrophoresis of restriction fragments.

Methods in Enzymol. 68, 152-191 (1979)

Stevens J., Yu F.S., Hassoun P.M., Lanzillo J.J.:

Quantification of polymerase chain reaction products: enzyme immunoassay based systems for digoxigenin- and biotin-labelled products that quantify either total or specific amplicons.

Mol. Cell Probes 10, 31-41 (1996)

Stryer L.:

Biochemie

3. Auflage, Kapitel 24, 430 - 461, Vieweg, Braunschweig (1985)

Tizard R., Cate R.L., Ramachandran K.L., Wusk M., Voyta J.C., Murphy O.J., Bronstein I.:

Imaging of DNA sequences with chemiluminescence.

Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 4515-4518 (1990)

Urdea M.S., Warner B.D., Running J.A., Stempien M., Clyne J., Horn T.:

A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes.

Nucleic Acids Res. 16, 49-56 (1988)

Vlieger A.M., Medenblik A.M., Gijlswijk R., Tanke H.J., van der Ploeg M., Gratama J.W., Raap A.K.:

Quantitation of polymerase chain reaction products by hybridisation-based assays with fluorescent, colorimetric or chemiluminescent detection.

Anal. Biochem. 205, 1-7 (1992)

Walker J.M.:

Methods in Molecular Biology.

Humana Press Clifton, 60, New Jersey (1984)

Winnacker E.L.:

Gene und Klone - Einführung in die Gentechnologie .

1. Aufl., 110-115, Weinheim, Verlag Chemie (1984)

Wolf H., Leser U., Motz M., Seibl R.:

Möglichkeiten und Grenzen der Diagnostik mit DNA-Proben.

Lab.med. 10, 229-234 (1986)

Zachar V., Mayer V., Aboagye-Mathiesen G., Norske-Lauritsen N., Ebbesen P.:

Enhanced chemiluminescence-based hybridization analysis for PCR-mediated HIV-1 DNA detection offers an alternative to ^{32}P -labelled probes.

J. Virol. Methods 33, 391-395 (1991)

Zwadyk P., Jr., Cooksey R.C. Thornsberry C.:

Commercial detection methods for biotinylated gene probes: Comparison with ^{32}P -labeled DNA probes.

Curr. Microbiol. 14, 95-100 (1986)

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. H. Dennin danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die hilfreiche Betreuung beim Verfassen der Dissertationsschrift. Insbesondere gilt ihm mein Dank für das Verständnis, dass ich meine Arbeit aus persönlichen Gründen erst längere Zeit nach Abschluss der praktischen Arbeit im Labor abgeben konnte.

Herrn Prof. Dr. W. Henkel, ehemaliger Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck, danke ich für die Bereitstellung eines Laborplatzes sowie die Überlassung der Arbeitsgeräte und Materialien in den Virologischen Laboratorien.

Mein besonderer Dank gilt der Medizinisch Technischen Assistentin Frau Siegrid Pätzmann für die Einweisung in die virologischen Arbeitstechniken und der stets hilfsbereiten Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Christoph Dodt, Herrn Dr. Jan Kramer und Herrn Dr. Martin Schreiber danke ich für kritische Durchsicht der schriftlichen Arbeit.

Meiner Familie danke ich für die moralische und emotionale Unterstützung während der Wiederaufnahme der schriftlichen Überarbeitung dieser Promotionsarbeit.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Astrid Ohlmann
 geboren am: 20.07.1962 in Hamburg – Harburg; verheiratet, 1 Sohn

Ausbildungsdaten

1968 - 1978 Grundschule Neugraben und Realschule Henstedt-Ulzburg I
 1978 - 1981 Berufsausbildung als Biologielaborantin im Forschungsinstitut Borstel,
 Institut für Experimentelle Biologie und Medizin
 1981 - 1984 Besuch des Fachgymnasiums in Norderstedt,
 Sozialwirtschaftlicher Zweig
 Mai 1984 Schulabschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
 1984 - 1986 Berufstätigkeit als wissenschaftliche Assistentin im Heinrich-Pette-
 Institut in Hamburg-Eppendorf
 1985 – 1993 Medizinstudium an der Medizinischen Universität zu Lübeck
 Oktober 1988 - Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für Medizinische
 August 1990 Mikrobiologie, Abteilung für Virologie, Prof. Dr. R. H. Dennin
 1992 – 1993 Praktisches Jahr: Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Eutin/Holstein,
 Anästhesiologie und Chirurgie an der Med. Universität zu Lübeck
 Mai 1993 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: „gut“

Berufserfahrung

1984 – 1986 Wissenschaftliche Assistentin im Heinrich-Pette-Institut, Institut für
 experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität
 Hamburg, Abteilung für Zellbiologie, Leitung Prof. Dr. W. Ostertag
 1993 -1995 Ärztin im Praktikum in der Klinik Innere Medizin I der Medizinischen
 Universität zu Lübeck, Leitung Prof. Dr. H.-L. Fehm
 1995 - 1996 Wissenschaftliche Assistentin im Institut für Toxikologie der
 Medizinischen Universität zu Lübeck, Leitung Prof. Dr. O. Strubelt
 1996 - 2004 Assistenzärztin in der Klinik Innere Medizin I, Leitung von Prof. Dr.
 H.-L. Fehm, Schwerpunkt Nephrologie
 Februar 2003 Facharztanerkennung Innere Medizin