

Alternative Methoden für den Nukleinsäure-basierten Nachweis genetisch veränderter Lebens- und Futtermittel

vorgelegt von
Tierärztin
Lillian Roth

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Stahl

Berichter: Prof. Dr. L.W. Kroh

Berichterin: Prof. Dr. A. Hartwig

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 04. Dezember 2009

Berlin 2010

D 83

Abstract (GER)

In der vorliegenden Arbeit wird die Untersuchung neuer methodischer Ansätze für die Analyse genetisch veränderter Organismen (GVO) in Lebens- und Futtermitteln beschrieben. Der Bedarf für die Entwicklung alternativer GVO-Nachweismethoden ergibt sich aus den Rechtsvorschriften bezüglich der Rückverfolgbarkeit von GVO in der Europäischen Union sowie der fortschreitenden Zunahme von GVO in Europa.

Die durchgeführten Arbeiten hatten grundsätzlich zwei Schwerpunkte. Einerseits wurde ein Verfahren der Gesamtgenomamplifikation, die *multiple displacement amplification*, für die Anreicherung von Proben-DNA eingesetzt und hinsichtlich ihrer Eignung für die GVO-Analyse untersucht. Genomische DNA verschiedener genetisch veränderter Maislinien wurde mit dieser Methode amplifiziert. Die resultierende DNA wurde hinsichtlich ihrer Ausbeute und Qualität beurteilt. In Real-Time PCR (Polymerasekettenreaktion)-Analysen wurde das Verhalten der amplifizierten DNA mit dem der Ausgangs-DNA verglichen. Zudem wurde die Gleichmäßigkeit der Vervielfältigung verschiedener Genom-Abschnitte geprüft. Unabhängig von der Menge eingesetzter genomischer DNA wurde eine konstante Ausbeute hochmolekularer Mais-DNA generiert, die sich in der Real-Time PCR identisch zur Ausgangs-DNA verhielt. Die Amplifikation verschiedener Genomabschnitte war weitgehend gleichmäßig. Die mittels *multiple displacement amplification* vervielfachte DNA ist für die qualitative GVO-Analyse geeignet und kann zur Anreicherung von Proben-DNA oder als Referenzmaterial verwendet werden.

Das zweite Teilziel der Arbeit war die Entwicklung eines DNA-Nachweisverfahrens für die parallele GVO-Detektion als Alternative zur PCR. Die Methodik sollte auf den Ergebnissen des ersten Teils aufbauen, indem die Gesamtgenomamplifikation als Grundlage für die Bereitstellung von Proben-DNA genutzt werden sollte. Es wurde eine neue Strategie für die Sequenz-spezifische DNA-Detektion entwickelt, bei der eine Kombination aus direkter Hybridisierung genomischer DNA, immunologischer Detektion und Signal-Amplifikation mittels einer uniformen PCR eingesetzt wird. Die Detektion und Visualisierung basiert auf dem Prinzip der aus dem Bereich der Protein-Analytik stammenden Real-Time Immuno-PCR. Nach dem Aufbau einer geeigneten Methodik und der Optimierung einzelner Arbeitsschritte wurde die Leistungsfähigkeit der Methode für die Detektion verschiedener Zielmoleküle untersucht. Die Ergebnisse belegen erstmals den Sequenz-spezifischen, selektiven Nachweis von DNA mit der Real-Time Immuno-PCR, die bisher ausschließlich für den Nachweis von Antigenen verwendet wurde. Sowohl synthetische Oligonukleotide als auch PCR-amplifizierte Proben-DNA ließen sich mit und ohne Anwesenheit von Hintergrund-DNA mit hoher Messpräzision und Wiederholbarkeit nachweisen. Die Nachweisgrenze für ein synthetisches DNA-Oligomer unter optimierten Nachweisbedingungen lag bei 6 Attomol, während PCR-amplifizierte DNA in Mischungen mit nicht-komplementären PCR-Amplika bis zu einer Menge von 60 Attomol detektiert wurde. Die hohe Signalstärke der Detektion durch die Signal-Amplifikation mittels PCR war gleichzeitig mit starken Hintergrund-Signalen verbunden, die die Sensitivität der DNA-Detektion in Anwesenheit größerer Mengen unspezifischer DNA verringerten. Versuche mit genomischer Hintergrund-DNA zeigten, dass die Sensitivität der Detektion nicht für den direkten Nachweis von Einzelkopie-Sequenzen in komplexer genomischer DNA – wie genetisch veränderter Pflanzen-DNA – ohne eine vorherige Zielsequenz-Amplifikation ausreicht. Ein Einsatz der Methode für andere Anwendungen ist denkbar, bei denen entweder kleinere Genome (beispielsweise von Bakterien oder Viren) oder mehrfach im Genom vorhandene Zielsequenzen untersucht werden.

Abstract (ENG)

The present thesis explores novel approaches for the analysis of genetically modified organisms (GMOs) in foods and feeds. The European legislation related to traceability of GMOs and the constantly increasing number of GMOs in Europe create a demand for the development of alternative GMO detection methods.

The focus of this work is on two objectives. On the one hand, multiple displacement amplification, a whole genome amplification technique, was tested for its suitability regarding the enrichment of sample DNA for GMO analysis. Genomic DNA of several genetically modified maize lines was amplified and evaluated in terms of yield and quality. The real-time PCR (polymerase chain reaction) properties of the amplified DNA were assessed in comparison with the original DNA. Additionally, gene representation after multiple displacement amplification was analyzed with respect to a possible amplification bias. Regardless of the amount of input DNA, amplification yielded a constant amount of high molecular weight maize DNA. Real-time PCR performance and gene representation of the amplified DNA were comparable to those of the original DNA. Multiple displacement amplification is a suitable tool for the accumulation of sample DNA and the generation of reference material for qualitative GMO analysis.

The second intention of this study was the design and development of a DNA detection method for the parallel detection of GMOs as an alternative to PCR. The approach was to be based on the results of the first part of this work by using the multiple displacement amplification technique for the preparation of sample DNA. A novel strategy for sequence specific DNA detection was developed, applying a combination of direct hybridization of genomic DNA, immunological detection and signal amplification by a uniform PCR. Visualization relies on the principle of real-time immuno-PCR, a technique formerly used for protein detection. A methodological concept was implemented and several experimental steps were optimized. Subsequently, the performance of the method was determined concerning the detection of various target molecules. The obtained results demonstrate for the first time a sequence specific and selective detection of DNA by the real-time immuno-PCR technique. Both synthetic oligonucleotides and PCR amplified sample DNA with or without the presence of background DNA were detected with high precision and repeatability. Under optimized conditions, the limit of detection was 6 attomol for a synthetic DNA oligomer and 60 attomol for a PCR amplified target mixed with non-complementary PCR products. The amplification power of the PCR resulted in high signal intensities. However, it was coupled with high background signals as well, thereby decreasing the sensitivity of DNA detection in the presence of major amounts of unspecific DNA. When genomic DNA background was included in the reaction, sensitivity proved not to be sufficient for the direct detection of single copy genes in complex genomic DNA – like genetically modified plant DNA – without prior target amplification. Possibly, the method might be employed for other applications than GMO detection, where either less complex genomes or multiple copy genes are analyzed.

Danksagung

Diese Arbeit entstand am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin unter der Betreuung von Hermann Broll (BfR) und Prof. Dr. Lothar W. Kroh (Technische Universität Berlin). Die Untersuchungen wurden von der Europäischen Kommission im Rahmen des Forschungsprojekts „Co-Extra“, Vertrag 2003-7158 im 6. Rahmenprogramm der EU (Priorität 5, Lebensmittelqualität und -sicherheit), finanziell unterstützt.

An dieser Stelle möchte ich diejenigen erwähnen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ihnen danken.

Herrn Professor Dr. Lothar W. Kroh spreche ich meinen Dank aus für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und die Begutachtung seitens der Technischen Universität Berlin zu übernehmen, für sein Interesse an der Arbeit und seine hilfreichen Anregungen zur Anfertigung der Dissertation.

Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Hermann Broll sowie Dr. Jutta Zagon für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren, für hilfreiche Diskussionen und gute Ideen, die diese Arbeit gefördert haben, und für ihre vielfältige Unterstützung und Betreuung.

Bei allen Kollegen der Fachgruppe 56 am BfR möchte ich mich für die nette Aufnahme in den Kreis der Biologen, Lebensmittelchemiker und -technologen und das fröhliche und hilfsbereite Arbeitsklima bedanken. Insbesondere geht mein herzlicher Dank an Dr. Ines Laube, Dr. Anke Ehlers, Almuth Spiegelberg, Almut Leffke, Bettina Linke, Dr. Bärbel Jansen, Dr. Katharina Krzikalla, Michael Pfister, Sabine Quednau und Dr. Lutz Dehne für jegliche fachliche, organisatorische und menschliche Unterstützung.

Ich danke meinen Freunden, meiner Familie und ganz besonders Florian, die mich im Privaten unterstützt und mir den Ausgleich gegeben haben, um auch die schweren Phasen einer Promotion zu meistern. Meiner Schwester danke ich außerdem für das sorgfältige Korrekturlesen der Dissertation.

Ausdrücklich gilt mein großer Dank meinen Eltern, die mir die Ausbildung ermöglicht und mich bei der Verwirklichung meiner Ziele vertrauensvoll unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Problemstellung und Zielsetzung.....	1
1.2 Literatur.....	7
2 GESAMTGENOMAMPLIFIKATION	9
2.1 Hintergrund	9
2.1.1 Problemstellung und Zielsetzung	9
2.1.2 Prinzip der Multiple Displacement Amplification	10
2.1.3 Anwendungen der Multiple Displacement Amplification.....	12
2.2 Methoden	13
2.2.1 DNA-Isolierung.....	13
2.2.1.1 CTAB-Extraktion	13
2.2.1.2 DNeasy Plant Mini Kit	14
2.2.2 DNA-Reinigung	14
2.2.2.1 Phenol/Chloroform-Reinigung	14
2.2.2.2 Ethanol-Präzipitation	14
2.2.2.3 Säulenreinigung.....	15
2.2.3 Konzentrationsbestimmung der DNA	15
2.2.3.1 Spektrophotometrie	15
2.2.3.2 Fluorometrie	15
2.2.3.3 Berechnung der mdaDNA-Zusammensetzung	16
2.2.4 Gelelektrophorese.....	16
2.2.5 Gesamtgenomamplifikation	17
2.2.5.1 Multiple Displacement Amplification	17
2.2.5.2 Klenow-Amplifikation.....	18
2.2.6 Real-Time PCR	19
2.2.6.1 Funktionsprinzip.....	19
2.2.6.2 Durchführung	20
2.2.7 Berechnung von Molekulargewichten und Kopienzahlen.....	21
2.2.8 Statistische Datenanalyse	22
2.3 Ergebnisse und Diskussion	22
2.3.1 Qualitätsbeurteilung und Quantifizierung der mdaDNA.....	22
2.3.1.1 Zusammensetzung der mdaDNA.....	22
2.3.1.2 Sensitivitätsvergleich mit gDNA, mdaDNA und Klenow-biotinylierter DNA	29
2.3.2 Eignung der mdaDNA für die GVO-Analyse	31
2.3.2.1 Verhalten der mdaDNA in der Real-Time PCR	31
2.3.2.2 Genrepräsentation.....	35

2.3.2.3 Gesamtbeurteilung und Anwendungsmöglichkeiten	37
2.4 Zusammenfassung	40
2.5 Literatur	40
3 REAL-TIME IMMUNO-PCR	44
3.1 Hintergrund	44
3.1.1 Problemstellung und Zielsetzung	44
3.1.2 Peptidnukleinsäure.....	47
3.1.2.1 Eigenschaften von Peptidnukleinsäure	47
3.1.2.2 Anwendungen von Peptidnukleinsäure.....	49
3.1.3 Immuno-PCR.....	50
3.1.3.1 Prinzip der Immuno-PCR für die Proteindetektion.....	50
3.1.3.2 Anwendungen der Immuno-PCR für die Proteindetektion	52
3.2 Methoden	53
3.2.1 Sequenzdatenbank-Recherche, Primer- und Sonden-Design.....	53
3.2.2 Klassische PCR	54
3.2.3 Ziel-DNA für die RT-iPCR	55
3.2.3.1 Synthetische Oligonukleotide	55
3.2.3.2 PCR-Amplifikate	55
3.2.3.3 Genomische Hintergrund-DNA	56
3.2.4 Präparative Agarose-Gele und DNA-Aufreinigung.....	57
3.2.5 PNA-Sonden.....	57
3.2.6 Plattenbeschichtung und PNA-Immobilisierung	58
3.2.7 Herstellung der <i>reporter</i> -DNA	60
3.2.8 Herstellung des Detektionskonjugats.....	61
3.2.9 Durchführung der RT-iPCR	62
3.2.10 Denaturierung mit Blocking-Oligonukleotiden	63
3.3 Ergebnisse und Diskussion	64
3.3.1 Auswahl einer methodischen Strategie.....	64
3.3.1.1 Voraussetzungen	64
3.3.1.2 Kombination von MDA-Vervielfältigung und RT-iPCR für den GVO-Nachweis.....	65
3.3.2 Funktionsprinzip der RT-iPCR für die DNA-Detektion.....	67
3.3.3 Arbeitsbeschreibung der RT-iPCR für die DNA-Detektion	69
3.3.4 Peptidnukleinsäuren.....	70
3.3.5 Herstellung der <i>reporter</i> -DNA	71
3.3.5.1 Design des <i>reporter</i> -DNA-Systems	71
3.3.5.2 Herstellung der <i>reporter</i> -DNA	72
3.3.5.3 TaqMan-System für die <i>reporter</i> -DNA	74
3.3.6 Herstellung des Detektionskonjugats.....	77
3.3.7 Herstellung der Ziel-DNA	78

3.3.7.1 PCR-Amplifikate	78
3.3.7.2 Biotinylierte Hintergrund-DNA.....	82
3.3.8 Prüfung der grundsätzlichen Durchführbarkeit	83
3.3.9 Optimierung einzelner Arbeitsschritte.....	85
3.3.9.1 Plattenbeschichtung.....	86
3.3.9.2 Sondenkonzentration	86
3.3.9.3 Detektionskonjugat.....	89
3.3.9.4 Sonstige Parameter	91
3.3.10 Detektion eines synthetischen Oligonukleotids.....	91
3.3.10.1 Sensitivität	91
3.3.10.2 Präzision	94
3.3.11 Detektion synthetischer Oligonukleotide in Mischungen.....	96
3.3.11.1 Selektivität	96
3.3.11.2 Präzision	99
3.3.12 Detektion PCR-amplifizierter Proben-DNA	100
3.3.12.1 Vergleich von Ziel-Molekülen unterschiedlicher Längen und Biotinylierungsgrade.....	101
3.3.12.2 Längen-unabhängiger Vergleich eines PCR-Amplikons mit einem synthetischen Oligonukleotid	104
3.3.12.3 Denaturierung	105
3.3.12.4 Sensitivität	108
3.3.12.5 Präzision	112
3.3.13 Detektion in genomischer Hintergrund-DNA	114
3.3.13.1 Synthetisches Oligonukleotid in Klenow-biotinylierter mdaDNA	114
3.3.13.2 Synthetisches Oligonukleotid in TdT-biotinylierter gDNA.....	116
3.3.13.3 PCR-Amplikon in Klenow-biotinylierter mdaDNA	118
3.3.14 Direkte Detektion GVO-spezifischer Sequenzen in genomischer Pflanzen-DNA	121
3.3.15 Gesamtbeurteilung der RT-iPCR für die DNA-Detektion	121
3.3.15.1 Allgemeine Anforderungen	121
3.3.15.2 Sensitivität	123
3.3.15.3 Selektivität.....	126
3.3.15.4 Präzision	127
3.3.15.5 Fazit und Ausblick.....	127
3.4 Zusammenfassung.....	128
3.5 Literatur.....	129
4 ANHANG	A1
Anhang A Materialien.....	A1
Anhang B Abkürzungsverzeichnis.....	A11
Anhang C Eigene Publikationen	A14

1 Einleitung

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Genetisch veränderte Organismen (GVO) besitzen mindestens ein vollständig oder teilweise durch gentechnische Methoden in ihr Genom eingefügtes Gen (Transgen). Durch die genetische Veränderung wird die Ausbildung neuer Merkmale bezweckt. In der Regel exprimieren GVO Proteine, die in einer nützlichen Veränderung der Eigenschaften des betreffenden Organismus resultieren. Meist sind dies Resistenzen gegenüber Pflanzenschutzmitteln oder Schädlingen, die überwiegend Vorteile im Anbau der Pflanzen für die Produktion von Lebensmitteln, Futtermitteln, Pflanzenfasern oder Biotreibstoffen mit sich bringen. Es werden aber auch GVO entwickelt, die zu günstigeren oder „gesünderen“ Lebensmitteln führen sollen (Broll & Zagon 2006).

Seit Beginn des kommerziellen Anbaus im Jahr 1996 in den USA sind die weltweiten GVO-Anbauflächen auf 114 Millionen Hektar in 23 Ländern im Jahr 2007 gestiegen (Abbildung 1-1). Den größten Anteil daran haben gentechnisch verändertes (gv-) Soja (51 %), gv-Mais (31 %), gv-Baumwolle (13 %) und gv-Raps (5 %).

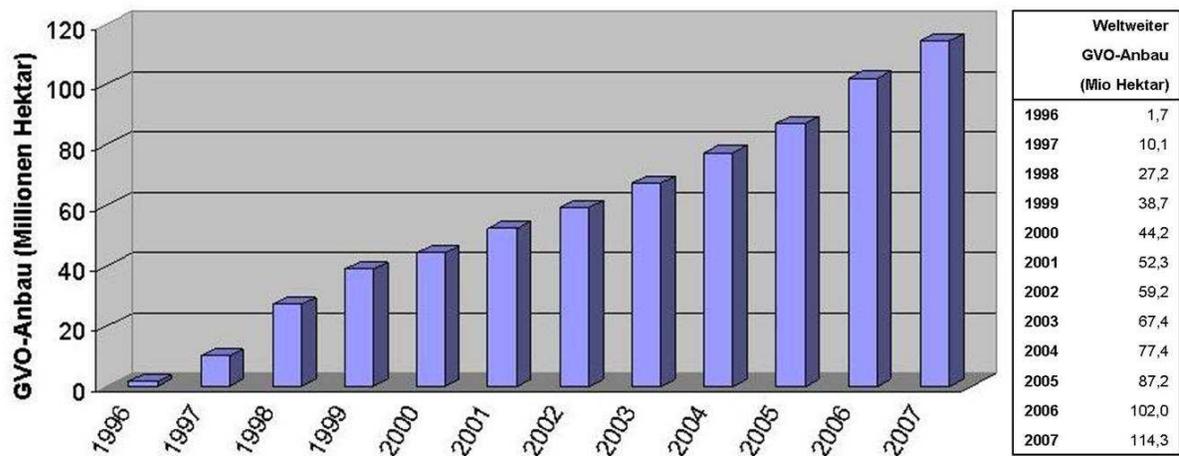


Abbildung 1-1 Entwicklung der globalen GVO-Anbaugelände von 1996 bis 2007. Daten aus Brookes & Barfoot (2006) und James (2008).

Seit 1998 werden gv-Pflanzen auch in der Europäischen Union (EU) angebaut. In der Richtlinie 2001/18/EG (EG 2001) sind die Zulassung, die Freisetzung und das Inverkehrbringen von GVO geregelt. Die einzige heute für den Anbau in der EU zugelassene gv-Pflanze ist Mais (*Zea mays*) der Linie MON810. Insgesamt sind 51 MON810-Sorten im europäischen Saatregister eingetragen (GMO Compass 2009). Im Jahr 2008 betrug die Gesamt-Anbaufläche von Mais der Linie MON810 108.000 Hektar. Von den Flächen lagen 73 % in Spanien, gefolgt von Tschechien mit 8 %, während

Problemstellung und Zielsetzung

sich in Deutschland nur 3 % der Anbauflächen befanden. In Frankreich wurde der Anbau von Bt-Mais im Februar 2008 verboten, daher kam es erstmals zu einer leichten Abnahme der Gesamtanbaufläche im Vergleich zum Vorjahr (Abbildung 1–2). Anbauverbote für MON810-Mais bestehen derzeit in Österreich, Griechenland, Ungarn, Frankreich und seit April 2009 auch in Deutschland (Abbott 2009).

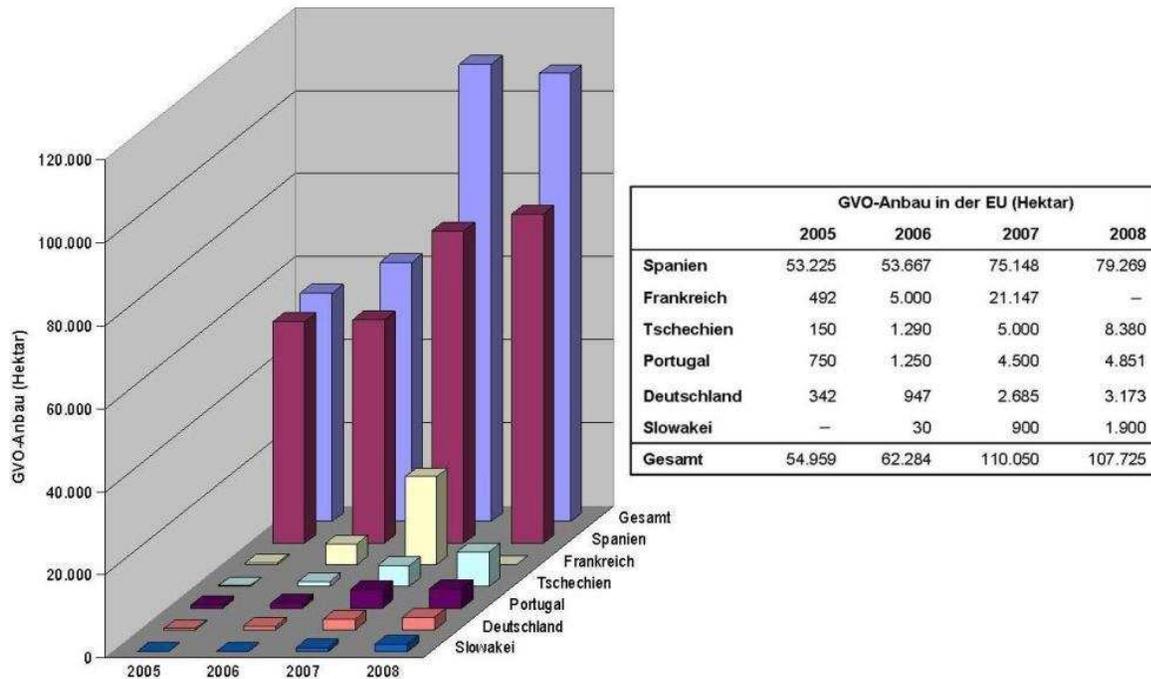


Abbildung 1-2 Entwicklung der GVO-Anbaugelände in den sechs Ländern der EU mit den größten Anbauflächen von 2005 bis 2008. Daten aus GMO Compass (2009).

Die Mais-Linie MON810 gehört zu einem Mais-Kultivar, das ein Protein des Bakteriums *Bacillus thuringiensis* exprimiert („Bt-Mais“). Varianten dieses sogenannten Bt-Toxins schützen die Pflanzen vor spezifischen Fraßschädlingen. Beispielsweise sind die Proteine der in der EU zugelassenen Cry1a-Gruppe toxisch für *Lepidoptera* (Schmetterlinge) während Proteine der Cry3-Gruppe (Zulassung in den USA) spezifisch gegen Käfer wirken. Das Ziel beim Anbau von gv-Mais ist in Europa vor allem der zur Ordnung der Schmetterlinge gehörende europäische Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*); aber auch der aus den USA eingeführte Westliche Maiswurzelbohrer *Diabrotica virgifera* aus der Familie der Blattkäfer verbreitet sich in Europa. Ein gegen den Käfer resistenter Bt-Mais ist in den USA zugelassen und befindet sich in der EU im Zulassungsverfahren (GMO Compass 2009).

Der Erfolg der landwirtschaftlichen Biotechnologie beruht vor allem auf ihrem wirtschaftlichen Nutzen. Auf weniger Ackerfläche können größere Erträge erwirtschaftet werden; ein weiterer Vorteil ist die mögliche Einsparung von Dünger, Herbiziden und Insektiziden, die beim Anbau von gv-Pflanzen die Umweltverträglichkeit von landwirtschaftlichen Produktionen erhöhen kann

(Brookes & Barfoot 2005). Es gibt allerdings Studien, die von einem unveränderten oder sogar erhöhten Herbizid-Einsatz im GVO-Anbau berichten (WHO 2005). Zum Teil verbessert der Einsatz von Biotechnik die Qualität von Lebensmitteln. Beispielsweise weist gv-Mais einen im Vergleich zum konventionell angebauten Mais reduzierten Gehalt an Mykotoxinen auf (Munkvold *et al.* 1999). Das größte Potential der landwirtschaftlichen Biotechnologie liegt wohl in ihrem möglichen Nutzen für die Bekämpfung von Nahrungsmittel-Knappheit in Dritte Welt-Ländern durch die Produktion von Pflanzen mit größeren Erträgen, erhöhtem Nährstoffgehalt sowie Toleranzen gegen Hitze, Wassermangel oder Salz (WHO 2005).

Trotz ihres offensichtlichen Nutzens werden gv-Lebensmittel von einem Großteil der europäischen Verbraucher abgelehnt, wie Umfragen belegen. Nur 21 % der befragten Europäer stehen der „grünen“ Gentechnik positiv gegenüber, während 58 % den Einsatz von GVO ablehnen (Eurobarometer 2009).

Die hauptsächlich diskutierten Bedenken beziehen sich auf mögliche Sicherheitsrisiken, die mit GVO verbunden sein könnten. Diese betreffen einerseits Gesundheitsrisiken durch den Verzehr von gv-Nahrungsmitteln und andererseits Umweltrisiken durch den GVO-Anbau. Zu den theoretischen Gesundheitsrisiken gehören z.B. Allergien oder ein Gentransfer im Gastrointestinaltrakt (WHO 2008). Zu möglichen Umweltrisiken gehören vor allem negative Einflüsse auf das Ökosystem durch Invasivität, vertikalen oder horizontalen Genfluss oder Gefährdung der Biodiversität (WHO 2008; Conner *et al.* 2003). In einer evidenzbasierten GVO-Sicherheitsbewertung der World Health Organization (WHO 2005) wird eine Bewertung der Risiken zusammengefasst: Die auf den globalen Märkten erhältlichen, für die Lebensmittelherstellung verwendeten GVO wurden einer Sicherheitsbewertung unterzogen, und es gibt keine Hinweise darauf, dass sie ein höheres Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen als die zugrunde liegenden konventionellen Lebensmittel. Die möglichen Risiken neuer GVO sollten trotzdem von Fall zu Fall unter Berücksichtigung ihrer speziellen Eigenschaften identifiziert werden. Auch bezüglich potentieller Umweltrisiken, die von der Auskreuzung oder Ausbreitung von GVO ausgehen, sollten mögliche Auswirkungen einzelner GVO untersucht und ein entsprechendes Risikomanagement implementiert werden (WHO 2005).

In Europa wird den Verbrauchern das Recht auf Wahlfreiheit eingeräumt: Durch Information und Kennzeichnung soll es jedem Bürger möglich sein, zwischen konventionellen und gv-Lebensmitteln zu wählen. Bereits seit 1997 sind gv-Lebens- und Futtermittel in der EU im Handel, und die Kennzeichnung von GVO in Lebensmitteln ist vorgeschrieben (EC 2009a). Zurzeit sind 27 GVO für den Handel in der EU zugelassen und dürfen in Lebens- und Futtermitteln enthalten sein (EC 2009b).

Im April 2004 sind in der EU umfassende gesetzliche Regelwerke in Kraft getreten, die die Zulassung und Vermarktung von Lebensmitteln und erstmals auch Futtermitteln regeln, die aus GVO bestehen, diese enthalten oder daraus hergestellt sind (GVO-Lebens- und Futtermittel). Die in den Verordnungen (EG) 1829/2003 (EG 2003a) und (EG) 1830/2003 (EG 2003b) festgelegten Regelungen sollen die transparente Koexistenz und Rückverfolgbarkeit von genetisch veränderten und konventionellen Produkten entlang der Warenkette (*from farm to fork*) sichern. Sie legen unter anderem fest, dass in Lebens- und Futtermitteln enthaltene GVO ein Zulassungsverfahren durchlaufen müssen. Nach erfolgter Marktzulassung müssen die betroffenen Lebens- und Futtermittel gekennzeichnet und in jeder Produktions- und Vermarktungsstufe rückverfolgbar sein. Nur wenn der GVO-Gehalt bezogen auf jede einzelne Zutat nicht größer als 0,9 % und zufällig oder technisch unvermeidbar ist, entfällt die Kennzeichnungspflicht. Für nicht auf dem Europäischen Markt zugelassene GVO gilt die Nulltoleranz, d.h. bereits der Nachweis kleinster Mengen genügt, um das Produkt vom Markt zu entfernen. Lebens- und Futtermittel, die mit einem gv-Hilfsstoff behandelt wurden, der nicht in dem Lebensmittel verbleibt, fallen nicht in den Geltungsbereich der Verordnungen. Produkte, die aus mit gv-Futtermitteln gefütterten Tieren gewonnen wurden, unterliegen ebenfalls nicht der Kennzeichnungspflicht (z.B. Fleisch, Milch, Eier). Hersteller von GVO sind verpflichtet, spezifische Nachweismethoden für ihre Produkte zu entwickeln und zusammen mit geeignetem Referenzmaterial dem CRL-GMFF (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed) zur Verfügung zu stellen.

Für die Kontrolle der korrekten Kennzeichnung und Überwachung der Präsenz nicht zugelassener GVO sind geeignete Nachweissysteme erforderlich, die eine Identifizierung und Quantifizierung von GVO ermöglichen. GVO können prinzipiell anhand der neu integrierten Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz, der daraus geschriebenen Ribonukleinsäure (RNA) oder des resultierenden Merkmals – d.h. eines oder mehrerer Proteine, Metaboliten oder Phänotypen – nachgewiesen werden. In einer Probe kann transgene DNA aus den Genomen von GVO mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Der *event*-spezifische Nachweis, dessen Ziel die Übergangssequenz zwischen Transgen und Wirtsgenom ist, ermöglicht zusätzlich die Identifizierung des zugrunde liegenden GVO. Dadurch kann unter anderem festgestellt werden, ob der betreffende GVO eine Marktzulassung besitzt. Der Nachweis von RNA ist für die praktische GVO-Analyse ungeeignet, da RNA aufgrund ihrer geringen Stabilität bei Lagerung oder Prozessierung des Untersuchungsmaterials schnell abgebaut wird. Die Analyse pflanzlicher Metaboliten (z.B. Fettsäuren) ist aufwendig und teuer. Dagegen erlaubt der Protein-Nachweis eine schnelle und preiswerte Untersuchung von Proben, indem GVO-spezifische Proteine mit Antikörpern nachgewiesen werden. Allerdings sind Protein-Nachweisverfahren wie der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) in der Regel nicht besonders sensitiv und zudem nur wenig informativ, da lediglich Merkmale, nicht aber einzelne *events* unterschieden werden können.

Deshalb ist auf diese Weise keine Differenzierung verschiedener GVO möglich, wenn diese die gleichen oder ähnliche Proteine exprimieren, und es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der nachgewiesene GVO in der EU zugelassenen ist. Außerdem werden Proteine leicht durch Prozessierung denaturiert, und nicht alle GVO produzieren die neuen Proteine in jedem Entwicklungsstadium und in jedem Pflanzenteil.

In Europa hat sich der DNA-Nachweis der Übergangssequenz zwischen Transgen und Wirtsgenom (*event*) mittels PCR als Methode der Wahl für den qualitativen GVO-Nachweis durchgesetzt (Holst-Jensen *et al.* 2003). Quantitative Analysen werden mittels *event*-spezifischer Real-Time PCR durchgeführt. In der Praxis erfolgt häufig zuerst ein Screening: Mittels einer klassischen PCR, seltener einer Protein-Bestimmung, wird untersucht, ob GVO-spezifische Komponenten in einer bestimmten Probe vorhanden sind. Für den DNA-Nachweis geeignete sogenannte GVO-Screening-Elemente sind Promotor- oder Terminator-Sequenzen, die bei nahezu allen GVO für die Transformation verwendet werden. Beispiele sind der aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) stammende 35S-Promotor und der NOS-Terminator aus dem *Agrobacterium tumefaciens*. Da diese Elemente ursprünglich aus natürlich vorkommenden Viren und Bakterien stammen, die häufig im Zusammenhang mit den zu untersuchenden Pflanzen oder in deren Umgebung auftreten, birgt dieses Vorgehen allerdings die Gefahr falsch positiver Ergebnisse (Wolf *et al.* 2000). Fällt das Screening-Ergebnis positiv aus, werden anschließend *event*-spezifische PCRs für die infrage kommenden GVO durchgeführt (EC 2009a, Holst-Jensen *et al.* 2003).

Die Stärken der PCR liegen in ihrer hohen Spezifität und Sensitivität: In der Regel sind etwa 10 Zielmoleküle ausreichend für ein positives Nachweis-Signal; die Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine spezifische Primer-Sequenz mit einer Länge von 20 Basenpaaren ein zweites Mal innerhalb eines Genoms mit einer Größe von etwa 10^9 Basenpaaren mit 100 % Übereinstimmung auftritt, ist sehr gering. Eine Beschränkung der Methode ergibt sich jedoch aus der Notwendigkeit, für jede Probe und jeden GVO-*event* eine separate, individuelle Reaktion durchzuführen. Bei hohem Probenaufkommen verursacht dies einen großen Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand. Wenn eine Probe beispielsweise auf 10 verschiedene *events* getestet werden soll, müssen aufgrund der notwendigen Mehrfachbestimmungen und Kontrollreaktionen mindestens 40 einzelne PCRs pro Probe durchgeführt werden (Co-Extra 2009).

Der gleichzeitige PCR-Nachweis mehrerer GVO in einem Reaktionsansatz (Multiplex-PCR) ist problematisch und bestenfalls auf einige wenige Zielsequenzen begrenzt anwendbar. Wegen der Konkurrenz der verschiedenen PCR-Systeme um die Reaktionskomponenten kommt es häufig zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Amplifikations-Effizienzen. Dies gilt besonders dann, wenn eine der Zielsequenzen in größerer Anzahl vorhanden ist als die restlichen (Walsh *et al.* 1992). Auf

der anderen Seite ist es heute möglich, gleichzeitig bis zu mehrere tausend individuelle DNA-Sequenzen auf einem Mikro- oder Makrochip (Array-Technologie) zu identifizieren^{*}. Insofern kann man die separate, individuelle Amplifikation in der PCR bei umfangreichen Untersuchungen als den „Flaschenhals“ der Analytik bezeichnen, der die Effizienz und Schnelligkeit der GVO-Analyse beschränkt.

Die aktuellen Monitoring- und Überwachungssysteme stoßen bereits heute an ihre Grenzen. Etwa gleichzeitig mit dem Erlass der oben genannten EU-Regelwerke im Jahr 2004 wurde ein seit 1998 wirksames *de facto* Moratorium für die Zulassung von GVO in Europa aufgehoben. Seitdem ist die Anzahl von zugelassenen GVO auf dem Europäischen Markt sprunghaft gestiegen (James 2007) und GVO werden voraussichtlich in Anzahl und Menge weiter zunehmen (James 2008, OECD 2009). Zusätzlich muss die Einfuhr nicht in der EU zugelassener GVO kontrolliert werden. Für die Kennzeichnungskontrolle sind deshalb anpassungsfähige Standardmethoden erforderlich, die einen hohen Probendurchlauf ermöglichen.

Das im Jahr 2005 gestartete EU-Forschungsprojekt Co-Extra (*gm and non-gm supply chains: their co-existence and traceability*) hat das Ziel, angesichts der zu erwartenden Zunahme von GVO in Europa die Koexistenz und Rückverfolgbarkeit von GVO und damit die Wahlfreiheit der Verbraucher zu sichern. Einer der Aufgabenbereiche des Projekts ist es, den technischen Herausforderungen der GVO-Detektion zu begegnen. Die vorliegende Arbeit ist in einen zugehörigen Teilbereich eingegliedert, in dem als mögliche Alternativen zur PCR neue Methoden der Zielsequenz- und Signal-Amplifikation entwickelt werden sollen (Co-Extra 2009).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung neuer methodischer Ansätze für die Analyse genetisch veränderter Organismen (GVO) in Lebens- und Futtermitteln. Die durchgeführten Arbeiten hatten grundsätzlich zwei Schwerpunkte: Einerseits sollte die Methode der *multiple displacement amplification* (MDA) für die Anreicherung von Proben-Material eingesetzt und hinsichtlich ihrer Eignung für die GVO-Analyse beurteilt werden. Diese Untersuchungen werden im ersten Teil der Arbeit vorgestellt (Kapitel 2, Gesamtgenomamplifikation). Das zweite Ziel war die Entwicklung eines spezifischen DNA-Nachweisverfahrens für die GVO-Detektion. Das Verfahren sollte als Alternative zur PCR den parallelen Nachweis mehrerer GVO ermöglichen, ohne dass für die gesuchten Zielsequenzen individuelle Einzelreaktionen wie bei einer PCR durchgeführt werden müssen. Ein mögliches Format der gesuchten Methode war eine direkte Zielsequenz-Detektion durch Hybridisierung von Proben-DNA an Fangsonden im Mikrotiter- oder Array-Format. Die Methodik sollte auf den Ergebnissen des ersten Teils aufbauen, indem die MDA als Grundlage für

^{*} Allerdings ist auch mit Array-Technologien der direkte Nachweis von GVO ohne vorhergehende Amplifikation wegen der erheblichen Größe der pflanzlichen Genome derzeit noch nicht zuverlässig möglich.

die Bereitstellung von Proben-DNA für weitere Analysen genutzt werden sollte. Der zweite Teil der Untersuchungen wird in Kapitel 3, Real-Time Immuno-PCR, beschrieben.

1.2 Literatur

Alle in dieser Arbeit genannten Internetadressen (URLs) wurden am 07.03.2009 auf ihre Gültigkeit überprüft.

Abbott, A. (2009) European disarray on transgenic crops. *Nature News* 946-947, URL: <http://www.nature.com/news/index.html> (2010)

Broll, H. & Zagon, J. (2006) Entwicklung und Validierung von Nachweisverfahren für genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel. BMVEL Forschungsreport; Herausgeber: Senat der Bundesforschungsanstalten im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, URL: <http://www.bmelv-forschung.de> (2010)

Brookes, G. & Barfoot, P. (2006) Global Impact of Biotech Crops: Socio-Economic and Environmental Effects in the First Ten Years of Commercial Use. PG Economics/ISAAA Brief 36

Brookes, G. & Barfoot, P. (2005) GM Crops: The Global Economic and Environmental Impact — The First Nine Years 1996-2004. *Journal of Agrobiotechnology Management and Economics* 8:187-196

Co-Extra (2009) Co-Extra Integrated Project, Online Platform; URL: <http://www.coextra.eu/> (2010)

Conner, A.J., Glare, T.R., Nap, J.P. (2003) The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment *Plant Journal* 33, 19–46

CRL Report (2005) Community Reference Laboratory, Joint Research Center of the European Commission. Sampling and DNA extraction of maize DAS 59122 – Report from the Validation of the “CTAB/Wizard” method for DNA extraction from ground maize grain/seed; URL: http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/59122_DNAExtr_sampl.pdf (2010)

EC (2009a) Development and harmonisation of GMO detection methods and sampling procedures – Overview of EU activities. JRC, IHCP; URL: <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/> (2010)

EC (2009b) Community register of genetically modified food and feed, URL: http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm (2010)

EG (2001) Richtlinie 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates (Richtlinie der Europäischen Kommission und des Rates vom 12.03.2001)

EG (2003a) Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel

EG (2003b) Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG

GMO Compass (2009) GMO Compass Website; URL: <http://www.gmo-compass.org/eng/home/> (16.04.2009)

Eurobarometer (2009) Special Eurobarometer 295, Attitude of European Citizens about the Environment, EC Public Opinion Website; URL: http://ec.europa.eu/public_opinion/index_en.htm (05.03.2010)

- Holst-Jensen, A., Ronning, S.B., Lovseth, A. & Berdal, K.G. (2003) PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375:985-993
- James, C. (2007) ISAAA Briefs No. 35-2006: Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops: 2006
- James, C. (2008) ISAAA Briefs No. 37-2007: Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops: 2007
- Munkvold, G.P., Hellmich, R.L. & Rice, L.G. (1999) Comparison of Fumonisin Concentrations in Kernels of Transgenic Bt Maize Hybrids and Non-Transgenic Hybrids. *Plant Disease* 83:130-138
- OECD (2009) Organisation for Economic Co-operation and Development: Biotrack Online Database 2009; URL: <http://www2.oecd.org/biotech/> (2010)
- Walsh, P.S., Erlich, H.A. & Higuchi, R. (1992) Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *Genome Research* 1 (4):241-250
- WHO (2005) Modern Food Biotechnology, Human Health and Development: An Evidence-Based Study. World Health Organization, Food Safety Department; URL: <http://www.who.int/en/> (2010)
- Wolf, C., Scherzinger, M. Wurz, A., Pauli, U., Hübner, P. & Lüthy, J. (2000) Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *European Food Research and Technology* 210 (5):367-372

2 Gesamtgenomamplifikation

2.1 Hintergrund

2.1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen Strategie für den Nachweis von GVO in Lebensmitteln und Futtermitteln. Als Alternative zur PCR sollte der parallele Nachweis mehrerer GVO ohne die Durchführung individueller Einzelreaktionen ermöglicht werden. Ein möglicher Lösungsweg war der Einsatz von immobilisierten Fangsonden für eine direkte Detektion von Zielsequenzen in der Proben-DNA ohne eine vorherige PCR-Amplifikation.

Für den GVO-Nachweis relevante DNA-Sequenzen liegen in der Regel als einfache Kopie im haploiden Genom vor. Ein direkter Nachweis solcher Einzelkopie-Gene (*single copy genes*) ist in kleineren, z.B. bakteriellen Genomen in der Größenordnung von etwa 10^6 Basenpaaren (bp) gut durchführbar. Dagegen bringt die Komplexität der meisten pflanzlichen Genome Probleme mit sich: Für den Versuch, ein Einzelkopie-Gen durch direkte Hybridisierung ohne eine vorherige Zielsequenz-Amplifikation in einem Genom der Größenordnung von 10^9 bp nachzuweisen, wird 1000mal mehr genomische Proben-DNA benötigt als im Fall der bakteriellen DNA. Beispielsweise müssen für eine klassische Southern Blot-Hybridisierung etwa 5-20 μg gDNA eingesetzt werden, um eine Einzelkopie-Detektion in humaner gDNA zu erreichen (Roche Applied Science 2009).

Für ein Nachweisverfahren auf der Basis einer parallelen Hybridisierung von Proben-DNA mit verschiedenen Fangsonden wäre möglicherweise – je nach Detektionsformat – sogar mehr DNA erforderlich. Die Extraktion ausreichend großer gDNA-Mengen aus biologischem Proben-Material für die Entwicklung und Durchführung einer solchen Methode wäre sehr aufwendig. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob durch eine Anreicherung von Proben-DNA genügend Material für die GVO-Analyse bereitgestellt werden kann.

Zusätzlich erfordert auch die derzeit für den GVO-Nachweis angewandte Analytik zum Teil große Mengen Proben-DNA. Die Untersuchung unbekannter Proben auf das Vorhandensein verschiedener GVO-*events* mittels PCR kann aufgrund der notwendigen Mehrfachbestimmungen mehrere Mikrogramm Proben-DNA verbrauchen (Co-Extra 2008).

Desweiteren werden für die Validierung neuer PCR-Systeme, z.B. gemäß ISO 17025 (ISO 2005a), sowie für die Routineanalytik große Mengen Referenzmaterial benötigt, das die gesuchte Zielsequenz des entsprechenden GVO enthält und als Positivkontrolle dient. Die Verfügbarkeit geeigneten Referenzmaterials ist häufig limitiert (Co-Extra 2008). Zertifiziertes Referenzmaterial des IRMM (Institute for Reference Material and Measurements, Geel/Belgien) ist am sichersten bezüglich der Art und der Menge des enthaltenen GVO. Allerdings ist es kostenintensiv und nicht

für alle GVO-*events* verfügbar. Eine Labor-interne Produktion ausreichender Mengen Referenz-DNA durch Isolierung von gDNA aus Pflanzenmaterial oder Lebens- und Futtermitteln ist zeitaufwendig und benötigt viele Aufarbeitungsschritte. Die Beschaffenheit und Reinheit der resultierenden DNA kann stark variieren und zu Abweichungen der Analyse-Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien führen (Cankar *et al* 2006). Zusätzlich kann beim Auftreten nicht zugelassener GVO auf dem Europäischen Markt ein plötzlicher Bedarf an Referenzmaterial für Lebensmittelkontrollen entstehen, der nicht rechtzeitig durch eine kommerzielle Produktion gedeckt werden kann. Beispiele für nicht zugelassene GVO, die in die EU eingeführt wurden, sind die E-55 SunUp-Papaya (Busch *et al.* 2004) und der LL601-Reis (RASFF 2006).

Mit der Technik der *multiple displacement amplification* (MDA) kann die gesamte in einer Probe enthaltene DNA vervielfältigt werden. Daher schien sie geeignet zu sein, um große Mengen Proben-DNA für die Entwicklung einer alternativen GVO-Nachweismethode bereitzustellen. Als zusätzliches Potential der MDA erschien ihre mögliche Eignung als Mittel für die Anreicherung limitierter Proben-DNA für GVO-Analysen sowie für die Herstellung von Referenzmaterial.

Das erste Teilziel dieser Arbeit war die Beurteilung der mit der MDA-Technik amplifizierten DNA (mdaDNA) hinsichtlich ihrer Eignung für die oben genannten Anwendungen. GVO-DNA sollte mit der MDA vervielfältigt und die resultierende mdaDNA analysiert werden. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Quantifizierung von Ausbeute und Amplifikationsrate der MDA. Vor dem Hintergrund der oftmals limitierten Verfügbarkeit von GVO-Referenzmaterial bestand ein Interesse daran, möglichst wenig Ausgangs-DNA in der MDA einzusetzen. Es galt zu klären, ob die Menge der eingesetzten gDNA einen Einfluss auf die Höhe der mdaDNA-Ausbeute hat. Da die mdaDNA für eine mögliche Verwendung in Hybridisierungsversuchen biotinyliert werden muss, sollte außerdem getestet werden, ob eine Biotin-Markierung der mdaDNA die Amplifikationsrate beeinflusst. Ein weiteres Untersuchungsziel war die Beurteilung der DNA-Qualität. Es sollte geprüft werden, wie die mdaDNA zusammengesetzt ist und ob sich ihre Zusammensetzung mit sinkender Menge eingesetzter gDNA ändert. Schließlich war zu prüfen, ob die mdaDNA sich für den Einsatz in der GVO-Analyse eignet. Dazu sollte einerseits das Verhalten der mdaDNA in der Real-Time PCR-Analyse mit dem der Ausgangs-DNA verglichen werden. Andererseits war zu untersuchen, ob die MDA die gDNA gleichmäßig über das Genom vervielfältigt oder ob sie möglicherweise zu einer Unter- oder Überrepräsentation von Genomabschnitten führt.

2.1.2 Prinzip der Multiple Displacement Amplification

Die *multiple (strand) displacement amplification* (MDA, dt. “Vielfache Strangverdrängungsreaktion“) ist eine Methode der Gesamtgenomamplifikation (*whole genome amplification*, WGA). Das Funktionsprinzip der Methode beruht auf der Anlagerung sechsbasiger Zufallsprimer (Hexamer-Primer) an eine DNA-Matrize mit anschließender Polymerisierung durch eine spezielle DNA-

Polymerase (Blanco *et al.* 1989). Das Enzym entstammt dem Bakteriophagen $\phi 29$ und wurde ursprünglich für die Replikation zirkulärer DNA eingesetzt (Lizardi *et al.* 1998). Die $\phi 29$ -DNA-Polymerase weist eine Strangverdrängungsaktivität auf, die durch die Generierung von Einzelsträngen während der Polymerisierung eine fortlaufende, isotherme Vervielfältigung der Proben-DNA ermöglicht. Abbildung 2-1 stellt schematisch den Reaktionsablauf der MDA dar: Nach einer initialen thermischen Denaturierung binden die Hexamer-Primer an die DNA und werden von der $\phi 29$ -DNA-Polymerase zu einem komplementären Strang verlängert; trifft das Enzym auf einen doppelsträngigen DNA-Abschnitt, wird durch Strangverdrängung ein Einzelstrang generiert; an entstandene Einzelstränge binden erneut Hexamere, und die Polymerisation setzt sich fort.

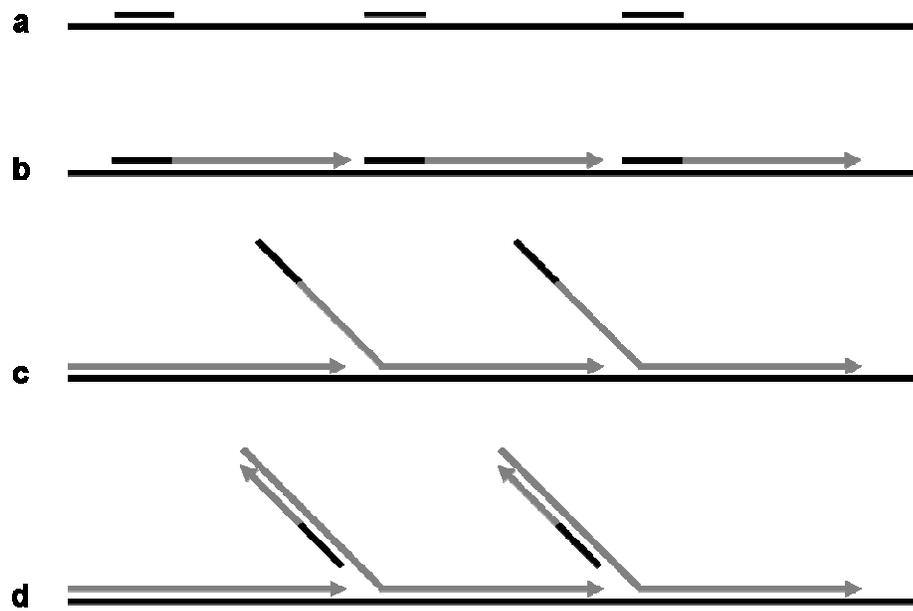


Abbildung 2-1 Funktionsprinzip der MDA. Random-Hexamere binden an die denaturierte DNA (a) und werden durch die $\phi 29$ -DNA-Polymerase polymerisiert (b). Durch die Strangverdrängungsaktivität des Enzyms werden Einzelstränge generiert (c), an die weitere Primer binden können und erneut polymerisiert werden (d).

Dean *et al.* (2002) stellten erstmals fest, dass die $\phi 29$ -DNA-Polymerase überraschenderweise auch komplexe lineare DNA wie das Humangenom umfassend amplifiziert. Während bei PCR-basierten WGA-Techniken wie der *primer extension pre-amplification* PCR (PEP-PCR) oder *degenerate oligonucleotide primed* PCR (DOP-PCR) Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe unter 1 Kilobasenpaar (kbp) erzeugt werden, liegt die mittlere Fragmentlänge der MDA-Produkte bei über 10 kbp (Dean *et al.* 2002). Wegen der hohen Prozessivität der $\phi 29$ -DNA-Polymerase entsteht bei ausreichend langen Inkubationszeiten sogar DNA mit Fragmentgrößen über 70 kbp (Blanco *et al.* 1989). Die hochmolekularen Produkte der MDA sind daher auch für Anwendungen geeignet, für die lange DNA-Fragmente benötigt werden, wie z.B. RFLP (*restriction fragment length poly-*

morphism)-Analysen (Dean *et al.* 2002). Die hohe Prozessivität der $\phi 29$ -DNA-Polymerase ermöglicht es, aus kleinen Mengen genomischer DNA (z.B. 10 ng) in einer Übernachtreaktion DNA-Mengen im Mikrogramm-Bereich zu gewinnen.

Eine weitere Eigenschaft der $\phi 29$ -DNA-Polymerase ist ihre 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Diese so genannte *proofreading activity* resultiert in deutlich niedrigeren Fehlerraten von etwa 10^{-5} bis 10^{-6} , verglichen mit einer Fehlerrate der *Taq*-Polymerase in der PCR von etwa 10^{-3} (Luthra *et al.* 2004, Blanco *et al.* 1996).

Bei WGA-Techniken kommt es häufig zu einer ungleichmäßigen Vervielfältigung der in der Proben-DNA vorhandenen DNA-Sequenzen. Die Unter- oder Überrepräsentation von Zielsequenzen kann die Eignung der amplifizierten DNA für weitere Analysen beeinträchtigen. Dieses Problem ist vor allem bei auf der PCR basierenden WGA-Methoden bekannt. Dean *et al.* (2002) haben deshalb die Genrepräsentation humaner genomischer DNA nach der Amplifikation mittels PEP-PCR, DOP-PCR und MDA verglichen. Während bei den beiden PCR-basierten WGA-Techniken eine 10^2 - bis 10^6 fache Über- oder Unterrepräsentation einzelner Genloki beobachtet wurde, war die Vervielfältigung mittels MDA mit unter 3fachen Abweichungen sehr gleichmäßig. Eine ausgeglichene Amplifikation der untersuchten Genomabschnitte mit Abweichungen im gleichen Größenbereich wurde auch von anderen Anwendern beobachtet (Hosono *et al.* 2003, Lasken & Egholm 2003 & Lovmar *et al.* 2003). Begründet ist dies vermutlich in der hohen Prozessivität des Enzyms: jede Anlagerung der Polymerase wird über viele Katalysezyklen und eine lange Distanz des Genoms beibehalten; dadurch ist die Anzahl der erneuten Anlagerungen geringer als bei PCR-basierten WGA-Methoden (Lage *et al.* 2003).

2.1.3 Anwendungen der Multiple Displacement Amplification

Die MDA bietet sich als Hilfsmittel für die Amplifikation von DNA aus verschiedenen Quellen an. In der Literatur ist der Einsatz der MDA für die Amplifikation von DNA aus verschiedenen biologischen Probenmaterialien dokumentiert. Die MDA wurde für die Vervielfachung humaner (z.B. Dean *et al.* 2002, Hosono *et al.* 2003, Luthra & Medeiros 2004, Lee *et al.* 2006), caniner (Short *et al.* 2005), pflanzlicher (Adachi *et al.* 2004) und bakterieller (Vora *et al.* 2004) DNA verwendet. Neben der Amplifikation aufgereinigter DNA ermöglicht die MDA auch den direkten Einsatz von Proben-Material wie Vollblut oder Wangenschleimhautzellen (Hosono *et al.* 2003) und Insekten-gewebe (Gorrochotegui-Escalante & Black IV 2003).

Mittels MDA hergestellte DNA ist bereits für Untersuchungen mit diversen Analyse-Techniken in vielen Anwendungsbereichen eingesetzt worden. Zu den in der Literatur beschriebenen Techniken, mit denen mdaDNA untersucht wurde, gehören Real-Time PCR- (z.B. Bergen *et al.* 2005b, Hosono *et al.* 2003), SNP- (*single nucleotid polymorphism*; z.B. Lovmar *et al.* 2003, Bergen *et al.* 2005a)

STR- (*short tandem repeat*; z.B. Bergen *et al.* 2005, Lee *et al.* 2006) und Microarray-Analysen (Vora *et al.* 2004).

Anwendungsgebiete der MDA beinhalten unter anderem die Tumorforschung und -diagnostik (z.B. Maragh *et al.* 2008), Genotypisierung (z.B. Bergen *et al.* 2005a) und Präimplantationsdiagnostik (z.B. Hellani *et al.* 2005). In der Umweltforschung wurde die MDA unter anderem dazu verwendet, Proben-DNA von enthaltenen PCR-Inhibitoren zu befreien (z.B. Gonzalez *et al.* 2005). In epidemiologischen Studien wird die MDA genutzt, um umfangreichere Analysen mit den DNA-Proben von Studienprobanden durchführen zu können (Tranah *et al.* 2003). Die Amplifikation kleinster DNA-Mengen ermöglicht außerdem den Einsatz der MDA in der Forensik (Sorensen *et al.* 2004) und für *single-cell*-Analysen (Spits *et al.* 2006). So konnte beispielsweise die Duchenne-Muskeldystrophie aus einzelnen fetalen Zellen nachgewiesen werden, die aus dem Blut der schwangeren Mutter gewonnen wurden (Ren *et al.* 2009).

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Für die Aufarbeitung von DNA aus Mais-Materialien wurde die CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Extraktionsmethode nach LMBG (2002) in modifizierter Form oder das *DNeasy Plant Mini Kit* verwendet. Saatgut wurde vor der Extraktion mit einer Schwingmühle (*TissueLyser*) zerkleinert und homogenisiert. Anschließend wurden je 100 mg Probe in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen.

2.2.1.1 CTAB-Extraktion

Bei der CTAB-Methode erfolgte die Lyse mit 500 µl CTAB-Extraktionspuffer und 10 µl RNase (40 mg/ml) für 10 min bei 65 °C unter Schütteln. Um eine Inaktivierung der RNase zu vermeiden, wurde erst nach diesem ersten Schritt 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und der Verdau wurde für 90 min bei 65 °C fortgesetzt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 14.500 g wurde die wässrige Phase (Überstand) mit 200 µl *Ready Red*-Fertiglösung versetzt, 30 sek gevortext und anschließend mindestens 10 min bei 21.000 g zur Phasentrennung zentrifugiert. Nach der Extraktion wurde der Überstand zur Fällung der Nukleinsäuren mit zwei Volumenteilen CTAB-Präzipitationslösung versetzt und bei Raumtemperatur für 60 min unter Schütteln inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 12.000 g für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat in 350 µl 1,2 M NaCl-Lösung gelöst, nach Zugabe von 350 µl *Ready Red* 30 sek gevortext und dann bei 12.000 g 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 0,6 Volumenteilen Isopropanol versetzt und mindestens für 30 min oder über Nacht bei 4 °C gekühlt. Es folgten 30 min Zentrifugation bei 14.500 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 %igem (v/v)

Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet in der Vakuumzentrifuge ca. 3 min getrocknet und anschließend in 50 µl *A. purif.* gelöst.

2.2.1.2 DNeasy Plant Mini Kit

Ein Teil der durchgeführten DNA-Extraktionen erfolgte mit dem *DNeasy Plant Mini Kit* nach den Angaben des Herstellers (QIAGEN 2009). Auch bei dieser Methode beinhaltet die Lyse einen RNase- und Proteinase K-Verdau. Für die Homogenisierung des Proben-Materials werden zuerst Proteine und Polysaccharide ausgefällt und durch Zentrifugation in einer *QIAshredder*-Säule zurückgehalten. Der die DNA enthaltende Durchfluss wird dann unter hoher Konzentration eines chaotropen Salzes an eine Membran aus Silikagel gebunden, durch mehrere Waschschriffe von restlichen Protein-, Polysaccharid- und Salzanteilen befreit und anschließend mit einem Puffer geringen Salzgehaltes eluiert.

2.2.2 DNA-Reinigung

Die DNA wurde vor einigen Anwendungen gereinigt, um überschüssige Salze, Proteine, ionische Detergenzien oder Alkohol zu entfernen.

2.2.2.1 Phenol/Chloroform-Reinigung

Die zu reinigende DNA-Probe, beispielsweise genomische DNA oder biotinylierte mdaDNA, wurde in einem 0,5 ml oder 1,5 ml Reaktionsgefäß durch Zugabe von *A. purif.* auf ein Volumen von mindestens 200 µl aufgefüllt und dann 1:1 mit einer Lösung aus gleichen Teilen Phenol und *Ready Red* gemischt. Diese entspricht einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung von 25:24:1. Nach 30 sek Vortexen wurden die Phasen durch Zentrifugation für 2 min bei 20.000 g getrennt. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die verbleibende organische Phase erneut mit einem Volumen Wasser versetzt, gevortext und zentrifugiert wie zuvor. Die obere Phase wurde wiederum abgenommen und die beiden wässrigen Phasen wurden gemischt. Anschließend erfolgte eine Ethanol-Präzipitation zur Fällung der DNA.

2.2.2.2 Ethanol-Präzipitation

Eine Ethanol-Fällung wurde entweder in Folge der Phenol/Chloroform-Aufreinigung von DNA oder unabhängig von dieser, z.B. zur Reinigung von DNA-Proben von freien Nucleotiden durchgeführt. Für die Fällung von DNA in wässriger Lösung ist die Gegenwart monovalenter Kationen notwendig, damit nach dem Entfernen der Hydrathülle der DNA durch den Alkohol die Abstoßungskräfte der exponierten Phosphatgruppen neutralisiert werden können, sodass sich ein Präzipitat formen kann (Sambrook & Russell 2001). Für diesen Zweck wurde entweder Natriumacetat oder, um speziell die Kopräzipitation von Desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) zu ver-

hindern, Ammoniumacetat eingesetzt. Die zu reinigende DNA-Lösung wurde mit dem 3fachen ihres Volumens an absolutem Ethanol, enthaltend 0,3 M Natrium- oder Ammoniumacetat, versetzt, für 10 min bei -20 °C gekühlt und dann mit 20.000 g bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit mindestens 500 µl 70 %igem Ethanol unter Vortexen kurz gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation für 15 min bei 20.000 g und 4 °C wurde der Überstand erneut verworfen, das Pellet etwa 3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in *A. purif.* resuspendiert.

2.2.2.3 Säulenreinigung

Die Reinigung von DNA mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers (QIAGEN 2009) vorgenommen. Durch die selektive und reversible Bindung der DNA an eine Silicagel-Membran bei hohen Salzkonzentrationen und definiertem pH-Wert werden Primerreste, ungebundene Nukleotide, Proteine und Salze entfernt. Zu 100 µl Probe wurden 500 µl Adsorptionspuffer PB auf eine *QIAquick Spin*-Säule gegeben und nach der Adsorption mit 750 µl Waschpuffer PE gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl *A. purif.*

2.2.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

2.2.3.1 Spektrophotometrie

Die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe des NanoDrop Spektrophotometers. Das Gerät misst die Absorption (A) der Lösung bei verschiedenen Wellenlängen. Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Sowohl doppelsträngige (ds) als auch einzelsträngige (ss) DNA und RNA werden durch die Messung detektiert. Anhand der Absorption bei 260 nm (A_{260}) kann die Nucleinsäure-Konzentration berechnet werden. Für dsDNA entspricht eine A_{260} -Einheit von 1,0 OD einer Konzentration von 50 ng/µl (ssDNA: 33 ng/µl). Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm; die Reinheit der Nucleinsäure wurde daher durch den Quotienten der 260 nm/280 nm-Werte bestimmt, wobei dieses Verhältnis bei reinen Nucleinsäurelösungen einen Wert von mehr als 1,8 erreichen sollte. Für die Messungen wurde 1 µl DNA-Lösung direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und Konzentrationen wurden direkt auf dem Bildschirm des Geräte-Computers dargestellt.

2.2.3.2 Fluorometrie

Die fluorometrische Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf einer Änderung der sterischen Konformation des Fluoreszenz-Farbstoffs Bisbenzimid nach seiner Einlagerung in die Schleifen der DNA-Doppelhelix. Die resultierenden Verschiebungen der Extinktions- und Emissions-

maxima werden von einem Photodetektor aufgezeichnet. Aufgrund des Messprinzips wird nur die doppelsträngige DNA in einer Probe detektiert. Vor jeder Messreihe wurde das verwendete *DynA Quant*-Gerät nach den Angaben des Herstellers mit einer DNA-Standard-Lösung mit 100 ng/μl Kalbsthymus-DNA kalibriert. Die Konzentration der Standard-Lösung wurde vor jeder Kalibrierung spektrophotometrisch überprüft, um die Vergleichbarkeit der spektrophotometrischen und fluorometrischen Messungen zu gewährleisten. Jeweils 2 μl Standard- oder Proben-Lösung wurden in einer Quarz-Küvette mit 2 ml Bisbenzimid-Lösung vermischt. Die Messungen wurden mindestens als Zweifach-Bestimmungen durchgeführt.

2.2.3.3 Berechnung der *mdaDNA*-Zusammensetzung

Der Anteil dsDNA an der gesamten nach der MDA vorhandenen DNA wurde fluorometrisch bestimmt. Der Gehalt an ssDNA wurde unter Berücksichtigung der fluorometrischen und spektrophotometrischen Messungen ermittelt wie von Bergen *et al.* (2005a) beschrieben: Basierend auf dem fluorometrisch gemessenen dsDNA-Gehalt wurde die zu erwartende A_{260} -Absorption für dsDNA unter Voraussetzung von 50 ng dsDNA/μl pro 1,0 OD errechnet. Anschließend wurde für jede Probe dieser errechnete, zu erwartende A_{260} -Wert von der tatsächlich bei 260 nm Wellenlänge gemessenen Absorption subtrahiert. Aus der Differenz wurde der vorhandene Gehalt an ssDNA unter Annahme von 33 ng ssDNA/μl pro 1,0 OD errechnet. Die Summe aus dem Gehalt an ds- und ssDNA ergibt die Menge der Gesamtausbeute (gesDNA).

2.2.4 Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach getrennt werden. Die Fragmentlänge wird durch einen Vergleich mit DNA-Molekülen bekannter Größe (Längensstandards, Marker) bestimmt. Außerdem kann eine Abschätzung der DNA-Menge mit Hilfe bestimmter Längensstandards aus geschnittener genomischer DNA erfolgen, deren Banden in äquimolaren Mengen vorliegen. Eine weitere Anwendung der Gelelektrophorese ist die Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten in einem präparativen Gel.

Bei der Herstellung von Agarose-Gelen werden lange Fäden aus Agarose-Polymeren zu einem Gel vernetzt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix. Die Laufgeschwindigkeit der Moleküle ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Fragmentlänge (Sambrook & Russell 2001) und sinkt mit zunehmendem Vernetzungsgrad der Agarose. Die DNA wird im Gel durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und fluoresziert im UV-Licht.

Je nach Anwendung wurden 0,7 bis 2 % (*m/v*) Agarose in TBE-Puffer eingewogen, durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und in einen Gelträger (Gelschlitten) gegossen. Mithilfe von Kämmen wurden Geltaschen erzeugt. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde die Gelelektro-

phorese in einer mit 0,5x TBE-Puffer und einer geringen Menge Ethidiumbromid-Lösung (ca. 50 µl pro 2 l Puffer) befüllten Elektrophoresekammer durchgeführt. Die DNA-Lösungen und die DNA-Längenstandards wurden mit 1/5 Volumenteil Gel-Ladepuffer – je nach erwarteter Fragmentgröße mit Bromphenolblau oder Xylencyanol – versetzt. Abhängig von Anwendung und Taschengröße wurden anschließend 10 bis 50 µl Probenlösung in die Geltaschen pipettiert. Eine Spannung von 10-20 V/cm Gel wurde für 20-60 min angelegt. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA mittels UV-Licht und die Dokumentation der Ergebnisse mit einer digitalen Kamera erfolgten mit einem Gel-Dokumentationssystem.

2.2.5 Gesamtgenomamplifikation

2.2.5.1 Multiple Displacement Amplification

Genomische DNA wurde mit dem *GenomiPhi Amplification Kit* nach den Angaben des Herstellers (GE Healthcare 2007) amplifiziert. Die grundsätzliche Durchführung ist in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt. Alle Kit-Reagenzien wurden nach dem Auftauen auf Eis gekühlt. In einem sterilen 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden 9 µl des Proben-Puffers vorgelegt und mit 1 µl DNA-Lösung versetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurden jeweils 50 ng genomische DNA pro Reaktion eingesetzt. Zur initialen Denaturierung der DNA wurde der Ansatz im Thermocycler für 3 min bei 95 °C erhitzt und sofort im Eisbad gekühlt. Ein *Mastermix* mit 9 µl Reaktionspuffer und 1 µl Enzym-Lösung pro Ansatz wurde auf Eis hergestellt. Nach Zugabe des *Mastermixes* zu den Reaktionsansätzen wurden diese im Thermocycler bei 30 °C für 16 h inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Inaktivierung der $\phi 29$ -DNA-Polymerase bei 65 °C. Anschließend kühlte der Thermocycler die Proben bei 4 °C. Wenn nicht anders vermerkt, wurde ein aus dem oben beschriebenen Reaktionsansatz resultierendes Standard-Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet. Es wurde immer eine Leerkontrolle (mdaNTC), bei der anstelle von DNA 1 µl *A. purif.* in der Reaktion eingesetzt wurde, und zum Teil eine Positivkontrolle in Form der im Kit enthaltenen λ -Kontroll-DNA mitgeführt. Vor dem Einsatz der amplifizierten DNA (mdaDNA) für weitere Analysen wurde jede Probe mit 1 Volumenteil *A. purif.* verdünnt, um die Viskosität der Lösung zu verringern und ein präzises Pipettieren zu gewährleisten. Die mdaDNA wurde bei -20 °C gelagert.

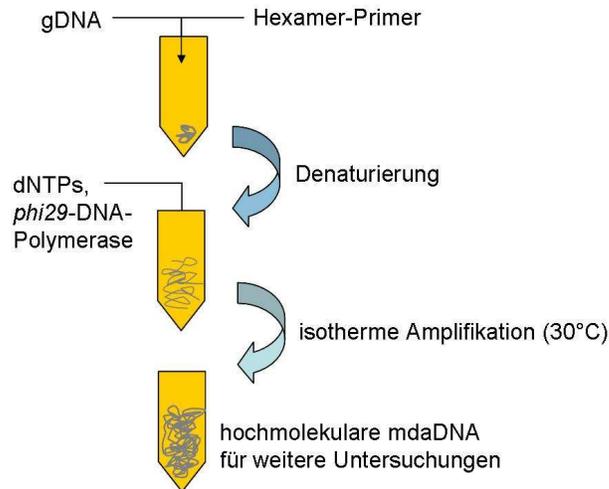


Abbildung 2-2 Praktische Durchführung der MDA. Eine kleine Menge gDNA wird unter Zugabe von Zufalls-Primern denaturiert. Nach Hinzufügen von ϕ 29-DNA-Polymerase und Nucleotiden wird über Nacht bei 30 °C hochmolekulare DNA generiert

2.2.5.2 Klenow-Amplifikation

Die Klenow-Amplifikation ist ein Verfahren für die sogenannte *random priming*-Markierung von DNA mit radioaktiv oder nicht-radioaktiv modifizierten Nucleotiden, das von Feinberg & Vogelstein (1983) entwickelt wurde. Bei der Klenow-Markierung wird die doppelsträngige Proben-DNA denaturiert und mit Zufallsprimern hybridisiert, die dann als Primer für das aus der großen Unter-einheit der DNA-Polymerase I gewonnene Klenow-Enzym (Klenow-Fragment) dienen. Das Enzym synthetisiert die zur Proben-DNA komplementären DNA-Stränge unter Inkorporierung der markierten Nucleotide. Durch gleichmäßiges Priming der Zufallsprimer über die gesamte Genom-länge führt die Klenow-Markierung zu einer Amplifikation des ganzen Genoms. Nach der Markierungsreaktion liegt die DNA in Fragmenten mit einer Länge von etwa 500 bp vor. Klenow-Amplifikationen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dem *High Prime DNA Labeling Kit* nach den Angaben des Herstellers (Roche Applied Science 2009) durchgeführt. Je Reaktionsansatz wurden 10 ng bis 3 μ g genomische oder mdaDNA auf ein Gesamtvolumen von 12 μ l mit *A. purif.* auf-gefüllt, im Thermocycler bei 95 °C für 10 min denaturiert und anschließend sofort im Eisbad gekühlt. Danach wurden auf Eis 4 μ l *High Prime Reaction Mix* und 4 μ l dNTP-Mix zur DNA gegeben. Letzterer enthielt eine 1 mM dATP, dCTP und dGTP, 0,65 mM dTTP und 0,35 mM Biotin-dUTP-Mischung. Die Ansätze wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und 16 Stunden (h) bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Es folgten eine Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min und Kühlung bei 4 °C.

2.2.6 Real-Time PCR

2.2.6.1 Funktionsprinzip

Die Real-Time PCR basiert auf dem gleichen Prinzip wie die klassische PCR (Mullis & Faloona 1987). Mit der Polymerasekettenreaktion kann DNA *in vitro* enzymatisch vervielfältigt werden. Der Ausdruck Kettenreaktion beschreibt den Umstand, dass im Laufe sich wiederholender Temperaturzyklen die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für die folgenden Zyklen dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet. Als Ausgangspunkte der Vervielfältigung dienen kurze Oligonukleotide, deren Basensequenzen zu ausgewählten Abschnitten der Ausgangs-DNA (DNA-Matritze) revers-komplementär sind. Diese Startermoleküle (Primer) binden sequenzspezifisch an durch Hitzedenaturierung erzeugte Einzelstränge der DNA-Matritze (Annealing) und werden mithilfe der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase polymerisiert (Elongation). Die Hybridisierung der Primer erfolgt bei einer für die jeweilige Primer-Sequenz optimierten Temperatur von etwa 50-70 °C. Die Elongation der Primer (*sense* und *antisense*) von ihrem 3'-Ende aus erfolgt bei der klassischen PCR meistens bei einer Temperatur von ca. 72 °C.

Während bei der klassischen PCR die Sichtbarmachung der amplifizierten DNA-Sequenz in der Regel über eine gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung des PCR-Produktes erfolgt, bedient sich die Real-Time PCR fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden für die Visualisierung und Identifikation der Amplifikate während der PCR. Bei der für diese Arbeit verwendeten Technologie binden sogenannte *TaqMan*-Sonden sequenzspezifisch an das amplifizierte PCR-Produkt (Livak *et al.* 1995). Die Sonden enthalten am 5'-Ende eine Fluoreszenz-Markierung (Reporter), die das von einem Laser eingestrahlte Licht absorbiert und es mit einer längeren Wellenlänge emittiert. Die am 3'-Ende platzierte Fluoreszenz-Markierung (Quencher) absorbiert diese Strahlung, wenn sie in räumlicher Nähe zu dem Reporter liegt. Daher wird keine Strahlung detektiert, solange die Sonde als Ganzes erhalten bleibt. Erst bei der Elongation wird durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde verdrängt und dadurch der Reporter-Farbstoff durch Nukleotid-Abspaltung freigesetzt. Um die Hybridisierung der Sonde nicht zu destabilisieren, wird eine niedrige Extensionstemperatur von etwa 60 °C verwendet. Daher ist oft nur eine „2-Schritt“-PCR notwendig, in der Annealing und Elongation bei der gleichen Temperatur durchgeführt werden.

In jedem PCR-Zyklus misst das Real-Time PCR-Gerät mit einer Kamera die Menge freien Fluoreszenzfarbstoffes in der Reaktionslösung, die mit fortschreitender Vervielfältigung der DNA zunimmt. In den ersten Zyklen (ca. 3 - 15) wird anhand der Hintergrundfluoreszenz ein Schwellenwert (Threshold) berechnet, bei dessen Überschreitung durch das Fluoreszenzsignal dieser Zeitpunkt (Zyklus) als *threshold cycle* (C_T) des entsprechenden Reaktionsansatzes definiert wird. Durch Auswertung der in der exponentiellen Amplifikationsphase gemessenen C_T -Werte lässt sich die Startkopienzahl der untersuchten DNA-Sequenz quantifizieren. Je mehr DNA am Beginn der

Reaktion vorhanden ist, desto niedriger ist der zu erwartende C_T -Wert. Bei einem mit 100 %iger Effizienz amplifizierenden PCR-System nimmt der C_T -Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus ab. Für eine absolute Quantifizierung der Startkopienzahl mit der Standardkurven-Methode wird parallel zur Proben-DNA ein DNA-Standard als Verdünnungsreihe in der Real-Time PCR eingesetzt. Durch lineare Regression der resultierenden Standardkurve lässt sich die Startkopienzahl ermitteln.

2.2.6.2 Durchführung

Alle für die Untersuchung der mdaDNA eingesetzten *TaqMan*-Analysen wurden mit dem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* nach den Angaben des Herstellers (ABI 2009) durchgeführt. Für die *TaqMan*-Reaktionen wurde der Eurogentec *qPCR MasterMix Plus*-Reaktionspuffer verwendet. Der Reaktionspuffer enthält bereits $MgCl_2$, dNTPs, *Taq*-DNA-Polymerase (*HotGoldStar Taq*) und den Referenzfarbstoff ROX. Die Konzentrationen der im Reaktionspuffer enthaltenen Substanzen werden vom Hersteller nicht genannt, mit Ausnahme der $MgCl_2$ -Konzentration. Der Reaktionspuffer, die Primer (*sense* und *antisense*) und die *TaqMan*-Sonde wurden für die Herstellung eines *Mastermixes* jeweils in den in Tabelle 2-1 angegebenen Mengen und Endkonzentrationen eingesetzt.

Tabelle 2-1 Zusammensetzung der *TaqMan*-Reaktionen für die Real-Time PCR.

Substanz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen pro Ansatz ^a (μ l)
Reaktionspuffer	2x	1x	12,5
inkl. $MgCl_2$	10 mM	5 mM	
Primer <i>sense</i>	20 μ M	300 nM	0,375
Primer <i>antisense</i>	20 μ M	300 nM	0,375
Sonde	20 μ M	200 nM	0,25
DNA			1-5
<i>A. purif.</i>			ad 25

^a Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung eines *Mastermixes* für Reaktionsansätze mit einem Volumen von 25 μ l.

Alle *TaqMan*-Sonden waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM (Reporter) und am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (Quencher) markiert. Verschiedene Konzentrationen gDNA oder mdaDNA wurden in den Mikrotiterkavitäten vorgelegt, bevor der *Mastermix* zugegeben wurde. Falls nicht weiter erläutert, wurde die DNA in einem Volumen von 5 μ l eingesetzt. Im Vergleich zum Einsatz geringerer Volumina können auf diese Weise Pipettierfehler verringert werden. Für das Einstellen der gewünschten DNA-Konzentrationen dienten die spektrophotometrischen (gDNA) bzw. fluorometrischen (mdaDNA) Messwerte als Grundlage. Durch die

Kalibrierung des Fluorometers auf spektrophotometrische Messwerte eines DNA-Standards wurde die Vergleichbarkeit der Konzentrationsbestimmungen gesichert. Bei jeder Real-Time PCR-Analyse wurden Kontrollen in Form von *A. purif.* (*no template control*, NTC) und mdaDNA aus der MDA-Leerkontrolle (mdaNTC) mindestens als Dreifachbestimmung mitgeführt.

Das in der folgenden Tabelle 2-2 dargestellte Temperaturprogramm wurde für alle *TaqMan*-Systeme verwendet:

Tabelle 2-2 Temperaturprogramm für die Real-Time PCR.

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	
Denaturierung	95	15 sek	} 40-45
Annealing und Elongation	60 ^{a)}	1 min	

^a Annealing und Elongation wurden in einem Schritt kombiniert. Dafür war es notwendig, die Primer mit einer ausreichend hohen Schmelztemperatur (58-62 °C) zu designen.

2.2.7 Berechnung von Molekulargewichten und Kopienzahlen

Den Berechnungen von Genom-Kopienzahlen, beispielsweise im Zusammenhang mit Quantifizierungen von Startkopienzahlen mittels Real-Time PCR-Standardkurven, liegen die folgenden Zahlen und Werte zugrunde. Für die Größe eines haploiden Maisgenoms wurden 2650 Mbp angenommen (Arumugunathan & Earle 1991). Mit diesem Wert wurden das Molekulargewicht des haploiden Mais-Genoms ($m_{haploid}$) und die Kopienzahl (K) wie folgt berechnet (Stephenson 2005): Es wurde von einem Gewicht von 660 g/mol Basenpaare (Nukleotide besitzen ein durchschnittliches Molekulargewicht von 330 Da) ausgegangen. Das entspricht einem durchschnittlichen Gewicht des einzelnen Basenpaares (m_{bp}) von

$$m_{bp} = \frac{660 \text{ g}}{\text{mol}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{N_A \cdot bp} = 1,08 \cdot 10^{-21} \text{ g / bp} \quad ,$$

wobei

$$N_A = \text{Avogadro'sche Zahl} = 6,023 \cdot 10^{23}$$

ist. Daraus ergibt sich unter Verwendung des Umrechnungsfaktors 1×10^{12} Pikogramm/Gramm die Masse eines haploiden Mais-Genoms:

$$m_{haploid} = 2,65 \cdot 10^9 \text{ bp} \cdot \frac{1,08 \cdot 10^{-21} \text{ g}}{\text{bp}} \cdot \frac{1 \cdot 10^{12} \text{ pg}}{\text{g}} = 2,86 \text{ pg} \quad .$$

Dementsprechend errechnet sich die Kopienzahl (K) zu

$$K = \frac{m_{\text{gemessen}}}{2,86 \text{ pg}},$$

wobei m_{gemessen} die spektrophotometrisch bzw. fluorometrisch bestimmte DNA-Menge ist. Bei Berechnungen im Zusammenhang mit Quantifizierungen wurde für alle verwendeten Real-Time PCR-Systeme von der Annahme ausgegangen, dass eine Kopie des Taxons oder Genkonstrukts je Genom vorlag.

2.2.8 Statistische Datenanalyse

Experimentelle Daten wurden mithilfe der kommerziell erhältlichen Software-Programme Microsoft Excel 2003 und SPSS Version 12 ausgewertet. Durchschnittliche Werte sind als arithmetischer Mittelwert plus/minus der einfachen Standardabweichung ($\pm 1 \text{ SD}$) angegeben. Für den Vergleich der Ausbeuten aus verschiedenen MDA-Reaktionen wurden die nicht-parametrischen statistischen Tests Kruskal-Wallis H -Test (Vergleich mehrerer Stichproben unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur) und Mann-Whitney U -Test (Vergleich zweier Stichproben) angewendet. Für alle Analysen wurde als Signifikanzniveau $p < 0,05$ definiert.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Qualitätsbeurteilung und Quantifizierung der mdaDNA

2.3.1.1 Zusammensetzung der mdaDNA

Die MDA-Technik ermöglicht die Vervielfältigung gesamter Genome aus geringen Mengen Ausgangs-DNA. In der GVO-Analytik besteht häufig ein hoher Bedarf an Proben-DNA bei gleichzeitig limitierter Verfügbarkeit. Es besteht daher ein Interesse daran, mdaDNA aus einer möglichst geringen Menge Ausgangsmaterial herzustellen. Deshalb wurde untersucht, ob der Einsatz unterschiedlich großer Mengen gDNA einen Effekt auf die Ausbeute der MDA oder die Zusammensetzung der mdaDNA hat. Ein besonderes Augenmerk galt der Frage, wie groß der tatsächliche Anteil von Zielsequenz-spezifischer, PCR-amplifizierbarer DNA an der gesamten in der MDA entstandenen DNA ist. In der Theorie sollte aufgrund der hohen Prozessivität der $\phi 29$ -DNA-Polymerase die MDA-Ausbeute unabhängig von der eingesetzten DNA-Menge sein. Die maximale Ausbeute ist lediglich durch die Verfügbarkeit der Reaktionskomponenten begrenzt. Wenn die limitierende Reaktionskomponente verbraucht ist, stoppt die Amplifikation. Bei einer geringeren Anfangsmenge gDNA werden mehr Replikationen der vorhandenen DNA vom Enzym durchgeführt, bis keine Reaktionskomponenten mehr zur Verfügung stehen; aber die insgesamt verbrauchte Menge der Reaktionskomponenten und auch die Gesamtausbeute an mdaDNA sollten gleich bleiben. Bei einer Verdoppelung des Reaktionsvolumens inklusive der Reaktionskom-

ponenten verdoppelt sich auch die MDA-Ausbeute. Beim Einsatz verschiedener Mengen gDNA in der MDA ist also eine identische Ausbeute an zielspezifischer, PCR-amplifizierbarer DNA das zu erwartende Ergebnis (Holbrook *et al.* 2005, Dean *et al.* 2002). Bergen *et al.* (2005b) beobachteten jedoch, dass zwar die Ausbeute der MDA an gesDNA als Summe der fluorometrisch und spektrophotometrisch bestimmten ds- und ssDNA von der Menge eingesetzter humaner gDNA im Bereich von 1 bis 200 ng unabhängig war; dagegen nahm aber der Gehalt an Ziel-spezifischer, PCR-amplifizierbarer DNA mit geringeren gDNA-Ausgangsmengen ab. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit getestet, in welchem Maße die eingesetzte gDNA-Menge reduziert werden konnte, ohne dass dies einen Einfluss auf die MDA-Ausbeute an Mais-spezifischer, PCR-amplifizierbarer DNA hatte.

Es wurden 100, 10, 1,0, 0,1 oder 0,0 ng gDNA aus 5 % MON810-Mais-Pulver mittels MDA vielfältigt und anschließend gelelektrophoretisch, spektrophotometrisch, fluorometrisch und mittels Real-Time PCR untersucht. Für jede der genannten Ausgangsmengen wurden 6 separate MDA-Reaktionen durchgeführt.

a) Gelelektrophorese

Um die Beschaffenheit der in der MDA generierten mdaDNA abzuschätzen, wurden jeweils 7,5 % des Reaktionsvolumens vergleichend mit der zur Herstellung verwendeten gDNA in einem 0,7 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Das gelelektrophoretische Profil der mdaDNA war die Quantität und Fragmentgrößen betreffend für alle Konzentrationen, inklusive der mdaNTC-Kontrollen, identisch (Abbildung 2-3). Der mdaDNA-Schmier reichte von < 560 bp bis > 23 kbp. Große Fragmente verblieben in den Gel-Taschen: Durch die hohe Prozessivität der ϕ 29-DNA-Polymerase entstehen in der MDA zum Teil Fragmente mit einer Länge von bis zu 70 kbp (Blanco *et al.* 1989). Fragmente dieser Größenordnung können vermutlich aufgrund ihres Umfangs trotz der verwendeten geringen Agarose-Konzentration nicht aus den Gel-Taschen in die Poren des Gels eintreten.

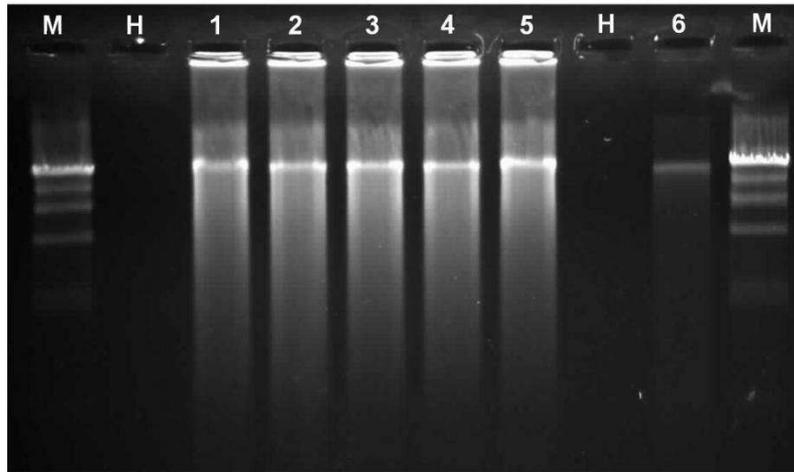


Abbildung 2-3 Gelelektrophorese von mdaDNA aus fünf MDA-Reaktionen mit unterschiedlichen Mengen eingesetzter MON810-gDNA. *M*: Längenstandard MWM II (560 bp – 23,1 kbp), *H*: Wasser, *1 bis 4*: mdaDNA aus Reaktionen mit 100 ng (*1*), 10 ng (*2*), 1,0 ng (*3*) und 0,1 ng (*4*) Ausgangs-gDNA; *5*: mdaDNA aus mdaNTC-Kontrolle und *6*: MON810-gDNA (100 ng).

b) Spektrophotometrie und Fluorometrie

Die DNA-Ausbeute der MDA wurde sowohl spektrophotometrisch als auch fluorometrisch untersucht. Bei der Fluorometrie wird ausschließlich die in der Probe vorhandene dsDNA gemessen, während die spektrophotometrische Messung ssDNA und dsDNA erfasst. Die fluorometrische Messung ermöglichte es, eine Aussage über die Zusammensetzung der amplifizierten DNA zu treffen und die Auswirkung verschiedener Faktoren, z.B. der Menge der in die MDA eingesetzten Ausgangs-DNA, vergleichend zwischen verschiedenen Proben zu untersuchen. Die genaue Zusammensetzung der dsDNA und ssDNA blieb jedoch unbekannt. Deshalb konnte beispielsweise nicht geklärt werden, welcher der DNA-Gruppen die Mais-spezifische, PCR-amplifizierbare DNA zuzuordnen ist. Zudem ist ein Teil der gemessenen Absorption der ssDNA wahrscheinlich überschüssigen Hexamer-Primern zuzuordnen.

Unabhängig von der Menge eingesetzter gDNA im Bereich von 0,1 bis 100 ng ergab die MDA einheitliche Ausbeuten an mdaDNA (Tabelle 2-3). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Ausbeuten aus verschiedenen DNA-Mengen für eine der DNA-Untergruppen ss-, ds- oder gesDNA (Kruskal-Wallis *H*-Test; $p < 0,0125$; Bonferroni-Korrektur). Die mdaNTC-Reaktionen erzielten signifikant geringere Ausbeuten an dsDNA und signifikant höhere Ausbeuten an ssDNA als die gDNA enthaltenden Ansätze (Mann-Whitney *U*-Test; $p = 0,002$) bei gleicher DNA-Gesamtausbeute (gesDNA).

Tabelle 2-3 Ausbeute der MDA an einzelsträngiger (ss), doppelsträngiger (ds) und gesamter (ges) DNA.

Eingesetzte Menge gDNA (ng)	Mittlere Ausbeute der MDA ($n = 6$) ± 1 SD (μg)		
	dsDNA	ssDNA	gesDNA
100	6,43 \pm 0,92	3,57 \pm 0,56	9,99 \pm 0,44
10	5,87 \pm 0,83	3,53 \pm 0,51	9,41 \pm 0,33
1,0	5,51 \pm 0,80	3,96 \pm 0,40	9,47 \pm 0,47
0,1	5,15 \pm 0,87	4,38 \pm 0,43	9,53 \pm 0,44
0,0 ^{a)}	1,57 \pm 0,38	8,17 \pm 0,19	9,75 \pm 0,37

^a mdaNTC

c) Real-Time PCR

Nach der Untersuchung der mdaDNA bezüglich ihrer Zusammensetzung aus ds- und ssDNA erfolgte die Quantifizierung der enthaltenen Mais-spezifischen, PCR-amplifizierbaren DNA, im Weiteren „Mais-spezifische DNA“ genannt. Zu diesem Zweck wurde das Taxon-spezifische Mais-Gen *adh1* ausgewählt, das das Enzym Alkoholdehydrogenase 1 kodiert. Es wurde ein validiertes *adh1*-Real-Time PCR-System (ISO 2005b) verwendet, das häufig als Taxon-spezifisches Referenzsystem für quantitative GVO-Analysen eingesetzt wird (Primer *adh-f3* und *adh-r4*, Sonde *adh-mdo-probe*). Aus der gleichen genomischen Mais-DNA, die in unterschiedlichen Mengen den MDA-Ansätzen zugrunde lag, wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe angefertigt (200 bis 1,6 ng), um mit jeweils 3 Replikaten in der Real-Time PCR eine Standardkurve für das *adh1*-System zu erstellen. Aus den verschiedenen MDA-Reaktionen wurde in jeweils 100 ng fluorometrisch bestimmter dsDNA der *adh1*-Gehalt durch eine Regressionsanalyse der gDNA-Standardkurve quantifiziert (Abbildung 2-4). Es wurden Vierfachbestimmungen für jedes der sechs MDA-Replikate durchgeführt. Da die verwendeten Real-Time PCR-Platten die maximale Reaktionsanzahl auf 96 begrenzen, wurde der Versuch auf zwei separaten Platten durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde auf jeder der beiden Platten eine gDNA-Standardreihe eingesetzt, und es wurden pro Platte jeweils drei der sechs MDA-Replikate untersucht.

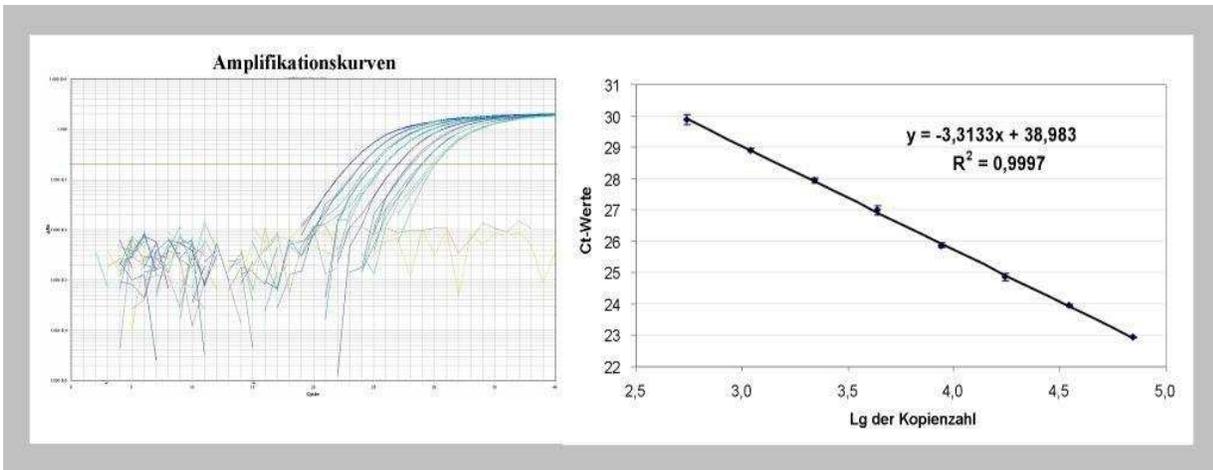


Abbildung 2-4 Real-Time PCR-Amplifikationskurven und Standardkurve für *adh1* in MON810-gDNA. Die Fehlerbalken der Standardkurve repräsentieren ± 1 SD der C_T -Werte für *adh1* ($n = 3$).

Die mittels Real-Time PCR errechneten Kopienzahlen des *adh1*-Gens, die in der mdaDNA enthalten waren, wurden mit den Kopienzahlen verglichen, die anhand der fluorometrisch bestimmten Werte für ds-mdaDNA zu erwarten waren. Beispielsweise ist in 100 ng doppelsträngiger Mais-DNA das Einzelkopie-Gen *adh1* mit einer Anzahl von etwa 35.000 Kopien enthalten (Berechnung über Genomgröße). Ergäbe nun die Quantifizierung des *adh1*-Gens in 100 ng ds-mdaDNA eine Kopienzahl von z.B. 17.500, bedeutete dies, dass nur die Hälfte der in der MDA entstandenen dsDNA Mais-spezifische DNA wäre, während es sich bei der restlichen DNA um unspezifische Produkte handelte.

Die fluorometrisch bestimmte Menge dsDNA als Ausgangspunkt für die Real-Time PCR-Untersuchungen wurde gewählt, weil sich in Vorversuchen bereits gezeigt hatte, dass die in der mdaDNA enthaltene Menge dsDNA in etwa der enthaltenen Menge Mais-spezifischer DNA entsprach. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei der in der MDA entstehenden ssDNA um unspezifische Amplifikationsprodukte handeln könnte (Dafür spricht auch der hohe Anteil ssDNA in mdaNTC-Reaktionen.). Doch auch die dsDNA besteht nicht vollständig aus Mais-spezifischer DNA, wie die Real-Time PCR-Untersuchung zeigte: In Tabelle 2-4 sind die Real-Time PCR-Ergebnisse unter Angabe des aus den *adh1*-Kopienzahlen errechneten Gehaltes der mdaDNA an Mais-spezifischer DNA dargestellt.

Tabelle 2-4 Ausbeute der MDA an Mais-spezifischer, PCR-amplifizierbarer DNA.

Eingesetzte Menge gDNA (ng)	Mittlere Ausbeute der MDA an Mais-spezifischer, PCR-amplifizierbarer DNA (n = 6) ± 1 SD (µg)
100	2,78 ± 0,77
10	2,69 ± 0,57
1,0	2,99 ± 1,44
0,1	2,27 ± 0,93
0,0 ^{a)}	0,00 ± 0,00

^{a)} (mdaNTC)

Nur etwa (47 ± 5) % der mittels Fluorometrie bestimmten DNA enthalten die *adh1*-kodierenden Abschnitte des Mais-Genoms. Die Angaben des Herstellers bezüglich der zu erwartenden DNA-Ausbeuten des *GenomiPhi Kits* sind also nur vorbehaltlich dessen korrekt, dass sie sich lediglich auf die Ausbeute an dsDNA beziehen und nicht auf die tatsächliche Ausbeute der PCR-amplifizierbaren Ziel-DNA. Die Natur der „unspezifischen“ dsDNA bleibt unbekannt. Möglicherweise handelt es sich um bevorzugt von der ϕ 29-DNA-Polymerase amplifizierte Abschnitte der Mais-DNA, etwa um mitochondriale oder chloroplastische DNA. Zirkuläre DNA wird von der ϕ 29-DNA-Polymerase mit erhöhter Effizienz nach dem Prinzip der *rolling circle amplification* (RCA) amplifiziert (Lizardi *et al.* 1998, Dean *et al.* 2001). Allerdings haben Lage *et al.* (2003) mittels Real-Time PCR die MDA-Ausbeute für humane mitochondriale und chromosomale DNA verglichen und keinen signifikanten Unterschied in der Zielsequenz-Repräsentation festgestellt.

Obwohl nur ein Teil der generierten DNA die untersuchte Ziel-Sequenz enthielt, erzielte die MDA beachtliche Amplifikationsraten. Außerdem war die Ausbeute an Mais-spezifischer DNA für alle in der MDA eingesetzten Mengen gDNA gleich (Kruskal-Wallis *H*-Test; $p < 0,0125$; Bonferroni-korrigiert). Abbildung 2-5 verdeutlicht die resultierende Korrelation zwischen der Menge eingesetzter gDNA und der Amplifikationsrate für Mais-spezifische DNA. Der Einsatz einer geringeren Menge gDNA erhöht die Amplifikationsrate. Dementsprechend ergab sich für 100/10/1,0 bzw. 0,1 ng gDNA eine 30-/270-/3.000- bzw. 23.000fache Vervielfältigung der enthaltenen Mais-spezifischen DNA.

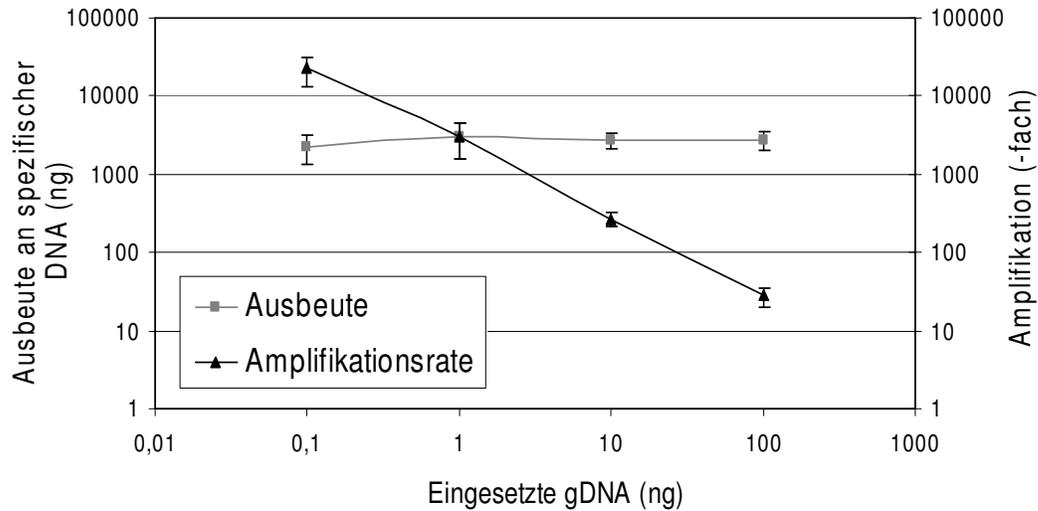


Abbildung 2-5 Effekt der in der MDA eingesetzten gDNA-Menge auf die Ausbeute an Mais-spezifischer, PCR-amplifizierbarer DNA und die korrespondierende Amplifikationsrate. Es besteht eine inverse Korrelation zwischen der mittels Real-Time PCR (*adh1*-System) bestimmten Ausbeute und der resultierenden Amplifikationsrate in Abhängigkeit von der Menge eingesetzter gDNA.

Abweichend von der von Bergen *et al.* (2005b) beobachteten Abnahme der Ausbeute an Zielsequenz-spezifischer DNA mit sinkender Menge eingesetzter gDNA wurde in dieser Arbeit eine konstante Ausbeute für alle Bestandteile der mdaDNA, inklusive der Zielsequenz-spezifischen DNA, festgestellt. Folglich stieg im Bereich von 100 bis 0,1 ng die Amplifikationsrate der MDA mit sinkender Menge eingesetzter gDNA. Im Falle einer stark limitierten Verfügbarkeit von Probenmaterial könnte die eingesetzte gDNA daher bis auf eine Menge von 0,1 ng reduziert werden. Zudem könnte die Amplifikationsrate der MDA durch eine Vergrößerung des Reaktionsvolumens bei gleich bleibender Konzentration der Reaktionskomponenten weiter gesteigert werden.

Die Real-Time PCR-Analyse der mdaNTC-Reaktionen, bei denen keine gDNA in der MDA eingesetzt wurde, ergab, dass keine *adh1*-spezifische DNA in der MDA generiert wurde. Die mdaNTC-Reaktionen wiesen zwar die gleiche Ausbeute an gesDNA auf wie die gDNA enthaltenden Ansätze. Der Anteil an dsDNA war jedoch signifikant geringer (16 % dsDNA, 84 % ssDNA). Die Bildung großer Mengen unspezifischer DNA mit einem hohen Anteil von ssDNA in mdaNTC-Kontrollen ist auch von anderen Nutzern der MDA beobachtet worden. In den mdaNTC-Reaktionen sind alle Reaktionskomponenten außer der Proben-DNA vorhanden. Möglicherweise dienen die Hexamer-Primer der $\phi 29$ -DNA-Polymerase mangels einer anderen DNA-Matrize als Grundlage für eine *de novo* Zufalls-Synthese von DNA (Holbrook *et al.* 2005, Lage *et al.* 2003). Eine weitere mögliche Erklärung ist die Amplifikation von DNA-Spuren, die aufgrund des Herstellungsprozesses, z.B. der $\phi 29$ DNA-Polymerase, im MDA-Reaktionspuffer vorhanden sein könnten.

Allerdings bliebe dann die Frage nach der Ursache für den hohen Anteil ssDNA in mdaNTC-Reaktionen.

2.3.1.2 Sensitivitätsvergleich mit gDNA, mdaDNA und Klenow-biotinylierter DNA

Vor einer Verwendung in Hybridisierungsversuchen für die GVO-Analyse müsste die mdaDNA biotinyliert werden. Daher wurde untersucht, ob eine Biotinylierung der mdaDNA mittels Klenow-Markierung einen Einfluss auf die Sensitivität der Real-Time PCR hat. Um Messungenauigkeiten durch die fluorometrische Quantifizierung der drei unterschiedlichen DNA-Arten (gDNA, mdaDNA, biotinylierte mdaDNA) zu vermeiden, wurde der Sensitivitätsvergleich nicht auf die eingesetzten Gewichtsmengen bezogen. Stattdessen wurde ein Volumen-bezogener Vergleich durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde 1 µl einer 2 ng/µl gDNA-Lösung der gv-Maislinie Event176 in der MDA eingesetzt. Anschließend wurden 8 µl der resultierenden mdaDNA einer Klenow-Biotinylierung zugeführt. Aus den jeweiligen Originallösungen der 2 ng/µl gDNA, mdaDNA und Klenow-biotinylierten mdaDNA (Bio-mdadDNA) wurden jeweils Verdünnungsreihen hergestellt, um eine mögliche Inhibition der folgenden Real-Time PCR durch die in der MDA generierten großen DNA-Mengen auszuschließen. Anschließend wurde von jeder Verdünnungsstufe von gDNA, mdaDNA und Bio-mdadDNA je 1 µl DNA-Lösung in der Real-Time PCR mit dem Mais-spezifischen *TaqMan*-System *adh1* untersucht. Die resultierenden C_T-Werte sind in Tabelle 2-5 zusammengestellt.

Tabelle 2-5 Real-Time PCR-Analyse von Verdünnungsreihen aus gleichen Volumina Event176-gDNA (2 ng/µl), daraus hergestellter mdaDNA und Klenow-biotinylierter mdaDNA.

Verdünnungsstufe	Mittlere C _T -Werte (n=3) ± 1 SD		
	gDNA	mdaDNA	Klenow-biotinylierte mdaDNA
Unverdünnt	30,06 ± 0,10	22,91 ± 0,09	22,28 ± 0,02
1:10	34,25 ± 0,44	25,80 ± 0,16	26,04 ± 0,07
1:100	37,38 ± 0,65	29,07 ± 0,12	29,58 ± 0,07
1:1000	> 40 ^{a)}	32,48 ± 0,23	33,15 ± 0,33
1:10.000	> 40 ^{a)}	35,63 ± 0,05 ^{a)}	37,43 ± 0,27
1:100.000	> 40 ^{a)}	39,8 ^{b)}	39,19 ± 1,59 ^{c)}
1:1.000.000	> 40 ^{a)}	> 40 ^{a)}	> 40 ^{a)}

^{a)} nicht nachweisbar innerhalb von 40 Zyklen in der Real-Time PCR; ^{b)} n = 1; ^{c)} n = 2

Die C_T-Werte der gDNA lagen deutlich höher als die C_T-Werte der jeweiligen Verdünnungsstufen der mdaDNA und Bio-mdadDNA. Während die gDNA nur bis zur 1:100-Verdünnung, d.h. einer

Menge von 20 pg (≈ 7 haploide Genom-Kopien) nachweisbar war, wurden die mdaDNA und Bio-mdaDNA mindestens bis zur 1:10.000-Verdünnung detektiert. Der Unterschied zwischen den C_T -Werten (ΔC_T) für gDNA und mdaDNA betrug für die unverdünnte DNA 7,69. Für die 1:10- bzw. 1:100-Verdünnungen ergeben sich höhere ΔC_T -Werte von 8,45 bzw. 8,31. Da dies deutlich auf eine Inhibition der PCR durch die unverdünnte mdaDNA hinwies (rechnerisch bestätigt, Daten nicht gezeigt), wurde die 1:10-Verdünnungsstufe für einen Vergleich der Kopienzahlen gewählt und für die weiteren Berechnungen als „V0“ (unverdünnte Lösung) definiert.

Zunächst wurde die nach der MDA vorhandene Kopienzahl der Mais-spezifischen *adh1*-Sequenz bestimmt. Um eine lineare Regression der Kopienzahl aus der gDNA-Standardkurve zu ermöglichen, wurde zunächst der *adh1*-Gehalt der 1:1000-Verdünnung der mdaDNA errechnet, weil diese mit einem C_T -Wert von 32,5 innerhalb des C_T -Bereiches der drei C_T -Werte für die gDNA lag. Die Quantifizierung ergab eine Menge von 168 Kopien/ μ l der 1:1000 verdünnten mdaDNA-Lösung. Wenn also 168 Kopien in der PCR eingesetzt wurden, leitet sich daraus ein Gehalt von etwa 16800 Kopien der *adh1*-Sequenz in der 1:10-Verdünnung ab. Ausgehend von ca. 70 Kopien/ μ l in der 1:10-Verdünnung der eingesetzten gDNA-Lösung und unter Berücksichtigung des MDA-Reaktionsvolumens von 20 μ l ergab sich eine 4860fache Vervielfältigung durch die MDA.

Diese Hochrechnung gilt nur, wenn eine Inhibition der 1:10-Verdünnung ausgeschlossen ist, denn sonst wäre die tatsächlich eingesetzte Kopienzahl der mdaDNA in der 1:10-Verdünnung höher und damit die Amplifikationsrate geringer. Um zu prüfen, ob möglicherweise eine Inhibition vorlag, wurden die C_T -Werte gegen den natürlichen Logarithmus (Ln) der Verdünnungen ab 1:100 (V1) abwärts in einem Diagramm aufgetragen und der zu erwartende C_T -Wert der 1:10-Verdünnung (V0) aus der resultierenden Standardkurve extrapoliert. Eine Inhibition läge dann vor, wenn der tatsächliche C_T -Wert der unverdünnten Konzentration $> 0,5$ Zyklen höher wäre als der extrapolierte (CRL Report 2005). Da die Berechnung einer möglichen Inhibition der 1:10-Verdünnung gefordert war, wurde für die Berechnungen die 1:10-Verdünnung gleich Eins gesetzt (V0), die 1:100-Verdünnung gleich 1:10 (V1) etc., um eine korrekte Berechnung des Ln zu gewährleisten. Abbildung 2-6 zeigt die Standardkurve und das Ergebnis der Extrapolation. Ein ΔC_T -Wert von 0,25 deutete darauf hin, dass keine Inhibition der 1:10-Verdünnungsstufe vorlag.

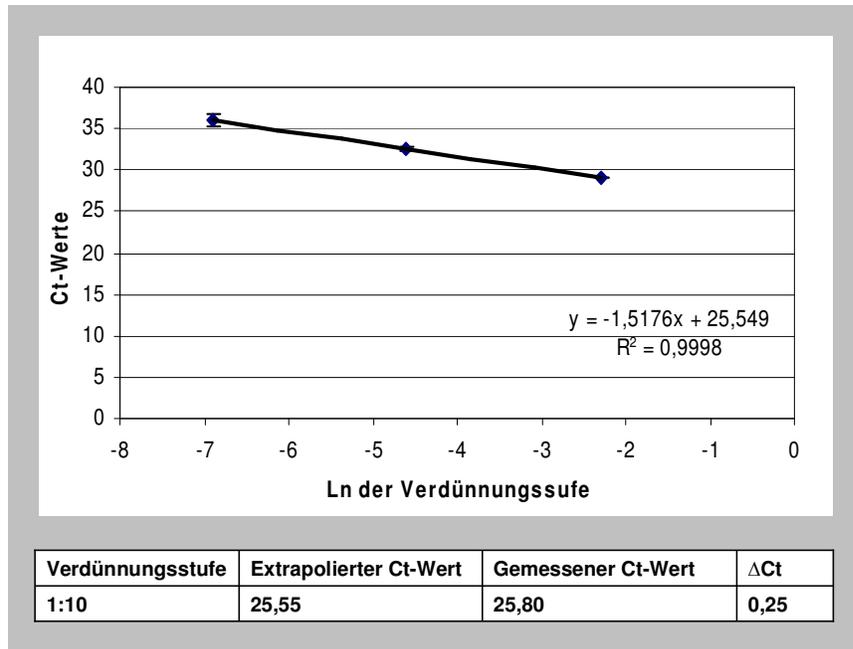


Abbildung 2-6 Ausschluss einer Inhibition der 1:10-Verdünnungsstufe (V0) der mdaDNA. Die C_T -Werte von V1 bis V3 wurden gegen den natürlichen Logarithmus (Ln) der jeweiligen Verdünnungsstufe als Standardkurve aufgetragen. Der zu erwartende C_T -Wert der 1:10-Verdünnungsstufe wurde aus der Gleichung der Geraden extrapoliert.

Vora *et al.* (2004) haben beobachtet, dass eine an die MDA anschließende Klenow-Biotinylierung bakterieller DNA die Volumen-bezogene Sensitivität in anschließenden Southern-Hybridisierungen erhöhte. Im vorliegenden Versuch wurde kein Unterschied der C_T -Werte der mdaDNA zu den C_T -Werten der Klenow-amplifizierten DNA festgestellt. Lediglich aus der weiteren Verdünnung der eingesetzten 8 μ l mdaDNA resultierte eine weitere 2,5fache, absolute Vervielfältigung durch die Klenow-Amplifikation.

2.3.2 Eignung der mdaDNA für die GVO-Analyse

2.3.2.1 Verhalten der mdaDNA in der Real-Time PCR

Um die Eignung der mdaDNA für die GVO-Analyse zu beurteilen, wurden genomische Mais-DNA und daraus hergestellte mdaDNA mittels Real-Time PCR untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Untersuchung war auch insofern von Bedeutung, als die unter 2.3.1 vorgestellten Real-Time PCR-Ergebnisse nur unter dem Vorbehalt eines vergleichbaren Verhaltens von gDNA und mdaDNA Gültigkeit hatten. Beispielsweise würden unterschiedliche PCR-Effizienzen des *adh1*-Systems für gDNA und mdaDNA die gezeigten Ergebnisse der Quantifizierung von Mais-spezifischer DNA in der mdaDNA in Frage stellen.

a) Vergleichende optische Beurteilung der Real-Time PCR-Amplifikationskurven von gDNA und mdaDNA

In der Real-Time PCR werden Änderungen in der Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffes im Verlauf der Zeit aufgenommen. Bereits das Muster der entstehenden Amplifikationskurven liefert Informationen über Merkmale der Amplifikationsleistung einer PCR wie Inhibition, Effizienz und Linearität. Abbildung 2-7 zeigt vergleichend die Amplifikationskurven für das Mais-spezifische *TaqMan*-System *adh1*, angewendet auf Verdünnungsreihen aus Mais-DNA der gv-Linie T25. Von genomischer T25-DNA und aus daraus generierter mdaDNA wurden jeweils 100, 50, 25, 12,5, 6,3 und 3,1 ng in der Real-Time PCR eingesetzt. In der Abbildung sind vergleichend die resultierenden Amplifikationskurven für gDNA und mdaDNA in Einzeldarstellung sowie in einer gemeinsamen Grafik aus den kombinierten Fluoreszenz-Daten für gDNA und mdaDNA dargestellt:

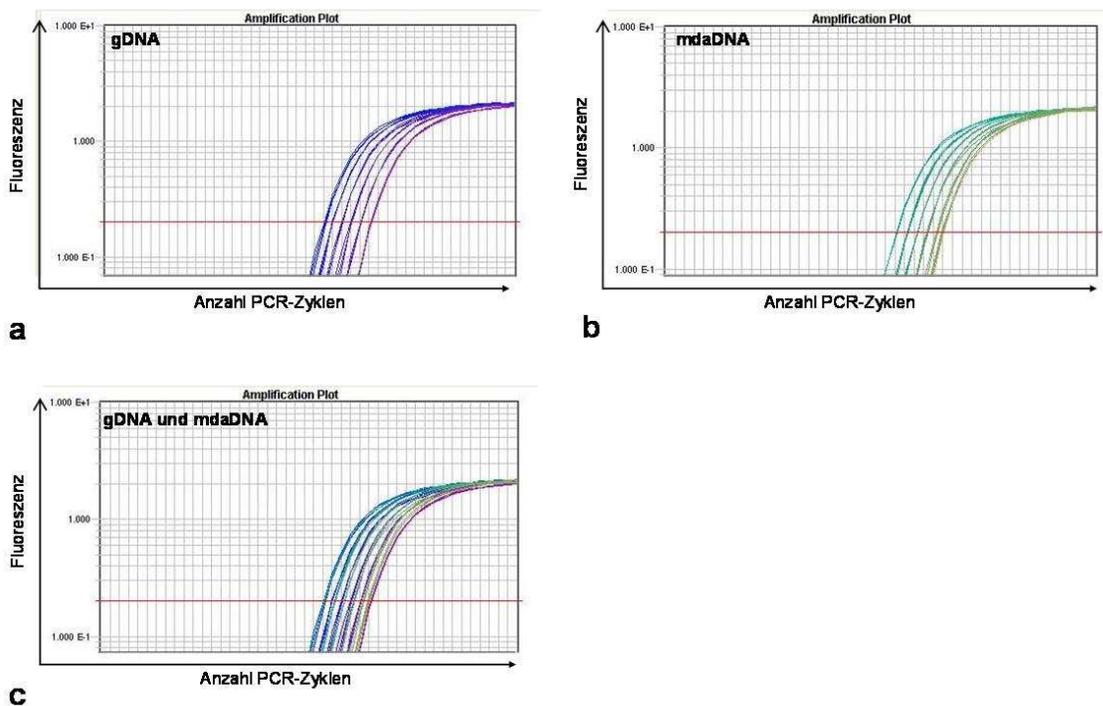


Abbildung 2-7 Amplifikationskurven des *TaqMan*-Systems *adh1* für T25-gDNA und daraus hergestellter mdaDNA als Einzeldarstellungen (a und b) und kombiniert in einer gemeinsamen Grafik (c).

Im Vergleich der Amplifikationskurven von gDNA und mdaDNA wäre eine deutliche Inhibition oder eingeschränkte Linearität an einer Verschiebung der einzelnen Kurven zu erkennen. Eine wesentlich abweichende Effizienz würde in einem veränderten Kurvenverlauf resultieren. Da hier die Amplifikationskurven für beide DNA-Arten nahezu deckungsgleich waren (Abbildung 2-7c), wies bereits die optische Beurteilung der Amplifikationskurven auf ein vergleichbares Verhalten von gDNA und mdaDNA in der Real-Time PCR hin.

b) Vergleich des Real-Time PCR-Verhaltens von gDNA und mdaDNA anhand von Standardkurven

Um eine genauere Aussage über das Real-Time PCR-Verhalten der mdaDNA treffen zu können, wurden eine mögliche Inhibition der PCR durch die mdaDNA sowie die Effizienz und Linearität der PCR durch Erstellung von Standardkurven rechnerisch überprüft. Die Untersuchungen wurden parallel für ein Taxon- und ein GVO-spezifisches *TaqMan*-System durchgeführt.

Aus genomischer 5 % MON810-Mais-DNA sowie aus daraus hergestellter mdaDNA wurden identische Verdünnungsreihen angefertigt. In jeweils 100, 50, 25, 12,5 und 6,3 ng gDNA und (ds-) mdaDNA wurde in Dreifachbestimmungen der Gehalt an Mais-spezifischer DNA mit dem *TaqMan*-System *adh1* überprüft. Zusätzlich wurde in jeweils 200, 100, 50, 25 und 12,5 ng gDNA und mdaDNA der GVO-Gehalt mithilfe des *mail*-Systems bestimmt (Primer *mail-fl*, *mail-r1* und Sonde *mail-s2*; ISO 2005b). Das *TaqMan*-System für *mail* quantifiziert den *event* der Maislinie MON810: Es bindet in der Region der Integrationsgrenze zwischen dem Maisgenom und dem aus dem Blumenkohlmosaikvirus stammenden 35S-Promotor des MON810-Konstrukts.

Um das Vorhandensein einer möglichen Inhibition zu überprüfen, wurde rechnerisch wie unter 2.3.1.2 beschrieben vorgegangen. Wie in Abbildung 2-8 gezeigt, lag für die V0-Lösungen (*adh1*: 100 ng/μl; *mail*: 200 ng/μl) weder für die gDNA noch für die mdaDNA eine Inhibition für eines der Real-Time PCR-Systeme vor. Die Differenz zwischen den tatsächlich gemessenen und den aus den Standardkurven extrapolierten C_T -Werten war für alle Verdünnungsreihen $< 0,5$.

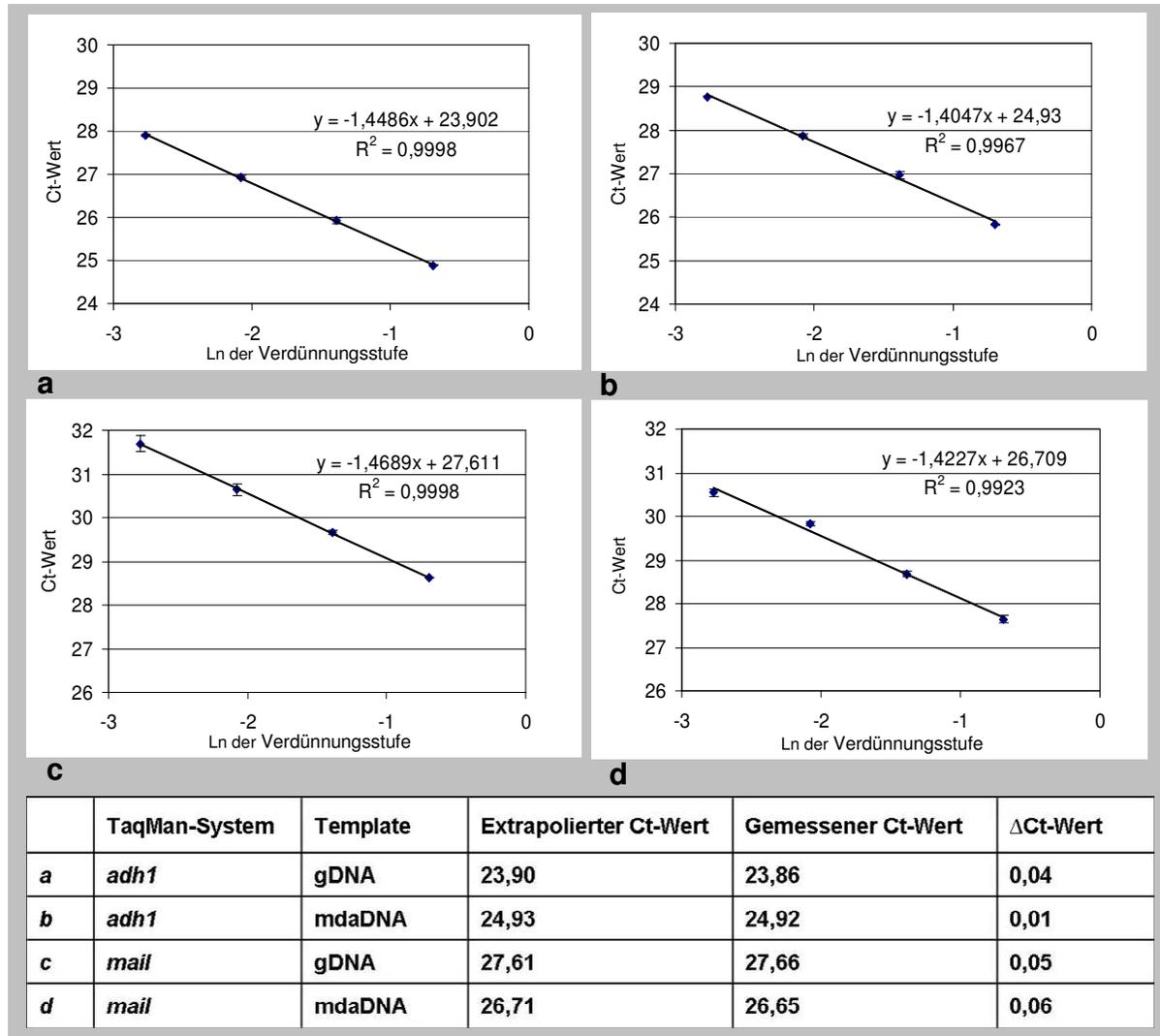


Abbildung 2-8 Prüfung einer möglichen Inhibition der unverdünnten Konzentration (V0) von gDNA (a und c) und mdaDNA (b und d) für die beiden TaqMan-Systeme *adh1* (a und b) und *mail* (c und d). Die Standardkurven wurden aus den C_T-Werten der V1 bis V4-Verdünnungen erstellt, die gegen den natürlichen Logarithmus (Ln) der jeweiligen Verdünnungsstufe aufgetragen wurden. Der C_T-Wert der V0-Lösung wurde jeweils aus der Gleichung der Geraden extrapoliert und von dem tatsächlich gemessenen C_T-Wert subtrahiert (Δ C_T-Wert).

Für die Berechnung der Real-Time PCR-Effizienz wurden die C_T-Werte gegen den dekadischen Logarithmus (Lg) der Genomkopienzahl als Standardkurve aufgetragen (Abbildung 2-9). Anhand der Gleichung der Geraden wurde die Effizienz nach der Formel

$$E (\%) = (10^{|-1/Steigung|} - 1) \cdot 100$$

berechnet. Die Amplifikationseffizienz des *adh1*-Systems betrug 98 % für die gDNA und 99 % für die mdaDNA. Das *mail*-System amplifizierte die eingesetzte DNA mit einer Effizienz von 100 % (gDNA) bzw. 103 % (mdaDNA). Diese Werte deuten auf eine hohe und für gDNA und mdaDNA

vergleichbare Amplifikationseffizienz hin. Der Regressionskoeffizient der Geraden war für beide Real-Time PCR-Systeme und beide DNA-Arten $> 0,996$ und wies auf eine hohe lineare Korrelation von C_T -Werten und Kopienzahlen hin.

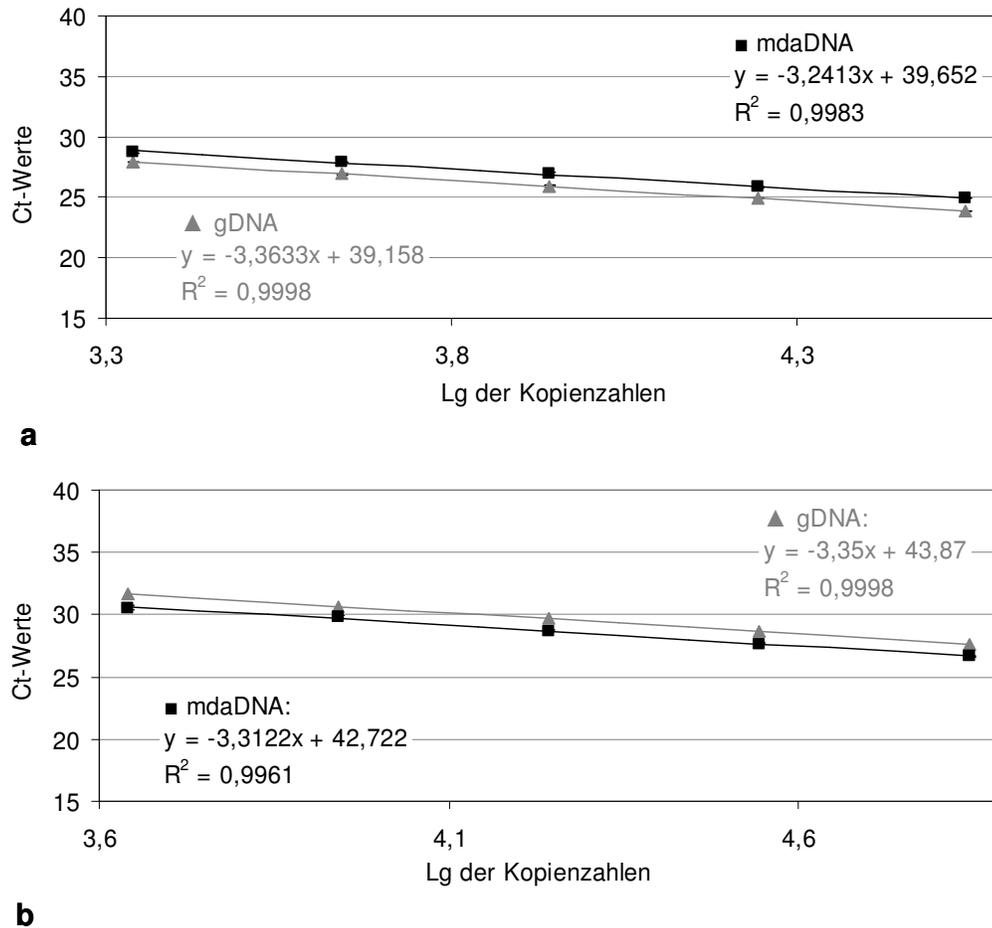


Abbildung 2-9 Standardkurven der *TaqMan*-Systeme *adh1* (a) und *mail* (b) für gDNA und mdaDNA.

2.3.2.2 Genrepräsentation

Für den Einsatz von mdaDNA in der GVO-Analyse ist es wichtig, dass das in der Proben-DNA vorhandene Verhältnis der verschiedenen Genomabschnitte zueinander durch die MDA nicht wesentlich verändert wird. Nach der MDA sollte die Repräsentation der verschiedenen Gene und *events* dem Zustand vor der MDA entsprechen. Für die Untersuchung der Gleichmäßigkeit der Amplifikation wurden folgende Real-Time PCR-Systeme ausgewählt: Die Taxon-spezifischen Systeme *adh1*, *hmg* (*ZM1-f*, *ZM1-r*, *ZM1-Sonde*; ISO 2005b) und *inv* (*ZmayInv-f*, *ZmayInv-r*, *ZmayInvFT-Sonde*; Ronning *et al.* 2003) weisen die Mais-spezifischen Gene für Alkoholdehydro-

genase 1, *high mobility group*-Protein und Invertase nach. Das *mail*-System amplifiziert die Übergangssequenz zwischen Transgen und Wirtsgenom (*event*-spezifischer Nachweis). Die Auswahl erfolgte zufällig bzw. entsprechend der Verfügbarkeit von Real-Time PCR-Systemen. Eine genaue Kenntnis der Lage der amplifizierten Sequenzen innerhalb des Mais-Genoms besteht nicht.

Aus 100 % MON810-Mais-DNA wurde in acht separaten Reaktionen mdaDNA hergestellt. Anschließend wurde mittels Real-Time PCR der Gehalt für *adh1*, *hmg*, *inv* und *mail* in der mdaDNA bestimmt und zum ursprünglichen Gehalt in der Ausgangs-DNA in Beziehung gesetzt. Für jeden Real-Time PCR-Lauf und jedes *TaqMan*-System wurde eine Standardkurve erstellt, indem 200, 100, 50, 25, 12,5 und 6,25 ng der für die MDA verwendeten gDNA in Duplikaten untersucht wurden. Daher erübrigt sich ein Vergleich der Effizienzen der verwendeten *TaqMan*-Systeme als Grundlage für die Vergleichbarkeit der Quantifizierungen. Von der mdaDNA wurden jeweils 50 ng (basierend auf fluorometrischen Messungen) in der Real-Time PCR eingesetzt. Aus dem gemessenen C_T -Wert für das jeweilige Gen bzw. den *event* wurde durch den Vergleich mit der gDNA-Standardkurve die eingesetzte Kopienzahl quantifiziert. Die auf diese Weise errechnete Real-Time PCR-Ausgangsmenge wurde dann ins Verhältnis zu der laut Fluorometrie in die Real-Time PCR eingesetzten Menge gebracht und die tatsächlich vorhandene Kopienzahl des Gens oder *events* wurde als *n*-fache Differenz der Kopienzahlen angegeben. Für jeweils die gleiche Menge (Masse) in der Real-Time PCR eingesetzter DNA (50 ng) resultiert die *n*-fache Differenz aus der Formel

$$\text{Differenz [fach]} = \frac{\text{Kopienzahl in mdaDNA}}{\text{Kopienzahl in gDNA}} - 1 \quad .$$

Dies gilt, wenn die errechnete Kopienzahl in der mdaDNA größer ist als die Kopienzahl in der gleichen Masse gDNA. Für den umgekehrten Fall errechnet sich die Differenz aus der Formel

$$\text{Differenz [fach]} = 1 - \frac{\text{Kopienzahl in gDNA}}{\text{Kopienzahl in mdaDNA}}$$

(GE Healthcare – Amersham 2003).

In Abbildung 2-10 ist für jedes der *TaqMan*-Systeme die *n*-fache Über- oder Unterrepräsentation in den einzelnen MDA-Reaktionen dargestellt. Die maximale Abweichung war eine 3,5fache Überrepräsentation der *mail*-Sequenz in einer der MDA-Reaktionen. Im Mittel ergab sich für das *mail*-System eine $(2,22 \pm 0,62)$ -fache Differenz im Vergleich zur Ausgangs-DNA. Für die Systeme *adh1*, *hmg* und *inv* ergaben sich $(0,01 \pm 0,36)$, $(0,28 \pm 0,8)$ und $(-1,03 \pm 0,56)$ -fache Abweichungen.

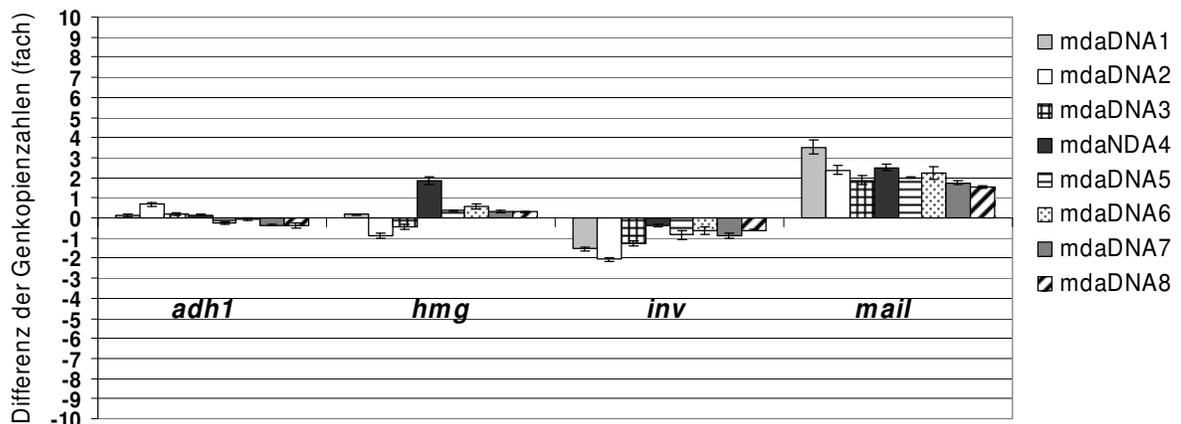


Abbildung 2-10 Genrepräsentation nach der MDA. Vergleich der Kopienzahlen für die *TaqMan*-Systeme *adh1*, *hmg*, *inv* und *mail* in gDNA und mdaDNA in jeweils acht separaten MDA-Ansätzen. Eine Über- oder Unterrepräsentation der Sequenzen nach der MDA ist als n -fache Differenz angegeben.

Diese Ergebnisse lagen innerhalb des für die Gleichmäßigkeit der MDA zu erwartenden Bereichs, der in der Literatur beschrieben wurde (Pinard *et al.* 2006, Dean *et al.* 2002, Hosono *et al.* 2003), und wiesen auf eine weitgehend gleichmäßige Vervielfältigung der genomischen DNA hin. Dies gilt vor allem im Vergleich zu anderen Methoden der WGA. Dean *et al.* (2002) haben die Gleichmäßigkeit der Vervielfältigung mittels MDA mit den PCR-basierten WGA-Methoden PEP und DOP-PCR verglichen. Die Ungleichmäßigkeit der Vervielfältigung lag bei den PCR-basierten Methoden im Bereich einer 10^2 und 10^6 -fachen, bei der MDA dagegen unter 3fachen Über- oder Unterrepräsentation verschiedener Genloki.

2.3.2.3 Gesamtbeurteilung und Anwendungsmöglichkeiten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die MDA für die Bereitstellung von DNA für die GVO-Analyse geeignet ist. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der mdaDNA mit der gDNA (ähnliche Molekülgrößen), ihren identischen Eigenschaften in Real-Time PCR-Analysen im Vergleich zur gDNA und der weitgehend gleichmäßigen Vervielfältigung der Proben-DNA durch die $\phi 29$ -DNA-Polymerase kann die MDA für die qualitative GVO-Analyse verwendet werden.

Einerseits bietet die MDA die Möglichkeit, große Mengen Proben-DNA zu generieren, wie sie für die Entwicklung einer Methode benötigt werden, bei der mit einer Hybridisierungstechnik GVO-Sequenzen ohne vorherige PCR-Amplifikation nachgewiesen werden sollen. Für die direkte Hybridisierung an Fangsonden muss die Proben-DNA in der Regel mit modifizierten dNTPs markiert werden; eine Klenow-Biotinylierung der mdaDNA ergab in der vergleichenden Real-Time-PCR-

Untersuchung von gDNA, mdaDNA und biotinylierter mdaDNA keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Detektion.

Andererseits kann die MDA als Hilfsmittel für die qualitative GVO-Analyse dienen, wenn die zur Verfügung stehende genomische DNA so stark limitiert ist, dass sie nicht für alle nötigen Untersuchungen ausreicht. Vorstellbar ist beispielsweise eine Anwendung der MDA für die Anreicherung von Proben-DNA für Screening-Zwecke mit der klassischen PCR. In der Literatur ist neben der Amplifikation von aus verschiedenen biologischen Materialien extrahierter gDNA mit der MDA auch die direkte Vervielfältigung von DNA aus Proben-Material ohne eine vorherige Aufreinigung der DNA beschrieben worden (siehe Abschnitt 2.1.3). Dieser Aspekt ist im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden. Zwar ist die pflanzliche DNA in den Zellen gut durch Zellwände geschützt; ein Aufbrechen der Zellwände (z.B. mit physikalischen Methoden) und eine anschließende direkte Amplifikation der gDNA sind aber vorstellbar und würden zusätzliche Vorteile für einen Einsatz der MDA mit sich bringen.

Eine dritte Anwendungsmöglichkeit der MDA ist die Herstellung von Referenzmaterial für den GVO-Nachweis in genomischer Proben-DNA. Die mdaDNA kann in diesem Zusammenhang als Positiv-Kontrolle für qualitative Routineanalysen dienen oder im Rahmen von Methodenvvalidierungen eingesetzt werden, bei denen häufig große Mengen Referenzmaterial benötigt werden (siehe auch Roth *et al.* 2008).

Eine weitere Einsatzmöglichkeit für die MDA ist die Herstellung von Rückstellproben. Möglicherweise ist in einigen Fällen eine verbesserte Lagerstabilität der mdaDNA im Vergleich zur genomischen Ausgangs-DNA zu erwarten. Dies gilt besonders in den Fällen, in denen DNA-degradierende Faktoren in der originalen DNA vorhanden sind, die nicht oder nur unzureichend durch Reinigung zu entfernen sind. Durch den Einsatz der MDA würden solche Faktoren stark verdünnt (Gonzalez *et al.* 2005). Auch in Fällen, in denen die originale Proben-DNA in sehr geringer Menge und Konzentration vorliegt, ist eine vergleichsweise höhere Lagerstabilität der resultierenden mdaDNA zu erwarten. Laut Holbrook *et al.* (2005) ist außerdem eine mehrmalige Re-Amplifikation der mdaDNA ohne einen Verlust von Sequenz-Informationen möglich. Die Gültigkeit dieser Aussage für GVO-Proben-DNA ist allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft worden.

Nach Spits *et al.* (2006) kann mdaDNA bei 4 °C oder bei -20 °C für über ein Jahr gelagert werden. Short *et al.* (2005) habe keinen Funktionsverlust oder eine Zunahme der Fehlerrate in verschiedenen Analysemethoden nach einer sechsmonatigen Lagerung bei -20 °C und mehrmaligem Gefrieren und Auftauen festgestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist der Effekt einer Langzeit-Lagerung nicht speziell untersucht worden. Es wurden jedoch ebenfalls keine negativen Effekte nach einer mehrmonatigen Lagerung bei -20 °C beobachtet. Für eine Langzeitlagerung von

mdaDNA aus GVO-Proben sollte die Stabilität der GVO-spezifischen Sequenzen unter verschiedenen Lagerbedingungen in weiteren Untersuchungen getestet werden.

Eine Eignung der mdaDNA für quantitative Analysen ist fraglich. Die Abweichungen in der Repräsentation verschiedener Genomabschnitte sind nur gering; aber schon eine leichte Ungleichmäßigkeit der Vervielfältigung könnte die Quantifizierung des GVO-Gehaltes einer Probe verfälschen. Wenn beispielsweise ein GVO-spezifischer Abschnitt wie der *mail-event* in der mdaDNA leicht überrepräsentiert wäre, würde dies bei der Untersuchung einer MDA-amplifizierten, unbekannt Probe in einer Überschätzung ihres GVO-Gehaltes resultieren. Bei einer Verwendung von mittels MDA hergestelltem Referenzmaterial würde eine Überrepräsentation der *mail*-Sequenz dagegen zu einer Unterschätzung des *mail*-Gehaltes in der unbekannt Proben-DNA führen. Eine Ungleichmäßigkeit der Vervielfältigung in Höhe einer maximal 3,5-fachen Fehlrepräsentation wäre allerdings nur für in der Nähe festgelegter Schwellenwerte gelegene Grenzbereiche relevant. Die Ungleichmäßigkeit der MDA bewegt sich etwa im gleichen Größenbereich wie andere mit der GVO-Analyse zusammenhängende Fehlerquellen. Beispielsweise können Kultivar-spezifische Variationen der Kopienzahlen endogener Referenzgene zwischen gv- und den zugrunde liegenden konventionellen Maislinien zu > 2fachen Fehleinschätzungen des GVO-Gehaltes führen (Broothaerts *et al.* 2008). Bei einem geringen GVO-Gehalt einer Probe können außerdem durch die Probennahme verursachte Fehler auftreten (Paoletti *et al.* 2003).

Das Maß der Über- bzw. Unterrepräsentation der verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Sequenzen bei verschiedenen Proben schien konstant zu sein (Daten nicht dargestellt). Daher ist es denkbar, dass die Reproduzierbarkeit der Genrepräsentation nach der MDA für jeden GVO-*event* und das zugehörige, für die Quantifizierung verwendete, Taxon-spezifische Referenzgen getestet werden könnte. Die Reproduzierbarkeit müsste mit einem statistisch adäquaten Stichprobenumfang für Proben aus verschiedenen Quellen und Materialien überprüft werden. Anschließend könnte möglicherweise ein Korrekturfaktor festgelegt und bei Quantifizierungen einbezogen werden. Zumindest eine sichere „semiquantitative“ Abschätzung im Sinne von Aussagen bezüglich des GVO-Gehalts wie z.B. < 0,1 % oder > 5 % könnte auf diese Weise erreicht werden.

Die MDA ist unkompliziert und mit einer Standard-Laborausrüstung durchführbar. Neu auf dem Markt erhältliche MDA-Kits liefern laut Hersteller sogar deutlich größere DNA-Ausbeuten in kürzerer Zeit als die für diese Arbeit verwendeten Reagenzien. So werden mit dem neuen *GenomiPhi HY DNA Amplification Kit* innerhalb von 3 Stunden etwa 45 µg mdaDNA aus wenigen Nanogramm gDNA generiert (GE Healthcare 2007). Nach Einschätzung der Autorin hat die MDA das Potential, sich als nützliches Werkzeug für die Anreicherung von Proben-DNA für die GVO-Analyse zu etablieren.

2.4 Zusammenfassung

Ein Teilziel dieser Arbeit war die Beurteilung der MDA-Technik hinsichtlich ihrer Eignung für die GVO-Analyse. Es sollte untersucht werden, ob mittels MDA hergestellte DNA (mdaDNA) für die Anreicherung von Proben-DNA – unter anderem für die Entwicklung einer alternativen GVO-Nachweismethode – und die Bereitstellung von Referenzmaterial für die GVO-Detektion verwendet werden kann. Genomische DNA verschiedener gv-Maislinien wurden mit der MDA amplifiziert. Die resultierende mdaDNA wurde gelelektrophoretisch, spektrophotometrisch, fluorometrisch und mit der Real-Time PCR untersucht, um die Ausbeute und Qualität der mdaDNA zu beurteilen. In Real-Time PCR-Analysen wurde das Verhalten der mdaDNA mit dem der ursprünglichen gDNA verglichen. Außerdem wurde die Gleichmäßigkeit der Vervielfältigung verschiedener Genom-Abschnitte geprüft. Unabhängig von der Menge eingesetzter gDNA wurde in der MDA eine konstante Ausbeute hochmolekularer, PCR-amplifizierbarer Mais-DNA generiert, die sich in Real-Time PCR-Analysen identisch zur Ausgangs-DNA verhielt. Die Amplifikation verschiedener Genomabschnitte war weitgehend gleichmäßig. Die mdaDNA ist uneingeschränkt für die qualitative GVO-Analyse geeignet. Sie kann dazu verwendet werden, limitierte Proben-DNA zu vervielfältigen oder Referenzmaterial für Routineanalysen oder Methodenentwicklungen bereitzustellen. Insbesondere sollte es möglich sein, mit der MDA große DNA-Mengen zur Verfügung zu stellen, wie sie für die Entwicklung einer auf direkter genomischer DNA-Hybridisierung basierenden GVO-Nachweismethode benötigt werden.

2.5 Literatur

Adachi, E., Shimamura, K., Wakamatsu, S. & Kodama, H. (2004) Amplification of plant genomic DNA by Phi29 DNA polymerase for use in physical mapping of the hypermethylated genomic region. *Plant Cell Reports* 23:144-147

ABI (2009) Applied Biosystems, URL: http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/index.htm (2010)

Arumugunathan, K. & Earle, E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:208-218

Bergen, A.W., Haque, K.A., Qi, Y., Beerman, M.B., Garcia-Closas, M., Rothman, N. & Chanock, S.J. (2005a) Comparison of Yield and Genotyping Performance of Multiple Displacement Amplification and OmniPlex Whole Genome Amplified DNA Generated from Multiple DNA Sources *Human Mutation* 26 (3):262-270

Bergen, A.W., Qi, Y., Haque, K., Welch, R. & Chanock, S. (2005b) Effects of DNA mass on multiple displacement whole genome amplification and genotyping performance *BMC Biotechnology* 5 (1):24

Blanco, L., Bernad, A., Lazaro, J.M., Martin, G., Garmendia, C. & Salas, M. (1989) Highly Efficient DNA Synthesis by Phage phi29 DNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 264 (15): 8935-8940

- Blanco, L. & Salas, M. (1996) Relating Structure to Function in phi29 DNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 71 (15): 8509-12
- Broothaerts, W., Vincent, S., Matayron, G., Corbisier, P., Trapmann S. & Emons, H. (2008) Incorrect GMO quantification in maize due to cultivar-specific variations in *adh1* copy numbers measured by the validated detection method. *1st Global Conference on GMO Analysis*, URL: <http://gmoglobalconference.jrc.ec.europa.eu/docs/BOA%20Final.pdf> (14.08.2008)
- Busch, U., Pecoraro, S., Posthof, K. & Estendorfer, S. (2004) *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 100 (10):377
- Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J. & Gruden, K. (2006) Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 6:37
- Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L. & Lasken, R.S. (2001) Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification *Genome Research* 11 (6):1095-1099
- Dean, F.B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A.F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S.F., Egholm, M. & Lasken, R.S. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (USA)* 99 (8): 5261-5266
- Dunning, A.M., Talmud, P. & Humphries, S.E. (1988) Errors in Polymerase Chain Reaction. *Nucleic Acids Research* 16 (21): 10393
- Eppendorf (2009) Perfectprep Gel Cleanup Kit Manual, URL: <http://www.eppendorf.de/int/?l=2> (2009)
- Esteban, J.A.; Salas, M. & Blanco, L. (1993) Fidelity of phi29 DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 268 (4): 2719-2726
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132:6-13
- GE Healthcare – Amersham (2003) Biosciences, application note #63005094, URL: <http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/WD%3AUse+of+amplifie%28239367785-B500%29?OpenDocument&hometitle=search> (2010)
- GE Healthcare – Amersham (2007) GenomiPhi Hy DNA Amplification Kit: Product page, URL: <http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=166714> (2010)
- Gonzales, J.M., Portillo, M.C. & Saiz-Jimenez, C. (2005) Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. *Environmental Microbiology* 7 (7):1024-1028
- Gorrochotegui-Escalante, N. & Black 4th, W.C. (2003) Amplifying whole insect genomes with multiple displacement amplification. *Insect Molecular Biology* 12 (2):195-200
- Hellani, A., Coskun, S., Tbakhi, A. & Al-Hassan, S. (2005) Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 10 (3):376-380
- Holbrook, J.F., Stabley, D., Sol-Church, K. (2005) Exploring Whole Genome Amplification as a DNA Recovery Tool for Molecular Genetic Studies. *Journal of Biomolecular Techniques* 16 (2):125-133

- Hosono, S., Faruqi, A.F., Dean, F.B., Du, Y., Sun, Z., Wu, X., Du, J., Kingsmore, S.F., Egholm, M. & Lasken, R.S. (2003) Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Research* 13 (5): 954-964
- ISO (2005a) ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ©ISO AA2005
- ISO (2005b) ISO 21570:2005 Foodstuffs – methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – quantitative nucleic acid based methods. ©ISO AA2005
- Lage, J.M., Leamon, J.H., Pejovic, T. et al. (2003) Whole Genome Analysis of Genetic Alterations in Small DNA Samples Using Hyperbranched Strand Displacement Amplification and Array-CGH. *Genome Research* 13 (2):294-307
- Lasken, R.S. & Egholm, M. (2003) Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends in Biotechnology* 21 (12)
- Lee, C.I., Leong, H.S., Png, A.E., Choo, K.W., Syn, C., Lim, D, H.Y., Kon, O.L. (2006) An isothermal primer extension method for whole genome amplification of fresh and degraded DNA: applications in comparative genomic hybridisation, genotyping and mutation screening. *Nature Protocols* 1 (5): 2185-2194
- Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J., Giustu W., Deetz K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detection PCR product and nucleic acid hybridization *PCR Methods and Applications* 4:357-362. MDA
- Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D.C., Ward, D.C. (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification *Nature Genetics* 19 (3):225-232
- LMBG (2002) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG), Untersuchung von Lebensmitteln - Screeningverfahren zum Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln durch den Nachweis von DNA-Sequenzen, die häufig in gentechnisch veränderten Organismen vorkommen. L 00.00-31. Beuth-Verlag GmbH, Berlin Köln.
- Luthra, R. & Medeiros, L.J. (2004) Isothermal Multiple Displacement Amplification: A Highly Reliable Approach for Generating Unlimited High Molecular Weight Genomic DNA from Clinical Specimens. *Journal of Molecular Diagnostic* 6 (3): 236-242
- Maragh, S., Jakupciak, J.P., Wagner, P.D., Rom, W.N., Sidransky, D., Srivastava, S. & O'Connell, C.D. (2008) Multiple strand displacement amplification of mitochondrial DNA from clinical samples. *BMC Medical Genetics* 7 (9):7
- Mullis, K.B., & Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350
- Paoletti, C.; Donatelli, M.; Kay, S.; Van Den Eede, G. (2003) Simulating kernel lot sampling: the effect of heterogeneity on the detection of GMO contaminations. *Seed Science and Technology* 31(3):629-638
- Pinard, R., de Winter, A., Sarkis, G., Gerstein, M., Tartaro, K., Plant, R., Egholm, M, Rothberg, J. & Leamon, J. (2006) Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 7 (1):216
- QIAGEN (2009) QIAquick PCR Purification Kit Handbook, URL: <http://www1.qiagen.com/literature/> (2010)

- RASSF (2006) Rapid Alert System for Foods and Feed, Annual Report. URL: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm (25.05.2009)
- Ren, Z., Zeng, H.T., Xu, Y.W., Zhuang, G.L., Deng, J., Zhang, C. & Zhou, C.Q. (2009) Preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy by multiple displacement amplification. *Fertility and Sterility* 91 (2):359-364
- Roche Applied Science (2009) URL: www.roche-applied-science.com (2010)
- Ronning, S.B., Vaitilingom, M., Berdal, K.G. & Holst-Jensen, A. (2003) Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). *European Food Research and Technology* 216:347-354
- Roth, L., Zagon, J., Laube, I., Holst-Jensen, A. & Broll, H. (2008) Generation of reference material by the use of multiple displacement amplification (MDA) for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *Food Analytical Methods* 1 (3):181-189
- Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Short, A.D., Kennedy, L.J., Forman, O., Barnes, A., Fretwell, N., Wiggall, R., Thomson, W., Ollier, W.E.R. (2005) Canine DNA Subjected to Whole Genome Amplification is Suitable for a Wide Range of Molecular Applications *Journal of Heredity* 96 (7):829-835
- Sorensen, K.J., Turteltaub, K., Vrankovich, G., Williams, J., Christian, A.T. (2004) Whole-genome amplification of DNA from residual cells left by incidental contact. *Analytical Biochemistry* 2:312-314
- Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. & Sermon, K. (2006) Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nature Protocols* 1 (4):1965-1968
- Stephenson, F.H. (2005) *Mathematik im Labor*. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier, München
- Tranah, G.J., Lescault, P.J., Hunter, D.J., De Vivo, I. (2003) Multiple displacement amplification prior to single nucleotide polymorphism genotyping in epidemiologic studies. *Biotechnology Letters* 25 (13):1031-1036
- Vora, G.J., Meador, C.E., Stenger, D.A. & Andreadis, J.D. (2004) Nucleic Acid Amplification Strategies for DNA Microarray-Based Pathogen Detection. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5):3047-3054

3 Real-Time Immuno-PCR

3.1 Hintergrund

3.1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Methoden für die Detektion von Nukleinsäuren spielen eine große Rolle bei der Identifikation von Zielmolekülen in vielen Anwendungsgebieten (Valasek & Repa 2005, Sambrook & Russell 2001). Auch in der GVO-Analytik werden gv-Lebensmittel und -Futtermittel anhand der veränderten Genomabschnitte des betroffenen Organismus nachgewiesen und quantifiziert. In Europa hat sich dafür die *event*-spezifische Detektion - mittels klassischer PCR für den qualitativen Nachweis und mittels Real-Time PCR für quantitative Analysen - als Methode der Wahl etabliert (Holst-Jensen *et al.* 2003). Die PCR ist für Routineanalysen geeignet; allerdings muss für jede Probe und jeden zu untersuchenden GVO-*event* eine separate Reaktion angesetzt und durchgeführt werden. Dies verursacht bei hohem Probenaufkommen einen großen Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand. Der gleichzeitige PCR-Nachweis mehrerer GVO in einem Reaktionsansatz (Multiplex-PCR) ist problematisch und bestenfalls auf einige wenige Zielsequenzen begrenzt anwendbar (Walsh *et al.* 1992). Insofern stellt die separate, individuelle Amplifikation in der PCR bei umfangreichen Untersuchungen den „Flaschenhals“ in der Analytik dar.

Auf der anderen Seite ermöglichen Array-Technologien die parallele Detektion vieler verschiedener Zielsequenzen in einem einzelnen Hybridisierungsexperiment. Es werden verschiedene Methoden der Hybridisierung für die parallele DNA-Detektion bei einer Vielzahl von biotechnologischen und diagnostischen Anwendungen eingesetzt. Beispiele hierfür sind differentielle Genexpressionsstudien, SNP-Analysen und die Identifizierung von GVO (Schäferling & Nagl 2006). Den Methoden gemeinsam ist das Prinzip der Detektion einer spezifischen Nukleinsäure-Sequenz in einer unbekannt Probe durch Hybridisierung an DNA-Sensormoleküle (Fangsonden) mit bekannter Sequenz, welche auf einem festen Träger immobilisiert wurden. Während mit den verfügbaren Array-Systemen beispielsweise RNA (cDNA) in Expressionsstudien direkt nachgewiesen werden kann (Schäferling & Nagl 2006), ist der parallele Nachweis von GVO in komplexen Pflanzen-Genomen mit den derzeitigen Hybridisierungstechnologien nur nach einer vorhergehenden Amplifikation der Zielsequenzen möglich. Beispielsweise werden vor einer GVO-Detektion mit dem DualChip® mehrere PCRs durchgeführt (Leimanis *et al.* 2008).

Hybridisierungstechniken eröffnen die Möglichkeit für Analysen mit einem hohen Proben-durchsatz. Allerdings ist die Anwendung durch mehrere Probleme beschränkt. So hat der Einsatz von DNA-Fangsonden einige Nachteile bezüglich ihrer Sensitivität und Selektivität (Weiler *et al.*

1997). Eine mögliche Alternative bietet die Verwendung synthetischer DNA-Derivate mit im Vergleich zu klassischen DNA-Sonden veränderten Bindungseigenschaften (siehe Abschnitt 3.1.2).

Weitere Beschränkungen von Hybridisierungstechniken ergeben sich bei der Erfassung der detektierten Zielsequenzen: Unabhängig von der Art der eingesetzten Fangsonden muss die gebundene Ziel-DNA nach der Hybridisierung sichtbar gemacht werden, d.h. die Detektion wird in ein Hybridisierungssignal umgewandelt. Diese Visualisierung kann durch verschiedene Herangehensweisen erfolgen, beispielsweise durch eine Markierung mit fluoreszierenden oder chemilumineszierenden Farbstoffen oder anderen nachweisbaren Molekülen. Außerdem gibt es Strategien für markierungsfreie Methoden der Sichtbarmachung. Dazu gehören z.B. die Oberflächenplasmonenmikroskopie (*surface plasmon microscopy*, Schäferling & Nagl 2006) oder Maldi-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight*, Brandt *et al.* 2003). Der limitierende Faktor für die Sensitivität einer Hybridisierungsmethode ist häufig die Schwäche der Hybridisierungssignale. Wie für die Untersuchung von RNA (cDNA) ist die Sensitivität von Arraysystemen auch für die Analyse von genomischer DNA in kleineren Genomen (z.B. von Bakterien) häufig ausreichend. Bei großen Genomen stoßen die Hybridisierungstechniken jedoch an ihre Grenzen. Für die Detektion eines *single copy*-Gens in einem Genom mit einer Größe von 10^8 bis 10^9 bp durch direkte Hybridisierung liegt die Menge der zu detektierenden DNA im attomolaren bis femtomolaren Bereich (Lucarelli *et al.* 2008). Ohne eine vorherige Zielsequenz-Amplifikation muss für den direkten Nachweis eines Einzelkopie-Gens in einem Genom der Größenordnung von 10^9 bp 1000mal mehr genomische Proben-DNA eingesetzt werden als im Fall einer bakteriellen DNA der Größenordnung 10^6 bp. Da im Fall des Bakterien-Genoms 1000mal weniger Proben-DNA für eine Detektion ausreicht, erleichtert dort ein geringerer Hintergrund an unspezifischer DNA in der Hybridisierungsreaktion die Detektion.

Deshalb wird in der Regel bei Untersuchungen von menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Genomen die gesuchte DNA-Sequenz mittels PCR oder verwandter Techniken der Zielsequenz-Amplifikation vervielfältigt, um die Komplexität der DNA zu reduzieren (Schweitzer & Kingsmore 2001).

Eine weitere Möglichkeit, um die aus einer geringen Konzentration der Zielsequenz folgende Signalschwäche zu überwinden, ist der Einsatz einer Methode zur Signal-Amplifikation. In der Literatur wurden verschiedene Methoden der Signal-Amplifikation beschrieben. Zu den neueren Methoden gehören z.B. *surface-enhanced fluorescence* (Fritzsche & Taton 2003) und der Einsatz elektrochemischer Biosensoren (Lucarelli *et al.* 2008). Jedoch ist keine der verfügbaren Methoden ausreichend sensitiv für die Analyse unamplifizierter genomischer DNA, wenn komplexe Genome (z.B. von Säugetieren, Pflanzen) untersucht werden sollen. Bis heute ist der direkte Nachweis von *single copy*-Zielsequenzen mittels auf Oberflächen immobilisierter Fangsonden nicht zuverlässig

möglich (Lucarelli *et al.* 2008), von vereinzelten Ausnahmen abgesehen (z.B. Patolsky *et al.* 2001, Bao *et al.* 2005, Minunni *et al.* 2005).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einsatz der MDA-Technik für die Anreicherung von Proben-DNA für die GVO-Analyse untersucht (siehe Kapitel 2). Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Entwicklung einer Methode für den Sequenz-spezifischen Nachweis von DNA als Alternative zur PCR. An die gesuchte Methode wurden die folgenden Anforderungen gestellt.

Eine geeignete Methode sollte den parallelen Nachweis mehrerer DNA-Sequenzen in einem gemeinsamen Reaktionsaufbau ermöglichen. Gleichzeitig sollte die Durchführung individueller Zielsequenz-Amplifikationen wie bei der PCR vermieden werden. Um das Risiko für Kontaminationen und Pipettierfehler gering zu halten, sollte außerdem berücksichtigt werden, dass alle Schritte der Detektion möglichst im gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Diese Anforderung war auch im Hinblick auf eine mögliche spätere Automatisierung von Bedeutung. Die gesuchte Nachweismethode sollte die Ziel-DNA mit einer hohen Sensitivität, Selektivität und Wiederholbarkeit detektieren. Gefordert war vorerst die Entwicklung einer Methode für den qualitativen DNA-Nachweis. Jedoch sollte auch die Möglichkeit einer quantitativen Anwendung überprüft werden.

Eine Methode, die die oben genannten Anforderungen erfüllt, könnte für den Nachweis von GVO-spezifischen DNA-Sequenzen eingesetzt werden. Idealerweise sollte die Methode ermöglichen, *single copy*-Zielsequenzen in unamplifizierter genomischer oder mittels MDA amplifizierter DNA zu detektieren. Mithilfe der in Kapitel 2 vorgestellten MDA-Technik könnten ausreichende Mengen an Ausgangsmaterial für eine direkte DNA-Detektion bereitgestellt werden, sodass durch eine Kombination der beiden Methoden eine Alternative zur PCR für die GVO-Analyse zur Verfügung stünde.

Das Ziel war daher zunächst die Entwicklung einer geeigneten methodischen Strategie, mit der die genannten Anforderung zu erfüllen waren. Als Basis für die Entwicklung einer neuen DNA-Nachweis-Methode schien der Einsatz einer Hybridisierungstechnik passend zu sein, da die DNA-Hybridisierung an Sequenz-spezifische Fangsonden für die parallele Detektion mehrerer Zielsequenzen eine geeignete und hochentwickelte Technik ist (Schäferling & Nagl 2006). Es mussten ein geeignetes Format und leistungsstarke Fangsonden ausgewählt werden, mit denen eine besonders sensitive und selektive DNA-Detektion möglich ist. Außerdem war eine Strategie für die Immobilisierung der Sonden auf einer geeigneten Oberfläche zu entwickeln.

Die geforderte besonders hohe Sensitivität der DNA-Detektion ohne eine vorherige Zielsequenz-Amplifikation konnte möglicherweise durch eine Signal-Amplifikation erreicht werden. Im Forschungsgebiet der Protein-Analytik ist ein Prinzip der Signalverstärkung bekannt, bei dem die enorme Amplifikationsfähigkeit der PCR für die Visualisierung immunologischer Detektionssig-

nale genutzt wird, ohne dass individuelle PCRs durchgeführt werden müssen. Bei dieser Methode handelt es sich um die Immuno-PCR (iPCR; Sano *et al.* 1992; siehe Abschnitt 3.1.3). Für die Entwicklung einer neuen DNA-Nachweismethode für die GVO-Analyse war die Kombination einer Hybridisierungstechnik mit einer Signalverstärkung nach dem Grundprinzip der iPCR ein möglicher Lösungsweg.

Nach der Entwicklung einer methodischen Strategie sollte diese umgesetzt und ihre grundsätzliche Durchführbarkeit im Modellversuch geprüft werden (*proof-of-concept*). Bei erfolgreicher Durchführung war die Leistungsfähigkeit der Methode unter optimierten Bedingungen durch geeignete Parameter zu charakterisieren. Neben einer Prüfung von Selektivität und Sensitivität der DNA-Detektion sollte die Mess- und Wiederholpräzision der Methode bestimmt werden. Ein weitergehendes Ziel – in Abhängigkeit von den erreichten Ergebnissen – war der mögliche Einsatz der neuen Nachweismethode für die direkte Detektion von GVO-spezifischen Zielsequenzen in genomischer DNA ohne eine vorherige Amplifikation.

3.1.2 Peptidnukleinsäure

3.1.2.1 Eigenschaften von Peptidnukleinsäure

Der Sequenz-spezifische DNA-Nachweis mit Hybridisierungstechniken ist seit vielen Jahren bekannt (Southern 1975) und wird als Routine-Technik eingesetzt (Sambrook & Russell 2001). Für die DNA-Detektion mit immobilisierten Fangsonden werden in der Regel DNA-Sonden verschiedener Länge und Herkunft verwendet. Der Einsatz von DNA-Sonden für die DNA-Hybridisierung hat allerdings mehrere Nachteile, die häufig in einer unzureichenden Sensitivität und/oder Selektivität resultieren. Während kurze Oligomer-Sonden eine hohe Selektivität aufweisen, ist die Sensitivität der Detektion oft unzureichend, weil der mit dem Zielmolekül gebildete Duplex nur eine geringe Stabilität hat. Die Verwendung längerer Sonden (z.B. PCR-Produkte) verbessert die Sensitivität, weil die Duplex-Stabilität höher ist. Allerdings ist bei langen Sonden die Selektivität reduziert (Weiler *et al.* 1997, Guo *et al.* 1994). Zusätzlich erfordert eine spezifische Hybridisierung von Ziel-DNA an eine DNA-Sonde eine Umgebung mit hoher Salzkonzentration. Diese wird benötigt, um die Abstoßung der negativ geladenen DNA-Stränge aufzuheben. Unter Hochsalz-Bedingungen jedoch neigt DNA zur Bildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen innerhalb der Moleküle. Dies kann die Zugänglichkeit der Zielsequenzen und damit die Sensitivität negativ beeinflussen.

Im Jahr 1997 haben Weiler *et al.* die Verwendung von Peptidnukleinsäure (*peptide nucleic acid*, PNA) für die Herstellung von Sonden vorgestellt, die in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt wurden. PNA ist ein synthetisches DNA-Derivat, das von Nielsen *et al.* (1991) entwickelt wurde. Bei der PNA wurde das Zucker-Phosphat-Rückgrat der natürlich vorkommenden Nukleotidketten

durch ein achirales und ladungsneutrales *N*-(2-aminoethyl)glycin-Gerüst ersetzt (Abbildung 3-1). Die Hybridisierung von PNA mit komplementären DNA- (und RNA-) Molekülen erfolgt nach den Watson-Crick-Basenpaarungsregeln in paralleler oder antiparalleler Richtung, wobei letztere die bevorzugte und stärkere Hybridisierung ist (Egholm *et al.*, 1993). Hierbei hybridisiert der N-Terminus der PNA mit dem 3'-Ende der DNA. Der N-Terminus der PNA entspricht dem 5'-Ende und der C-Terminus dem 3'-Ende der DNA.

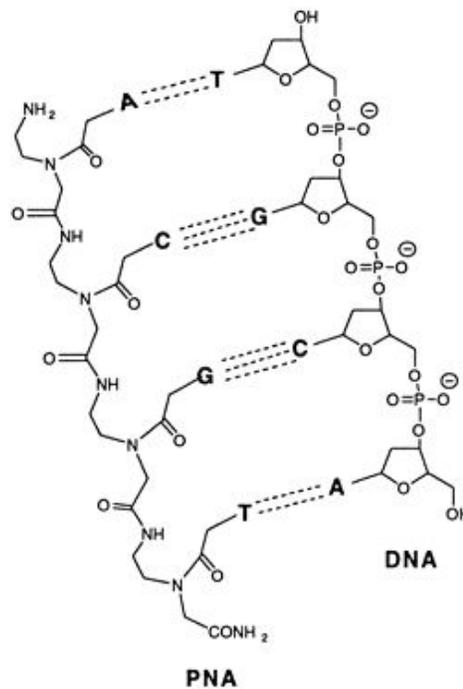


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung eines PNA/DNA-Duplexes zum Vergleich der chemischen Struktur von PNA und DNA. (Aus Biochemistry Online 2009)

Bei einem Einsatz in Hybridisierungsexperimenten bieten PNA-Sonden einige Vorteile gegenüber den klassischen DNA-Sonden. Durch das ungeladene Peptid-Rückgrat der PNA müssen geringere Abstoßungskräfte zwischen den Molekülen überwunden werden, so dass PNA/DNA- und PNA/RNA-Duplexe wesentlich stärker und schneller hybridisieren als vergleichbare DNA/DNA- oder DNA/RNA-Duplexe (Schwarz *et al.* 1999; Giesen *et al.* 1998). Die resultierende festere Bindung ist vor allem dann von Vorteil, wenn bei Hybridisierungstechniken intensive Waschschritte angewendet werden. Aufgrund ihrer neutralen Ladungseigenschaften erlauben PNA-Sonden die Hybridisierung von DNA auch unter Niedrigsalzbedingungen. Da komplexe Ziel-DNA unter diesen Bedingungen weniger sekundäre und tertiäre Strukturen aufweist, kann daraus eine verbesserte Zugänglichkeit der Zielsequenzen für die Sondenmoleküle resultieren.

Infolge der beschriebenen Eigenschaften bindet komplementäre Ziel-DNA in Hybridisierungsexperimenten schneller und fester an PNA- als an vergleichbare DNA-Sonden. Der resul-

tierende Sensitivitätsgewinn ist aufgrund der selektiven Eigenschaften der PNA mit einer höheren Spezifität der Detektion verbunden (Weiler *et al.* 1997, Ray & Norden 2000). PNA-Sonden weisen in der Regel eine höhere Selektivität gegenüber Fehlpaarungen (*mismatch selectivity*) auf als vergleichbare DNA-Sonden (Egholm *et al.* 1993). Somit lassen sich Punktmutationen in DNA mit PNA-Sonden spezifischer detektieren als mit vergleichbaren DNA-Oligonukleotiden (Ross *et al.* 1997, Perry-O'Keefe *et al.* 1996).

PNA-Moleküle sind sowohl chemisch als auch thermisch sehr stabil und werden nicht oder kaum durch Endonukleasen, Exonukleasen oder Proteasen abgebaut (Demidov *et al.* 1995).

Eine weitere Eigenschaft von PNA ist ihr Vermögen, DNA-Doppelstränge Sequenz-spezifisch zu erkennen und in diese zu interkalieren. Die PNA Moleküle überwinden hierzu die Hybridisierungs-entropie des DNA-Duplexes, brechen den bereits gepaarten Doppelstrang auf und gehen eine neue Struktur mit ihm ein (Pfeffer *et al.* 1993).

Die genannten Eigenschaften lassen PNA als besonders geeignet für den Einsatz für eine spezifische und selektive DNA-Detektion erscheinen – vor allem unter Bedingungen, die eine DNA-Bindung an Fangsonden erschweren oder strapazieren. Als die Bindung erschwerende Faktoren sind eine schlechte Zugänglichkeit der Zielsequenzen, beispielsweise in komplexer genomischer DNA, und ungünstige Hybridisierungsbedingungen zu nennen. Eine besondere Strapazierung der DNA-Bindung ist bei einer Hybridisierungstechnik vorstellbar, bei der ungewöhnlich viele und/oder intensive Waschschrte angewendet werden. Diese Faktoren kamen bei den für diese Arbeit denkbaren methodischen Strategien zusammen und deuteten auf eine mögliche Eignung von PNA-Molekülen für die Verwendung als Fangsonden in der angestrebten DNA-Nachweismethode hin.

3.1.2.2 Anwendungen von Peptidnukleinsäure

In der molekularbiologischen Forschung wird PNA vor allem für die Analyse von Biomolekülen in biotechnologischen und diagnostischen Anwendungen eingesetzt.

Bei vielen Verfahren werden PNA-Moleküle für Hybridisierungsreaktionen in homogener Lösung verwendet. Beispielsweise werden beim *PCR-clamping* Punktmutationen nachgewiesen, indem PNA-Sonden an die Wildtyp-Sequenzen gebunden werden, um ausschließlich die PCR-Amplifikation mutierter Sequenzen zuzulassen (Orum *et al.* 1993). Ein weiteres Beispiel sind mit Fluoreszenz-Farbstoffen modifizierte PNA-Moleküle, die in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) verwendet werden, um komplementäre Sequenzen in Zellen zu markieren. Bei FISH-Analysen von Cyanobakterien wiesen PNA-Sonden wesentlich höhere Signalintensitäten auf als vergleichbare DNA-Sonden (Worden *et al.* 2000). Analog zu DNA-Molekülen, können auch PNA-Moleküle nach einer speziellen Modifikation mit einem Fluoreszenz- und einem Quencher-Molekül als *molecular beacons* eingesetzt werden, die nur im hybridisierten Zustand ein Fluoreszenz-Signal

abgeben. Bei zusätzlicher Verwendung sogenannter *PNA-opener* kann auch doppelsträngige DNA detektiert werden (Kuhn *et al.* 2001). Dagegen sind *Light-up probes* mit einem Thiazolorange-Farbstoff modifizierte PNA-Sonden, die erst nach erfolgreicher Hybridisierung mit DNA fluoreszieren. *Light-up-probes* können z.B. für FISH oder zur Visualisierung von PCR-Produkten verwendet werden (Isacsson *et al.* 2000). Weiterhin bietet die *Pre-gel*-Hybridisierung von Ziel-DNA mit PNA-Sonden eine Alternative zum zeit- und arbeitsaufwendigeren Southern Blot (Perry-O'Keefe *et al.* 1996).

Andererseits können PNA-Moleküle als Fangsonden für die Nukleinsäure-Detektion auf Oberflächen immobilisiert werden. Die zu analysierende DNA kann mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sein wie beispielsweise bei einer DNA-Detektion mit auf Mikropartikeln immobilisierten PNA-Sonden (Chandler & Jarrell 2003). Mit PNA-Microarrays (in Kombination mit einer vorherigen Zielsequenz-Amplifikation mittels PCR) wurden verschiedene GVO in Lebensmitteln nachgewiesen (z.B. Germini *et al.* 2005). Ebenso ist eine Detektion unmarkierter Ziel-DNA möglich: Nach der Hybridisierung mit immobilisierten PNA-Sonden kann gebundene DNA mit der *surface plasmon resonance* (SPR, Oberflächenplasmonresonanz)-Technik nachgewiesen werden (Burgener *et al.* 2000). Brandt *et al.* (2003) gelang der markierungsfreie DNA-Nachweis auf PNA-Microarrays mittels *time-of-flight-secondary ion mass spectrometry*-Analyse (TOF-SIMS). Das TOF-SIMS-Verfahren detektiert die gebundene Ziel-DNA anhand ihrer Phosphat-Ionen, die den PNA-Sonden fehlen.

3.1.3 Immuno-PCR

3.1.3.1 Prinzip der Immuno-PCR für die Proteindetektion

Die Immuno-PCR (iPCR) ist eine Methode aus dem Bereich der Proteinanalytik. Das Grundprinzip des Verfahrens wurde von Sano *et al.* (1992) entwickelt, um den Vorteil der PCR, Analyten exponentiell vervielfältigen zu können, für die Protein-Detektion zu nutzen. Die Methode kombiniert die immunologische Detektion eines *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) mit dem exponentiellen Amplifikationsvermögen der PCR und erlaubt eine 100 bis 10.000fach höhere Sensitivität der Protein-Detektion im Vergleich zum ELISA (Niemeyer *et al.* 2005, Barletta 2006).

Der grundsätzliche Aufbau der iPCR gleicht dem eines ELISA. Nach der Detektion des Antigens nach dem ELISA-Prinzip erfolgt jedoch die Sichtbarmachung des Detektions-Antikörpers nicht durch eine Enzym-vermittelte Substrat-Umsetzung (z.B. Farbreaktion). Stattdessen wird an den Detektions-Antikörper ein DNA-Marker-Fragment, die sogenannte *reporter*-DNA gebunden, die mit der PCR vervielfältigt und quantifiziert wird. In Abbildung 3-2 wird das Funktionsprinzip eines herkömmlichen ELISAs mit dem einer iPCR schematisch verglichen.

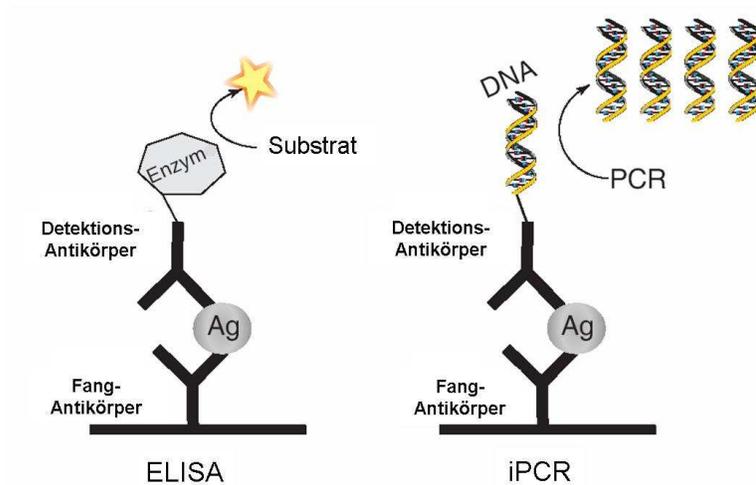


Abbildung 3-2 Vergleichende Darstellung der Funktionsprinzipien von ELISA und iPCR. (Modifiziert nach Niemeyer *et al.* 2005)

Eine mögliche Strategie für die Bindung der *reporter*-DNA an den Detektions-Antikörper ist die von Sano *et al.* (1992) vorgeschlagene Verwendung einer Streptavidin/Protein A-Chimäre (Abbildung 3-3a). Sie kann den Detektions-Antikörper mit einer biotinylierten *reporter*-DNA verbinden, verursacht aber vergleichsweise hohe Hintergrundsignale in der iPCR. Bei der am häufigsten eingesetzten Methode wird dagegen ein Biotin-modifizierter Detektions-Antikörper verwendet. Nach Zugabe von Streptavidin (STV) kann die ebenfalls biotinylierte *reporter*-DNA gebunden werden (Abbildung 3-3b). Eine dritte Möglichkeit ist die Verwendung von Detektions-Antikörpern, die kovalent an eine *reporter*-DNA gekoppelt sind (Abbildung 3-3c). Die Herstellung und notwendige Aufreinigung dieser Konjugate ist allerdings aufwendig und kompliziert, und nur wenige Antikörper überstehen sie unbeschadet (Niemeyer *et al.* 2005).

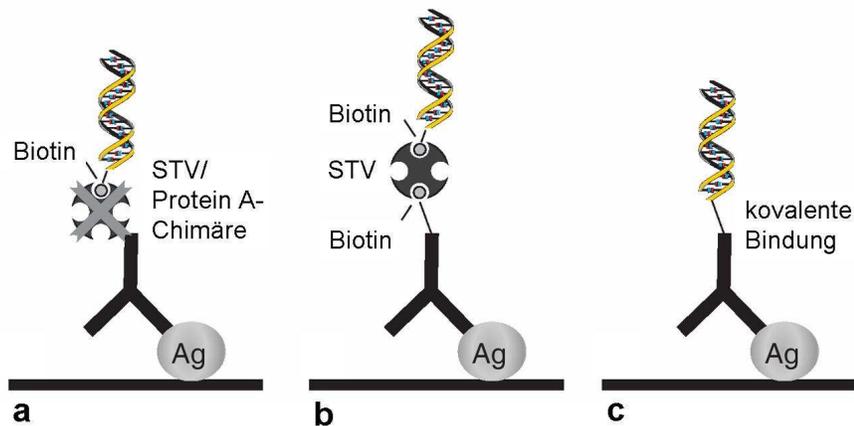


Abbildung 3-3 Detektionsstrategien für die Protein-Detektion mit der iPCR. Ein Detektions-Antikörper bindet an das Antigen (Ag). Zu den Reagenzien, mit denen anschließend in der iPCR die *reporter*-DNA an den Detektionsantikörper gebunden werden kann, gehören STV/Protein A-Chimären, die als Bindeglied zwischen Biotin-modifizierter *reporter*-DNA und der Fc-Region des Antikörpers dienen (a), eine Kombination aus STV, biotinylierter *reporter*-DNA und biotinyliertem Antikörper (b) und kovalent gekoppelte Antikörper-DNA-Konjugate (c). (Modifiziert nach Niemeyer *et al.* 2005)

Nach der PCR-Amplifikation einer in der *reporter*-DNA enthaltenen Sequenz erfolgte die Visualisierung und Quantifizierung des Detektionssignals ursprünglich durch eine gelelektrophoretische Auftrennung des aus einer klassischen PCR resultierenden PCR-Produkts als Endpunkt-Bestimmung (Sano *et al.* 1992, Niemeyer *et al.* 1999, Saito *et al.* 1999). Werden die Amplifikate jedoch erst am Ende der PCR beurteilt, erschwert dies die Einschätzung von Amplifikations-Effizienzen und Plateaueffekten und damit die korrekte Quantifizierung der PCR-Produkte. Sims *et al.* (2000) haben erstmals das Detektionsformat der Real-Time PCR auf die iPCR übertragen. Bei der Real-Time PCR kann die DNA bereits in der frühen exponentiellen Reaktionsphase quantifiziert werden. Außerdem kann nach der PCR auf eine zeitaufwendige Manipulation der Produkte verzichtet werden, die immer auch mit den Risiken der Carry-Over Kontamination und Pipettierungenauigkeiten verbunden ist.

Die Real-Time-Analyse kann zudem im Vergleich zur Endpunkt-Analyse eine bis zu drei Größenordnungen sensitivere Detektion ergeben (Schiavo *et al.* 2005). In neueren Publikationen (z.B. Barletta *et al.* 2004, Lind & Kubista 2005, Adler *et al.* 2005a) wurde daher ausschließlich das Format der Real-Time Immuno-PCR (RT-iPCR) angewendet.

3.1.3.2 Anwendungen der Immuno-PCR für die Proteindetektion

Die RT-iPCR wird für die ultra-sensitiven Detektion von Proteinen eingesetzt. Beispiele sind der Nachweis des *Clostridium botulinum*-Neurotoxins A (Wu *et al.* 2001) und des Lebensmittelaller-

gens Gliadin (Henterich 2003). Eine besondere Bedeutung als Zielmoleküle für die Entwicklung von RT-iPCR-Anwendungen haben virale Proteine, weil diese im frühen Infektionsstadium häufig in sehr geringen Konzentrationen auftreten. Die iPCR wird beispielsweise erfolgreich für den Nachweis des Hepatitis B-Virus (HBV, z.B. Cao *et al.* 2000) und des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV, z.B. Barletta *et al.* 2004) angewendet. Die Sensitivität der HBV-Detektion mit der RT-iPCR konnte im Vergleich zum ELISA um das 700fache erhöht werden. Barletta *et al.* (2004) erreichten beim Nachweis von HIV eine höhere Sensitivität mit der RT-iPCR als mit der Reverse Transkriptase-PCR. Eine weitere große Gruppe von iPCR-Anwendungen bildet der Nachweis von Tumor-assoziierten Antigenen, z.B. dem Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α , z.B. Saito *et al.* 1999, Komatsu *et al.* 2001). Marker-Proteine für andere Krankheiten (z.B. Osteoporose und Autoimmunerkrankungen) und Entzündungsmarker wurden ebenfalls mit der RT-iPCR untersucht (Niemeyer *et al.* 2005). Einige Anwendungen haben die Schwelle zur Routine-Labortechnik überwunden (Adler *et al.* 2003). Neben Proteinen können auch kleinere Moleküle mit der RT-iPCR nachgewiesen werden. Für den Nachweis des biogenen Amins Serotonin wurde das Format einer kompetitiven iPCR, analog zum kompetitiven ELISA, entwickelt (Adler *et al.* 2005b).

Bei allen in der Literatur beschriebenen Anwendungen wurden Moleküle über eine immunologische Antigen/Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Es wurden keine Publikationen gefunden, bei denen von einem Versuch berichtet wurde, Nukleinsäuren mit dem iPCR-Prinzip nachzuweisen.

3.2 Methoden

3.2.1 Sequenzdatenbank-Recherche, Primer- und Sonden-Design

Für die Suche nach geeigneten Zielsequenzen zur Identifizierung von Taxon- und GVO-spezifischen Abschnitten im Mais-Genom wurde die Sequenzdatenbank des U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI; NCBI 2009) verwendet. Primer und Sonden für die klassische PCR und die Real-Time PCR sowie Fangsonden für die RT-iPCR wurden mit Hilfe der Software-Programme *PrimerExpress* und *PrimerPremier* ausgewählt und analysiert. In die Prüfung wurden Kriterien wie Schmelztemperatur, GC-Gehalt und eine mögliche Bildung von Primer- und *self*-Dimeren sowie Haarnadelstrukturen einbezogen. Abschließend wurden die ausgewählten Sequenzen mit Hilfe des Online-Programmes *blastn* (Nukleotide-nucleotide BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.* 1990) durch einen Vergleich mit bekannten Sequenzen in der Sequenzdatenbank des NCBI (NCBI 2009) auf ihre Spezifität geprüft. Die Sequenzen der PNA-Sonden wurden zusätzlich mit der Online-Software *PNA Probe Designer* von Applied Biosystems analysiert (ABI Probe Designer 2009).

3.2.2 Klassische PCR

Die klassische PCR wurde einerseits für die Herstellung der *reporter*-DNA als Bestandteil des RT-iPCR-Detektionskonjugats verwendet. Andererseits wurden PCR-Amplifikate verschiedener Längen hergestellt, die zu den PNA-Sonden komplementäre Sequenzen enthielten und als Zielmoleküle in der RT-iPCR dienten.

Das Funktionsprinzip der PCR ist in Abschnitt 2.2.6 erläutert. Für die Durchführung der klassischen PCR (hiernach „PCR“ genannt) wurde das *Hotstar Taq PCR Core Kit* verwendet. Es wurde ein *Mastermix* aus den Kit-Komponenten und den PCR-Primern für die Anzahl der durchgeführten Reaktionen plus einer Leerkontrolle (No Template Control, NTC) hergestellt. Die Leerkontrolle enthielt *A. purif.* anstelle von DNA. Der Kit-Reaktionspuffer enthielt neben MgCl₂ auch Tris-HCl, KCl und (NH₄)₂SO₄ in unbekannter Konzentration. Der pH-Wert war mit 8,7 angegeben. Für Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden die einzelnen Komponenten typischerweise in den Mengen zugesetzt, die in Tabelle 3-1 angeführten Endkonzentrationen ergaben.

Tabelle 3-1 Zusammensetzung der Reaktionen für die klassische PCR.

<i>Substanz</i>	<i>Ausgangskonzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Volumen pro Ansatz (µl)^{a)}</i>
Reaktionspuffer	10 x	1 x	5,0
inkl. MgCl ₂	15 mM	1,5 mM	
MgCl ₂	25 mM	variabel	variabel
dNTPs	10 mM ^{b)}	0,5 µM	2,5
Primer <i>sense</i>	20 µM	0,5 µM	1,25
Primer <i>antisense</i>	20 µM	0,5 µM	1,25
HotStar Taq	5 U/µl	2,5 U/Ansatz	0,5
<i>A. purif.</i>			ad 50
DNA	variabel	variabel	1-5

^{a)} Bezogen auf die Herstellung eines *Mastermixes* für Reaktionsansätze mit einem Volumen von 50 µl; ^{b)} dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 2,5 mM.

Die PCR wurde in der Regel im *GeneAmp PCR System 9700* durchgeführt. Für die Optimierung der Annealing-Temperatur wurde ein Gradientencycler verwendet. In Tabelle 3-2 ist ein typisches PCR-Temperaturprogramm dargestellt.

Tabelle 3-2 Temperaturprogramm für die klassische PCR.

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	12 min	
Denaturierung	95	30 sek	} 30-40
Annealing	Variabel ^{a)}	30 sek	
Elongation	72	30 sek	
Finale Elongation	72	7 min	
Kühlung	4	∞	

^a Die Annealing-Temperatur in der PCR richtet sich nach der Länge und Sequenz der verwendeten Primer. Eine zu niedrig gewählte Temperatur führt zu unspezifischen Produkten. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, führt dies zu einer hohen thermischen Bewegung der Primer, die möglicherweise in einer fehlenden oder nur ineffizienten Produktbildung resultiert. Die optimale Temperatur liegt häufig etwa 2–3 °C unter der Schmelztemperatur der Primersequenzen. Dies entspricht meist einer Temperatur zwischen 50 und 60 °C. Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur wurde ein Gradientencycler verwendet, der innerhalb des Heizblocks einen Temperaturgradienten aufbaut. Der Temperaturgradient wird über das Cycler-Programm gesteuert.

3.2.3 Ziel-DNA für die RT-iPCR

3.2.3.1 Synthetische Oligonukleotide

Für die Optimierung und Validierung der DNA-Detektion mittels RT-iPCR im Sinne eines *proof-of-concept* wurden kurze, einzelsträngige Ziel-Moleküle benötigt, die zu den Fangsonden komplementäre Sequenzen in bekannter Menge enthielten. Dafür wurden Moleküle verschiedener Größen ausgewählt. Biotinylierte Oligonukleotide mit 16, 30 oder 48 Basen wurden von der Firma Tib Molbiol (Berlin) synthetisiert, HPLC-gereinigt, in lyophilisiertem Zustand geliefert; in *A. purif.* gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Sequenzen der Moleküle wurden in einer Weise gestaltet, die eine anti-parallele Hybridisierung mit den korrespondierenden PNA-Sonden ermöglichte.

3.2.3.2 PCR-Amplifikate

Längere, doppelsträngige Ziel-Moleküle mit ca. 50, 70 oder 500 bp wurden mittels PCR hergestellt. Die Namen und Sequenzen der Primer sind in Tabelle 4-8 aufgeführt. Für die Biotinylierung der Moleküle wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt: Wenn nicht näher beschrieben, waren die PCR-Primer biotinyliert und wurden für die Herstellung von bis-biotinylierten Amplifikaten verwendet. Um in einigen Fällen eine vielfache (Multi-) Biotinylierung der PCR-Amplifikate zu erreichen, wurde die herkömmliche dNTP-Mischung in der PCR durch eine Mischung aus dATP : dCTP : dGTP : dTTP : Biotin-dUTP im Verhältnis von 1 : 1 : 1 : 0,65 : 0,35 ersetzt. Nach der PCR wurden die Produkte aufgereinigt wie unter 3.2.4 beschrieben.

3.2.3.3 Genomische Hintergrund-DNA

Um das Vorhandensein genomischer Hintergrund-DNA zu simulieren, wurde genomische DNA oder mdaDNA biotinyliert und in der RT-iPCR mit verschiedenen Zielmolekülen gemischt eingesetzt. Für die Herstellung von Hintergrund-DNA wurde bovine genomische DNA aus Muskelgewebe verwendet.

a) mdaDNA

Zur Herstellung von mdaDNA wurden je 50 ng Ausgangs-DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die MDA wurde durchgeführt wie unter 2.2.5.1 beschrieben. Für die Biotinylierung wurden je 8 µl der mdaDNA einer Klenow-Biotinylierung unterzogen wie unter 2.2.5.2 beschrieben. Nach der Markierung wurde die DNA 1:1 mit *A. purif.* verdünnt, um die Viskosität der Lösung zu verringern.

b) gDNA

Für eine 3'-Markierung von DNA mit Terminaler Transferase wurde gDNA verwendet, um einem bereits optimierten Protokoll gemäß einer persönlichen Mitteilung von Arne Holst-Jensen (Veterinary Institute, Oslo/Norwegen) exakt folgen zu können. Bei dem auch *end labeling* genannten Verfahren wird einzel- oder doppelsträngige Proben-DNA von dem Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) unspezifisch an ihrem 3'-Ende mit einem modifizierten Desoxynucleotid markiert. Vor der Biotinylierung wurden 70 µg gDNA durch Inkubation mit 6 U DNase in 1x DNase-Puffer bei 37 °C für 5 min fragmentiert. Anschließend wurde die DNase bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Die fragmentierte DNA wurde einer Phenol-Chloroform-Reinigung und Ethanol-Präzipitation mit Ammoniumacetat unterzogen. Anschließend wurde die gereinigte DNA mit 90 U TdT und 5 nmol Biotin-ddUTP in 1x *end labeling*-Puffer in 300 µl Gesamtvolumen für 2 h bei 37 °C biotinyliert. Eine Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 95 °C für 10 min.

c) Überprüfung der Biotinylierung

Nach der Markierung wurden mdaDNA und gDNA einer Phenol-Chloroform-Reinigung und Ethanol-Präzipitation mit Ammoniumacetat unterzogen, um überschüssige Biotin-dNTPs zu entfernen. Die gereinigte DNA wurde entsprechend ihrem vor der Reinigung vorhandenen Volumen in *A. purif.* gelöst. Anschließend wurde geprüft, ob die Biotinylierung erfolgreich war. Dazu wurde je eine Verdünnungsreihe der ungereinigten und der gereinigten markierten DNA hergestellt, und je 1 µl jeder Verdünnungsstufe wurde in der Dot-Blot-Apparatur auf eine mit *A. bidest.* befeuchtete, positiv geladene Nylonmembran aufgetragen. Da der Biotin-Gehalt in der ungereinigten DNA bekannt war, diente diese als Vergleich, um den Erfolg der Biotinylierung in der gereinigten DNA zu überprüfen. Die DNA wurde mit UV-Licht mit 120 J/cm² auf der Membran fixiert. Dann wurde unter Verwendung des *DIG Wash and Block Buffer Sets* die Membran für 5 min mit 50 ml Waschpuffer befeuchtet und für 1 h unter Schütteln in 35 ml 5x Blocking Solution inkubiert. Es folgte eine

30-minütige Inkubation unter Schütteln in 20 ml Konjugatlösung, die 200 mU/ml Streptavidin (STV)/Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat in 5x Blocking Solution enthielt. Nach zweimaligem Waschen für je 15 min in 100 ml Waschpuffer wurde die Membran für 5 min in 20 ml Detektionspuffer äquilibriert. Gebundenes Detektionskonjugat wurde durch eine 5-minütige Inkubation in NBT/BCIP-Lösung sichtbar gemacht. Die Farbreaktion, bei der das chromogene Substrat NBT/BCIP von der AP zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt wird, wurde durch mehrmaliges Spülen in *A. bidest.* gestoppt.

3.2.4 Präparative Agarose-Gele und DNA-Aufreinigung

Nach der PCR wurden die Produkte sowie ein geeigneter DNA-Längenstandard in einem 1,5 %igen, großvolumigen Agarose-Gel unter Verwendung breiter Geltaschen aufgetrennt wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Die Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte wurden auf dem UV-Tisch visualisiert und die gewünschten Produkte ausgeschnitten und für die anschließende Reinigung in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus der Agarose erfolgte mit dem *Perfectprep Gel Cleanup Kit* nach dem Protokoll des Herstellers (Eppendorf 2009). Die Methode basiert auf der reversiblen Adsorption von Nukleinsäuren an eine Glasfaser-membran. Die Agarose wurde in 3 Volumenteilen einer chaotropen Lösung bei 50 °C verflüssigt und der Ansatz nach Zugabe eines Volumenteils Isopropanol auf eine Säule mit Glasfasermembran gegeben. Die nach Zentrifugation gebundene DNA wurde durch Waschen von Salzen und organischen Molekülen befreit und anschließend in 30 µl *A. purif.* eluiert. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in einem Kontroll-Gel erneut aufgetrennt, und ihre Konzentration wurde anhand eines Vergleichs mit einem geeigneten Längenstandard sowie mittels Spektrophotometrie abgeschätzt.

3.2.5 PNA-Sonden

Die PNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Applied Biosystems (USA) und später aus patentrechtlichen Gründen von der Firma Panagene (Korea) synthetisiert. Sie wurden von den Herstellern mit einer N-terminalen Digoxigenin (Dig)-Markierung und zwei O-„Linkern“ versehen, HPLC-gereinigt und lyophilisiert geliefert. Die Sonden wurden auf Grundlage der Mengenangabe des Herstellers in einer Konzentration von 100 µM in *A. purif.* zuerst für 15 min bei Raumtemperatur und anschließend für 10 min bei 50 °C unter wiederholtem Vortexen gelöst. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch überprüft. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge

ε = Extinktionskoeffizient der gemessenen Substanz bei der gleichen Wellenlänge

Methoden

c = Konzentration der gemessenen Substanz

d = Schichtdicke der verwendeten Küvette

Molare Extinktionskoeffizienten der PNA-Monomere bei 260 nm:

PNA A-Monomer: $13,7 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

PNA C-Monomer: $6,6 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

PNA G-Monomer: $8,6 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

PNA T-Monomer: $11,7 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Der Extinktionskoeffizient für ein definiertes PNA-Molekül berechnet sich hieraus zu

$$\varepsilon_{ges} = (A_{Anzahl} \cdot 13,7 + C_{Anzahl} \cdot 6,6 + G_{Anzahl} \cdot 8,6 + T_{Anzahl} \cdot 11,7) \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} .$$

Die Konzentration (c) einer PNA-Lösung ist somit

$$c \left[\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \right] = \frac{E_{260}}{\varepsilon_{ges} \cdot d} .$$

E_{260} = gemessener Extinktionswert bei 260 nm Wellenlänge

d = Schichtdicke der verwendeten Küvette = 1 cm^{*}

Bei den Berechnungen muss beachtet werden, dass einzelsträngige PNA-Moleküle bei Raumtemperatur dazu neigen, sich aneinanderzulagern. Dadurch wird eine Hypochromizität verursacht, die den Extinktionswert um ca. 15-25 % verringert. Folglich liegen die tatsächlichen Konzentrationen um etwa 20 % höher als die bei Raumtemperatur berechneten Werte. Nach der Überprüfung der Konzentration wurden die PNA-Lösungen aliquotiert. Die jeweils 5 nmol PNA-Oligonukleotide enthaltenden Aliquots wurden in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C eingetrocknet und bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen einzelner Aliquots wurden diese wie oben beschrieben in Wasser gelöst und nach einer erneuten Überprüfung der Konzentration bei 4 °C für bis zu 6 Wochen gelagert.

3.2.6 Plattenbeschichtung und PNA-Immobilisierung

Für die Detektion von DNA mittels RT-iPCR mussten die Fangsonden auf einer festen Oberfläche immobilisiert werden. Um das Risiko für Pipettierfehler und Kontaminationen zu minimieren, sollten möglichst alle Reaktionsschritte in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Für diesen Zweck geeignete Reaktionsgefäße mussten sowohl die Immobilisierung von Fangsonden er-

* Das NanoDrop-Spektrophotometer normalisiert die Messergebnisse automatisch auf eine Schichtdicke von 1 cm, wenn es für die Nukleinsäuremessung eingestellt ist.

möglichen als auch für den Einsatz in Real-Time PCR-Analysen geeignet sein. Ein ohne zu großen technischen Aufwand durchführbares Verfahren für die Immobilisierung von Fangsonden ist das Fixieren auf einer ausgewählten Oberfläche durch eine immunologische Interaktion. Zu diesem Zweck wird die Oberfläche mit einem Antikörper beschichtet. Anschließend können mit dem entsprechenden Antigen markierte Sonden auf der beschichteten Oberfläche immobilisiert werden. Das Prinzip des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Verfahrens für die PNA-Immobilisierung mittels Digoxigenin/Anti-Digoxigenin-Interaktion ist in Abbildung 3-4 schematisch dargestellt.

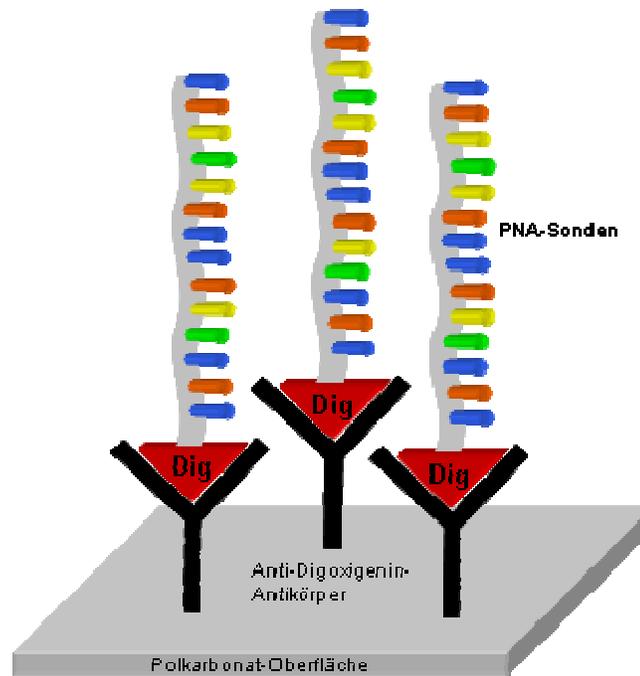


Abbildung 3-4 Immobilisierung der PNA-Sonden mithilfe immunologischer Interaktion. Mikrotiterplatten aus Polykarbonat werden mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper beschichtet. An diese Antikörper können Digoxigenin (Dig)-modifizierte PNA-Sonden binden.

Üblicherweise werden aus Polypropylen bestehende Gefäße für die Real-Time PCR verwendet. Dieses Material hat für die Real-Time PCR geeignete optische Eigenschaften und ist chemisch und biologisch inert, um die Funktion der *Taq*-Polymerase nicht zu beeinträchtigen. Daher weist die Polypropylen-Oberfläche nur eine sehr geringe Bindungskapazität für Proteine auf. Herkömmliche Gefäße aus Polykarbonat, wie sie für Immunoassays wie den ELISA verwendet werden, sind jedoch weder bezüglich ihres Formats noch hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften für den Einsatz in Real-Time PCR-Geräten geeignet. Die Firma Roboscreen (Leipzig) hat spezielle Mikrotitergefäße entwickelt, die eine hohe Proteinbindungskapazität aufweisen und daher mit verschiedenen Proteinen beschichtet werden können. Gleichzeitig sind diese *Robostrips* Real-Time PCR-kompatibel.

Es wurden bis zu 12 *Robostrips*, jeweils bestehend aus 8 zusammenhängenden Mikrotitergefäßen, auf einem *tray/retainer set* arrangiert und mit Klebeband befestigt. Auf diese Weise standen Mikrotiterplatten mit bis zu 96 Vertiefungen zur Verfügung. Mithilfe einer 8-Kanal-Multipipette wurden in jede Kavität 30 µl eines in PBS gelösten polyklonalen Anti-Digoxigenin-Antikörpers gegeben. Den Herstellerangaben entsprechend wurde der Antikörper zunächst in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Platten wurden mit Klebefolie verschlossen, kurz bei 1000 g an zentrifugiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Coating-Puffer durch Ausklopfen der Platten auf saugfähigem Papier entfernt. Die Platten wurden 3x mit je 300 µl RT-iPCR-Waschpuffer bei Raumtemperatur und unter orbitalem Schütteln (200 rpm) gewaschen (2x 30 sek, 1x 2 min) und dann mit je 300 µl 1x Blockinglösung befüllt, mit Klebefolie verschlossen und bei 4 °C gelagert. Das Blocken unspezifischer Protein- und DNA-Bindungsstellen erfolgte in der Regel mindestens über Nacht, in Einzelfällen nur für 6 h. Zum Teil wurden die mit Blockinglösung gefüllten Platten vor der Weiterverwendung bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt.

Vor dem Binden der PNA-Sonden wurde die Blockinglösung durch Ausklopfen entfernt, und die Platten wurden 2x für 30 sek mit Waschpuffer gewaschen. Die Digoxigenin-modifizierten PNA-Sonden wurden in 1:1 mit Waschpuffer verdünnter Blockinglösung auf verschiedene Konzentrationen eingestellt und je 30 µl PNA-Lösung wurde auf die mit Anti-Digoxigenin beschichteten Platten gegeben. Die Platten wurden verschlossen, an zentrifugiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Vor der Hybridisierung wurde die Sonden-Lösung durch Ausklopfen entfernt. Die Platten wurden 3x mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen (2x 30 sek, 1x 2 min) und erneut mit je 300 µl Blockinglösung für 10-15 min bei Raumtemperatur geblockt. Nach der Optimierung der Versuchsbedingungen wurde die Blockinglösung für alle Blocking-Schritte der RT-iPCR 1:1 mit Waschpuffer verdünnt eingesetzt.

3.2.7 Herstellung der *reporter*-DNA

Die Durchführung der klassischen PCR für die Herstellung der *reporter*-DNA ist in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Es wurden 50 ng pUC19-Plasmid-DNA je Reaktion und eine MgCl₂-Endkonzentration von 1,5 mM eingesetzt. Nach der PCR wurde das Produkt in einem 1,5 %igen Agarose-Gel unter Anfärbung mit Ethidiumbromid aufgetrennt und auf dem UV-Tisch sichtbar gemacht. Wegen der Biotin-Markierung der *reporter*-DNA wurde auf eine Aufreinigung der Produkte aus dem Gel verzichtet. Um Agarose- oder Farbstoffreste sowie die in die PCR eingesetzte Plasmid-DNA sicher zu entfernen, wurde stattdessen mehrmals etwa 1 µl des *reporter*-DNA-Fragments mit einer Pipettenspitze aus der Bande entnommen und in parallelen PCR-Ansätzen unter den gleichen Bedingungen re-amplifiziert. Die re-amplifizierte *reporter*-DNA wurde mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* gereinigt wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Anschließend wurden alle Ansätze vereinigt, und ein Aliquot wurde in einem Kontroll-Gel aufgetrennt. Durch den Vergleich mit einem geeigneten DNA-

Standard wurde eine Mengenabschätzung vorgenommen. Zusätzlich wurde die DNA-Konzentration mittels Spektrophotometrie bestimmt. Um wiederholte Gefrier/Auftau-Zyklen zu vermeiden, wurde die *reporter*-DNA in 30 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

3.2.8 Herstellung des Detektionskonjugats

Das Detektionskonjugat für die RT-iPCR wurde leicht modifiziert nach Niemeyer *et al.* (1999) hergestellt. Durch das Mischen von STV und Biotin-modifizierter DNA lässt sich durch Selbstanordnung (*self-assembly*) eine Verbindung der Moleküle zu stabilen Nanostrukturen erreichen, deren Form abhängig von Konzentration und Mischverhältnis der Komponenten ist. Mithilfe des tetravalenten Streptavidins als Vernetzungsmittel (*cross-linking agent*) lagern sich die doppelsträngigen, biotinylierten DNA-Moleküle zu oligomeren, zweidimensionalen Strukturen zusammen, die eine hohe Anzahl an terminalen STV-Molekülen aufweisen (Niemeyer *et al.* 2005). Die letzteren liefern Bindungsstellen für die Detektion biotinylierter Ziel-DNA. Mit dem Rasterkraftmikroskop lassen sich die Konjugate optisch darstellen (Abbildung 3-5).

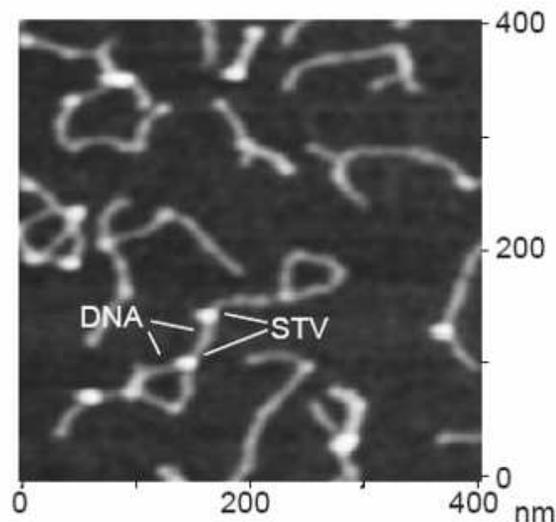


Abbildung 3-5 Rasterkraftmikroskopisches Bild von durch Selbstanordnung hergestellten oligomeren STV-DNA-Konjugaten. (Aus Niemeyer *et al.* 2005)

Für die Konjugat-Herstellung wurde 1 mg STV in 1 ml *A. purif.* für 30 min unter wiederholtem Vortexen gelöst. Diese 19,2 µM (1 mg/µl) STV-Stammlösung wurde zur Konservierung mit 0,1 % (w/v) Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Für jeden Versuch wurde das Detektionskonjugat frisch hergestellt, indem 2,5 µl der STV-Stammlösung mit 124 µl Konjugatpuffer gemischt und anschließend 5,25 µl einer 9,5 µM *reporter*-DNA-Lösung zugegeben wurden, sodass STV und *reporter*-DNA in einem Verhältnis von 1:1 vorlagen. Im Rahmen der Optimierung wurde dieses Mischverhältnis zum Teil verändert. Das Konjugat wurde für 60 - 90 min bei 4 °C in-

kubiert. Direkt vor der Anwendung für die Detektion wurde die RT-iPCR-Konjugatlösung durch Zugabe von 5 µl des Konjugats zu 4,5 ml Blockinglösung hergestellt. Dies entspricht jeweils einer 0,4 nM Konzentration für *reporter*-DNA und STV im Detektionsschritt der RT-iPCR.

3.2.9 Durchführung der RT-iPCR

Aus den mit Anti-Digoxigenin und PNA-Sonden beschichteten, geblockten Platten wurde die Blockinglösung durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Die Hybridisierung erfolgte mit je 30 µl Hybridisierungslösung pro Mikrotiterkavität. Die Lösung enthielt unterschiedliche Konzentrationen biotinylierter DNA in Blockinglösung. Doppelsträngige Ziel-DNA (PCR-Fragmente) wurde vor der Hybridisierung für 6 min bei 95 °C im Thermocycler denaturiert, gefolgt von einer sofortigen Abkühlung im Eisbad für 2 min. In allen Versuchen wurde eine Hybridisierungs-Leerkontrolle (*blank control*, BC) in Mehrfachbestimmungen mitgeführt, die anstatt der Hybridisierungslösung reine Blockinglösung enthielten. Zusätzlich wurden in vielen Versuchen negative Hybridisierungskontrollen (*negative hybridization controls*, NHCs) mitgeführt, die DNA enthielten, die zur eingesetzten Fangsonde nicht komplementär war. Die Platten wurden mit Klebefolie verschlossen, kurz bei 1000 g zentrifugiert und in Folie eingeschweißt bei 38 °C im Wasserbad für 1 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung durch Ausklopfen entfernt und die Platten wurden mit je 300 µl Waschpuffer 5x gewaschen (3x 30 sek, 2x 4 min) und dann erneut für 10-15 min mit je 300 µl Blockinglösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Zu jeder Reaktion wurden dann 30 µl Konjugatlösung gegeben, die das präformierte Detektionskonjugat in 1:1 mit Waschpuffer verdünnter Blockinglösung enthielt. Nach kurzer Zentrifugation der verschlossenen Platten erfolgte die Konjugat-Bindung bei Raumtemperatur für 35 min unter Schütteln. Anschließend wurde ungebundenes Detektionskonjugat durch Ausklopfen entfernt, und die Platten wurden 8x mit je 300 µl Waschpuffer pro Mikrotiterkavität gewaschen (5x 30 sek, 3x 4 min). Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 300 µl *A. bidest.* (1x 1 min, 1x 4 min), bevor in jede Vertiefung 30 µl des vorbereiteten *TaqMan-Mastermixes* gegeben wurden.

Das Funktionsprinzip und die Durchführung der Real-Time PCR sind unter 2.2.6.2 beschrieben. Alle RT-iPCR-Analysen wurden mit dem Real-Time PCR-Gerät ABI Prism 7700 SDS durchgeführt. Die Zusammensetzung des *Mastermixes* ist in Tabelle 3-3 aufgeführt. In der Regel wurden zusätzlich zu den Hybridisierungs-Leerproben (siehe oben) Real-Time PCR-Leerproben (qPCR-NTCs) als Dreifachbestimmung mitgeführt, bei denen je 30 µl *Mastermix* in frische Reaktionsgefäße gefüllt wurde. Aus Gründen der Platzersparnis wurde später zum Teil auf die qPCR-NTCs verzichtet. Als Positiv-Kontrollen wurden bekannte Mengen der für die Herstellung der *reporter*-DNA verwendeten pUC19-Plasmid-DNA in einem Volumen von 1 µl vorgelegt. Nach der Zugabe des *Mastermixes* wurden die Platten mit für die Real-Time PCR geeigneter Klebefolie verschlossen und

anzentrifugiert. Anschließend wurde eine Real-Time PCR-Analyse mit dem in Tabelle 3-4 aufgeführten Temperaturprogramm durchgeführt.

Nach jedem RT-iPCR-Lauf wurden die Daten mit der Gerätesoftware analysiert. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Baseline für die Berechnung der Hintergrundfluoreszenz auf die ersten 3-15 Zyklen und der Threshold (ΔR_n) auf 0,2 festgelegt, um einen direkten Vergleich der absoluten C_T -Werte aus verschiedenen Versuchen zu ermöglichen. Die Daten wurden anschließend als C_T -Werte und zum Teil als Fluoreszenzwerte (*Clipped Data*) in das MS Excel-Format exportiert.

Tabelle 3-3 Zusammensetzung der *TaqMan*-Reaktionen für die RT-iPCR.

Substanz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen pro Ansatz (μl) ^{a)}
Reaktionspuffer	2x	1x	15
inkl. MgCl_2	10 mM	5 mM	
Primer <i>sense</i>	20 μM	300 nM	0,45
Primer <i>antisense</i>	20 μM	300 nM	0,45
Sonde	20 μM	200 nM	0,3
<i>A. purif.</i>			ad 30

^a Bezogen auf die Herstellung eines *Mastermixes* für Reaktionsansätze mit einem Volumen von 30 μl .

Tabelle 3-4 Temperaturprogramm für die RT-iPCR.

Vorgang	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	
Denaturierung	95	15 sek	} 30-40
Annealing und Elongation	65	1 min	

3.2.10 Denaturierung mit Blocking-Oligonukleotiden

Bei der Untersuchung einer alternativen Denaturierungs-Strategie für die Auftrennung doppelsträngiger Zielmoleküle vor dem Hybridisierungsschritt der RT-iPCR wurde verfahren wie von Minunni *et al.* (2005) beschrieben. Als Blocking-Nukleotide, die ein *re-annealing* der Einzelstränge nach der thermischen Denaturierung verhindern sollen, wurden den Reaktionen vor der Denaturierung unmarkierte Oligonukleotide zugegeben, die den zur Herstellung der Zielmoleküle verwendeten Primern entsprachen. Es wurde darauf geachtet, dass die zur Fangsonde komplementären Sequenzen der Zielmoleküle sich nicht mit den Primersequenzen überschneiden. Die Konzentration der Blocking-Oligonukleotide lag im Bereich von 200 nM bis 2 μM (gelöst in *A. purif.* oder PCR-Puffer). Daraus resultierte ein 100 bis 1000facher molarer Überschuss jedes Primers zum jeweiligen Zielmolekül während des Annealings. Vor dem Hybridisierungsschritt der RT-iPCR wurde die

Ziel-DNA bei 95 °C für 6 min denaturiert. Es folgte eine einminütige Inkubation bei einer Temperatur von 45 bis 54 °C. Diese Annealing-Temperatur richtete sich zunächst nach der Schmelztemperatur der verwendeten Primer und wurde zwecks Optimierung variiert.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Auswahl einer methodischen Strategie

Nachdem gezeigt wurde, dass die MDA ein geeignetes Werkzeug für die Bereitstellung großer Mengen Proben-DNA für die GVO-Analyse ist (siehe Abschnitt 2.3.2.3), sollte versucht werden, eine Methode für den Nachweis GVO-spezifischer Sequenzen durch direkte Hybridisierung an Fangsonden zu entwickeln. Der methodische Ansatz sollte die parallele Detektion mehrerer Zielsequenzen in einem gemeinsamen Versuchsaufbau ermöglichen.

3.3.1.1 Voraussetzungen

Um die grundsätzliche Durchführbarkeit einer direkten Detektion zu testen, wurden einige Vorversuche mittels Southern-Hybridisierung im Dot Blot-Format durchgeführt. Hierbei kann zum Einen die Proben-DNA auf einer Nylon-Membran fixiert werden, um vorhandene GVO-Sequenzen mit markierten Detektionssonden nachzuweisen. Bei der zweiten Herangehensweise befinden sich Fangsonden auf der Membran, und fragmentierte, markierte Proben-DNA wird mit den Sonden hybridisiert. Mit beiden Varianten wurde versucht, Einzelkopie-Sequenzen in Mais-DNA nachzuweisen.

Die grundsätzliche Sensitivität des Detektionssystems für den Nachweis des Mais-spezifischen *Zein*-Gens wurde mit einer Digoxigenin-markierten Detektionssonde (280 bp) bestimmt. Mit dieser Sonde konnten etwa 5 pg der komplementären DNA (PCR-Amplikon) nachgewiesen werden. Die Detektion des Gens in 10 - 20 µg gDNA oder mdaDNA nach Fixierung der DNA auf einer Nylonmembran gelang mit einer schwachen Signalintensität. Die Anwendung der zweiten Strategie, d.h. der Nachweis des *Zein*-Gens durch Hybridisierung markierter Mais-DNA mit immobilisierten Fangsonden, war jedoch nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

Die folgenden Berechnungen bezüglich der für eine erfolgreiche Detektion GVO-spezifischer Sequenzen in Pflanzen-DNA benötigten Sensitivität machten deutlich, dass der direkte Nachweis nicht unmöglich war aber eine umfangreiche Optimierung der Hybridisierungsbedingungen und vor allem ein sehr empfindliches Visualisierungssystem erforderte.

Die klassische Southern Blot/Dot Blot-Methode ist für die Detektion von Einzelkopie-Sequenzen in kleineren Genomen mit einer Größe im Bereich von 10⁶ bp (z.B. bakterielle Genome) gut geeignet. Bei den etwa um den Faktor 1000 komplexeren Pflanzen-Genomen stößt man mit derselben Methode jedoch auf Schwierigkeiten. Das haploide Mais-Genom hat eine Größe von etwa

2,65E+09 bp. Dies entspricht einem Gewicht von 2,86 pg pro haploide Genomkopie. Ein PCR-Fragment mit 280 bp wiegt ungefähr 3,02E-07 pg. Dementsprechend enthalten 5 pg des PCR-Fragments 8,27E+06 Kopien der zu detektierenden Sequenz. Daher müssten mit dem verwendeten Detektionssystem 8,27E+07 Kopien der Mais-gDNA oder -mdaDNA für den Nachweis einer Einzelkopie-Sequenz auf die Membran aufgetragen werden. Diese Kopienzahl entspricht einer Menge von 24 µg, die im gleichen Größenbereich liegt wie die in den Vorversuchen eingesetzte DNA-Menge, in der – wenn auch mit einem schwachen Signal – das *Zein*-Gen detektiert werden konnte.

Für die zu entwickelnde GVO-Nachweismethode wurde aber die erwähnte zweite Strategie favorisiert, bei der markierte genomische Proben-DNA mit immobilisierten Fangsonden hybridisiert wird. Diese Herangehensweise eröffnet mehr Möglichkeiten der Parallelisierung, weil außer möglichen Versuchsaufbauten nach dem Dot Blot- oder Mikrotiter-Prinzip auch eine Übertragung auf ein Array-Format denkbar wäre.

Mit klassischen Visualisierungs-Systemen lässt sich etwa 0,1 pg markierter genomischer DNA nachweisen, die auf eine Nylonmembran aufgetragen wurde (Roche Applied Science 2009). Dies bedeutet, dass mindestens 0,1 pg genomische DNA spezifisch durch Fangsonden gebunden werden muss. Bei Annahme einer durchschnittlichen Fragmentgröße der markierten gDNA oder mdaDNA von 500 bp mit einem Fragment-Gewicht von je etwa 5,4E-07 pg müssen daher mindestens 1,85E+05 dieser Fragmente für eine erfolgreiche Sichtbarmachung hybridisiert sein*. Bei einer theoretischen Hybridisierungsrate von 100 % der in der Hybridisierungslösung befindlichen, zu den Fangsonden komplementären Fragmente müssten 530 ng Proben-DNA in der Hybridisierung eingesetzt werden. Sogar diese Menge würde in einem Southern oder Dot Blot zu einem hohen Hintergrund bei der Detektion führen, und in der Praxis wäre der Einsatz einer deutlich größeren DNA-Menge nötig, weil nur ein Teil der in der Lösung vorhandenen Ziel-Fragmente tatsächlich gebunden würde.

3.3.1.2 Kombination von MDA-Vervielfältigung und RT-iPCR für den GVO-Nachweis

Nach gründlicher Literaturrecherche wurde eine neue Strategie für den parallelen, Sequenz-spezifischen Nachweis von DNA entwickelt. Die resultierende Herangehensweise beinhaltet eine Kombination aus komplementärer Hybridisierung, immunologischer Detektion und einer Signal-Amplifikation, die auf dem Prinzip der Real-Time immuno-PCR (RT-iPCR) basiert. Die RT-iPCR wird in der Protein-Analytik erfolgreich für die ultra-sensitive Detektion von Proteinen eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.3.2). Das Prinzip der Protein-Detektion mittels RT-iPCR beinhaltet neben dem

* Eine Verkleinerung der durchschnittlichen Fragmentgröße der Proben-DNA auf 500 bp wird in der Regel angestrebt, um sterische Hinderungen während der Hybridisierung zu vermeiden.

immunologischen Nachweis eines gesuchten Antigens oder Antikörpers mit einem EIA (*enzyme immunoassay*) Reaktionsschritte für eine Signal-Amplifikation mittels einer uniformen PCR unter Vermeidung individueller Zielsequenz-Amplifikationen. Dieses Prinzip der Signal-Amplifikation sollte für die vorliegende Arbeit mit einer sequenzspezifischen Hybridisierung kombiniert und so für die Detektion von DNA mittels oberflächengebundener Fangsonden modifiziert werden.

Es wurde eine für die Umsetzung und Prüfung der beschriebenen Strategie geeignete Methodik zusammengestellt:

Um eine parallele DNA-Detektion durchführen zu können, musste eine Hybridisierungstechnik ausgewählt, an die neue Methode angepasst und etabliert werden. Es wurde entschieden, anstelle einer herkömmlichen DNA/DNA-Hybridisierungstechnik eine PNA/DNA-Hybridisierung einzusetzen. PNA-Fangsonden schienen aufgrund ihrer überlegenen Bindungseigenschaften (siehe Abschnitt 3.1.2.1) besonders geeignet für die Umsetzung der gewählten methodischen Strategie zu sein. Geeignete PNA-Sonden wurden entwickelt und bereitgestellt (siehe Abschnitt 3.3.4).

Bei der Auswahl eines geeigneten Formats für die Immobilisierung der PNA-Sonden und Durchführung der Hybridisierungen sollte berücksichtigt werden, dass alle Schritte der Detektion möglichst in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt werden sollten. Durch eine Immobilisierung der Sonden in Real-Time PCR-kompatiblen Mikrotiterkavitäten ließ sich die Anforderung erfüllen. Die ausgewählten Mikrotiter-Strips (*Robostrips*) waren sowohl für eine Immobilisierung der PNA-Sonden geeignet als auch Real-Time PCR-kompatibel. Der Vorteil dieser Strategie ist die Möglichkeit, auf einer Mikrotiterplatte parallel mehrere Fangsonden mit unterschiedlichen Sequenzen zu immobilisieren und so verschiedene Zielsequenzen auf einer Platte nachzuweisen. Trotzdem können für die gesamte Mikrotiterplatte das gleiche Detektionskonjugat und der gleiche Real-Time PCR-*Mastermix* verwendet werden. Auf diese Weise wird das Ansetzen individueller PCRs für verschiedene Zielsequenzen vermieden.

Aus den möglichen RT-iPCR-Varianten zur Kopplung von Detektions-Antikörper und *reporter*-DNA (siehe Abschnitt 3.1.3.1) wurde ein Ansatz nach Niemeyer *et al.* (1999) ausgewählt, bei dem ein Detektionskonjugat durch Selbstanordnung von STV und *reporter*-DNA angefertigt wird (siehe Abschnitt 3.3.6). Es wurden eine *reporter*-DNA und ein zugehöriges Real-Time PCR-System entwickelt und hergestellt (siehe Abschnitt 3.3.5).

Außerdem wurden DNA-Zielmoleküle bereitgestellt (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.3.7). Zuerst musste mithilfe synthetischer DNA-Oligonukleotide ein Modellsystem für die Detektion entwickelt werden. In diesem Modell sollten ein *proof-of-concept* der Methode erbracht und einzelne Reaktionsschritte, Pufferzusammensetzungen etc. optimiert werden (siehe Abschnitte 3.3.8 und 3.3.9). Anschließend sollte die grundsätzliche Leistungsfähigkeit der Nachweis-Methode bezüglich ihrer Sensitivität, Selektivität, Präzision und Wiederholbarkeit evaluiert werden (siehe Abschnitte

3.3.10 und 3.3.11). Zusätzlich sollte die Methode für den Nachweis von PCR-amplifizierten, GVO-spezifischen Sequenzen aus echter Proben-DNA eingesetzt werden (siehe Abschnitt 3.3.12). Abschließend sollte zuerst das in echtem Probenmaterial vorhandene Hintergrundrauschen durch den Einsatz genomischer DNA als Hintergrund-DNA simuliert werden (siehe Abschnitt 3.3.13). Im Falle einer ausreichenden Sensitivität sollte die Methode dann entsprechend der schematischen Darstellung in Abbildung 3-6 für die direkte GVO-Detektion in echter, mit der MDA amplifizierter Proben-DNA eingesetzt werden.

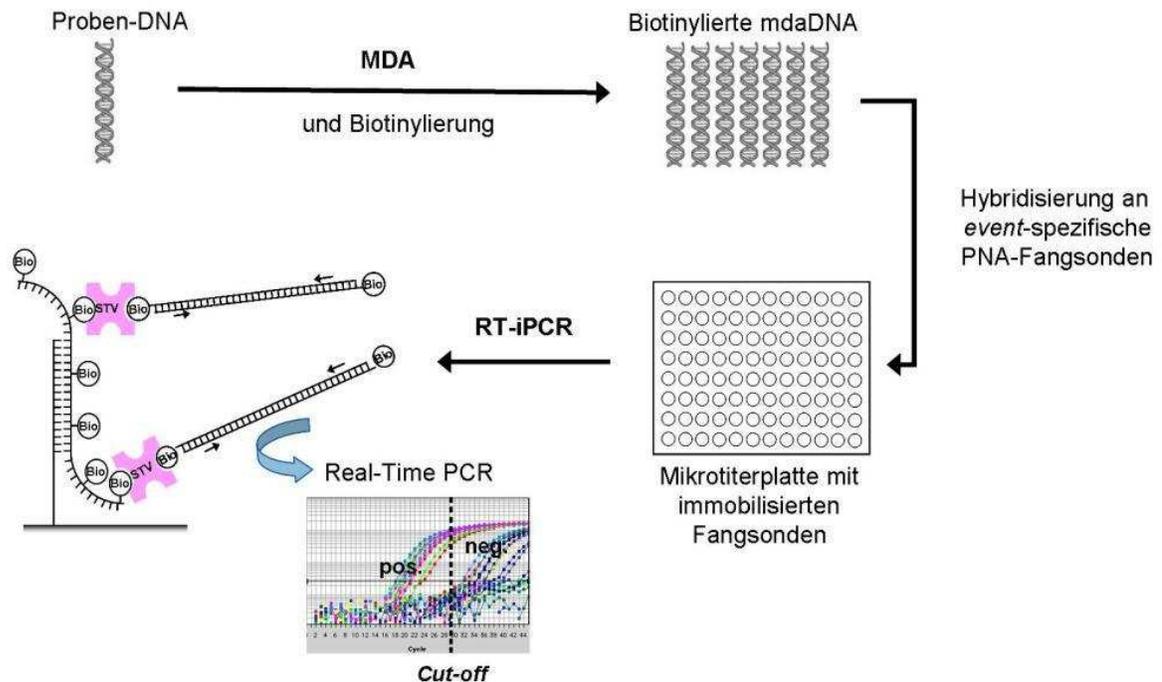


Abbildung 3-6 Schematische Darstellung einer möglichen Kombination der MDA-Technik als Mittel für die Bereitstellung von Proben-DNA und der neuen Nachweismethode auf Basis der RT-iPCR.

3.3.2 Funktionsprinzip der RT-iPCR für die DNA-Detektion

In den folgenden Abbildungen sind vergleichend die Detektionsprinzipien der RT-iPCR für die Proteindetektion (Abbildung 3-7) und der für die Detektion von DNA modifizierten RT-iPCR (Abbildung 3-8) dargestellt. Bei der Protein-Analyse basiert die RT-iPCR auf einer Detektion nach dem ELISA-Prinzip (Abbildung 3-7a und b). Für die DNA-Detektion dagegen dient ein auf der Oberfläche einer Mikrotiterkavität immobilisiertes PNA-Oligomer als Fangsonde für die komplementäre Ziel-DNA (Abbildung 3-8a und b). Die Ziel-DNA ist im dargestellten Fall ein 16-basiges, mit Biotin markiertes Oligonukleotid-Molekül. Die weiteren Schritte der RT-iPCR sind für die Protein- und die DNA-Detektion gleich (Abbildung 3-7c und Abbildung 3-8c): Zu dem gebundenen Ziel-Molekül wird ein präformiertes Detektionskonjugat gegeben, das sich aus Streptavidin (STV)

und einem bis-biotinylierten, doppelsträngigen DNA-Molekül, der *reporter*-DNA, zusammensetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *reporter*-DNA hat eine Länge von 226 bp und weist eine nicht in Pflanzenmaterial vorkommende Sequenz auf. Das Detektionskonjugat bindet über die immunologische Biotin/STV-Interaktion an die mit der Fangsonde verbundene Ziel-DNA und kann mittels Real-Time PCR quantifiziert werden. Dafür wird ein *TaqMan*-System eingesetzt, das einen Abschnitt innerhalb der *reporter*-DNA-Sequenz amplifiziert und visualisiert.

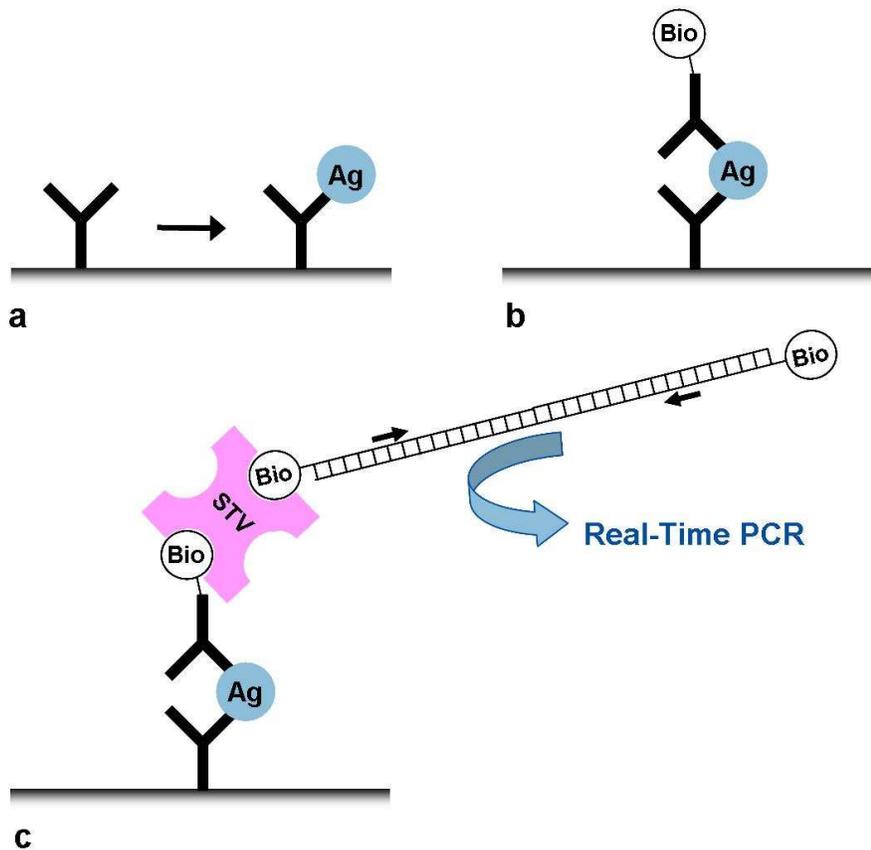


Abbildung 3-7 Funktionsprinzip der RT-iPCR für die Protein-Detektion. Die schematisch dargestellte RT-iPCR basiert auf einem einfachen Sandwich-ELISA. Nach dem Binden des Antigens an den Fang-Antikörper (a) wird das Antigen mit einem biotinylierten Detektions-Antikörper detektiert (b). Nach der Zugabe eines präformierten STV/reporter-DNA-Detektionskonjugats kann die gebundene *reporter*-DNA mit der Real-Time PCR quantifiziert werden (c).

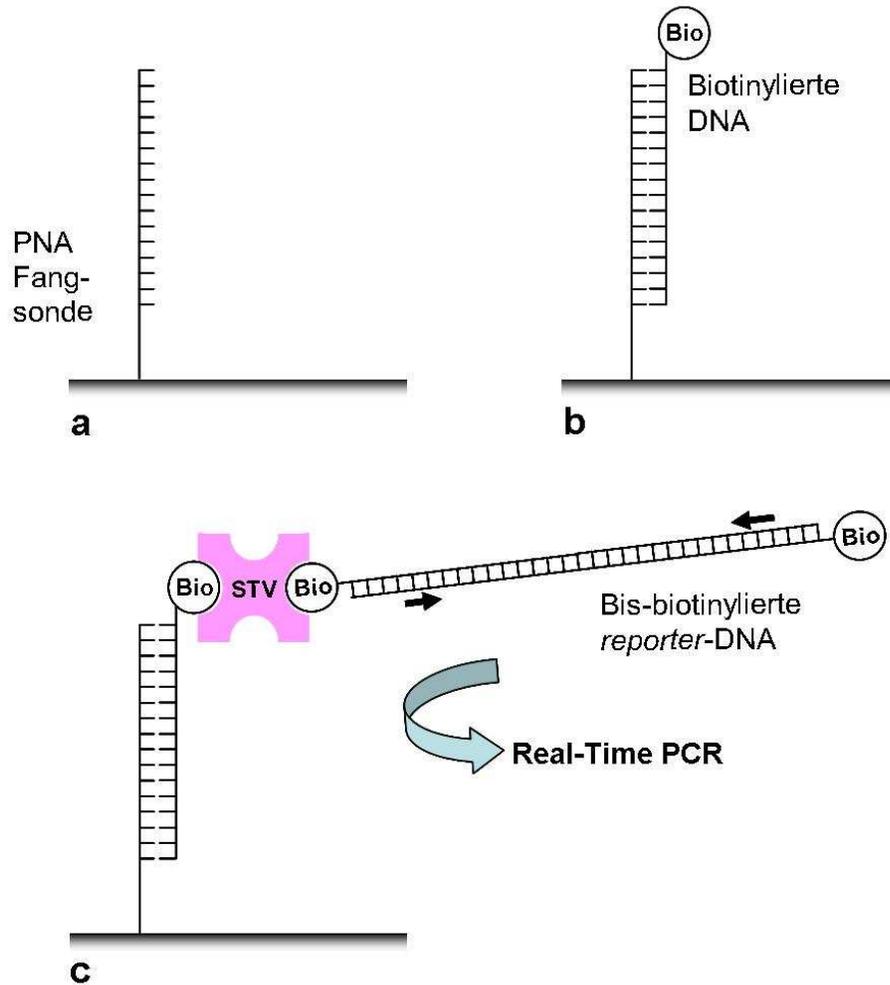


Abbildung 3-8 Funktionsprinzip der für die Detektion von DNA modifizierten RT-iPCR. An eine immobilisierte PNA-Fangsonde (**a**) kann die biotinylierte Ziel-DNA-Sequenz-spezifisch binden (**b**). Ein prä-fomiertes STV/reporter-DNA-Detektionskonjugat wird zugegeben, und die gebundene reporter-DNA kann mit der Real-Time PCR quantifiziert werden (**c**).

3.3.3 Arbeitsbeschreibung der RT-iPCR für die DNA-Detektion

In Abbildung 3-9 ist der praktische Arbeitsablauf für die Durchführung der für die DNA-Detektion modifizierten RT-iPCR dargestellt, der sich aus der Umsetzung der ausgewählten Detektionsstrategie ergab. Für die Immobilisierung der PNA-Moleküle, die als Fangsonden für die DNA-Detektion eingesetzt wurden, werden Protein-bindende, Real-Time-PCR-kompatible Mikrotitergefäße aus Polykarbonat mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper beschichtet. Ungebundene Antikörper werden durch Waschen entfernt. Anschließend werden unspezifische Protein- und DNA-Bindungsstellen blockiert (geblockt) und dann die PNA-Sonden, die mit einer Digoxigenin-Markierung versehen sind, immunologisch gebunden. Nach erneutem Waschen und Blockieren

freier Bindungsstellen (Blocken) folgt die Hybridisierung der DNA. Nicht spezifisch an die Fangsonden gebundene DNA wird durch Waschen entfernt. Nach erneutem Blocken wird ein frisch durch Selbstanordnung hergestelltes Detektionskonjugat zugegeben, das aus STV und der *reporter*-DNA besteht. Das Konjugat kann immunologisch an die hybridisierte, mit Biotin markierte DNA binden. Nach dem Entfernen ungebundener Konjugat-Oligomere durch intensives Waschen wird in jede Mikrotitervertiefung ein vorbereiteter *TaqMan-Mastermix* gegeben, und die vorhandene *reporter*-DNA wird mit der Real-Time PCR amplifiziert. Die gewonnenen Fluoreszenz-Daten werden mithilfe der Gerätesoftware ausgewertet.

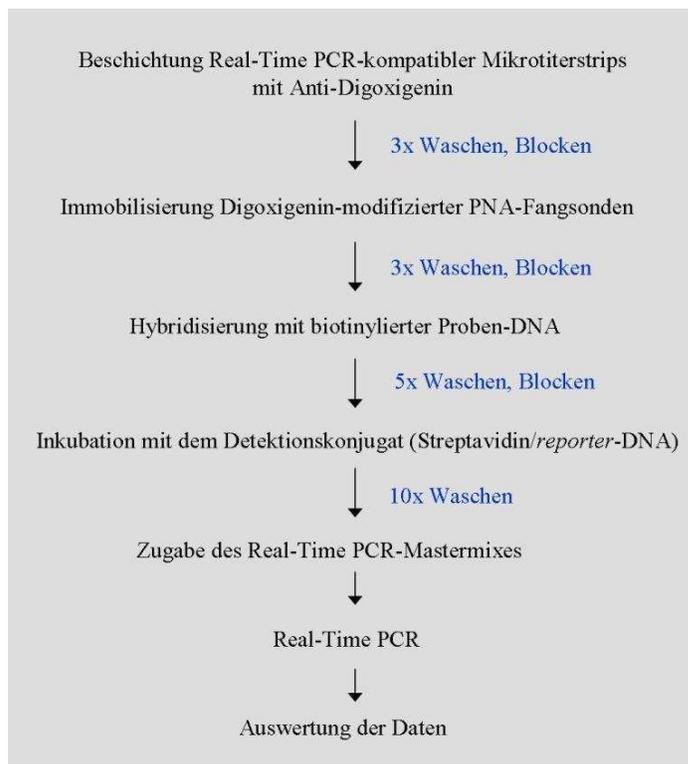


Abbildung 3-9 Durchführung der für die DNA-Detektion modifizierten RT-iPCR.

3.3.4 Peptidnukleinsäuren

Aufgrund ihrer überlegenen Hybridisierungseigenschaften wurden für die DNA-Detektion PNA-Sonden anstelle klassischer DNA-Sonden ausgewählt. Im Vordergrund stand dabei im Besonderen die hohe Bindungsstärke von PNA/DNA-Duplexen im Vergleich zu den korrespondierenden DNA/DNA-Verbindungen: Da die Durchführung der RT-iPCR mit sehr vielen Waschschritten verbunden ist, war zu erwarten, dass die Bindung der Zielmoleküle an die Fangsonden stark strapaziert würde.

Die verwendeten PNA-Oligonukleotide hatten jeweils eine Länge von 14 oder 16 Basen, die im Bereich der in der Literatur angegebenen optimalen Länge für PNA-Fangsonden von 12 bis 18 Basen liegt. Längere PNA-Sonden (> 20 Basen) neigen zur Selbstaggregation, die Synthese und Hybridisierung behindert (Hyrup & Nielsen, 1996). Während vergleichbare DNA-Fangsonden typischerweise eine Länge von etwa 25 bis 40 Basen haben, können PNA-Sonden aufgrund ihrer höheren Affinität zu komplementärer DNA kürzer gewählt werden. Dies bietet den Vorteil einer höheren Selektivität (siehe auch Abschnitt 3.1.2.1).

Wegen mit der PNA-Synthese verbundener hoher Kosten wurde die Auswahl auf vier verschiedene PNA-Sonden begrenzt. Die ausgewählten Sonden wiesen Sequenzen auf, die spezifisch an die Mais-Gene *adh1* (Alkoholdehydrogenase), *hmg* (*high mobility group*-Protein) und *inv* (Invertase) sowie an den MON810-spezifischen *mail-event* binden. Dementsprechend wurden sie als *Dig-adhPNA*, *Dig-hmgPNA*, *Dig-invPNA* und *Dig-mailPNA* benannt. Weitere Details bezüglich des Designs und der Herkunft der verwendeten Sonden sind im Abschnitt 3.2.5 und in Tabelle 4-6 aufgeführt.

3.3.5 Herstellung der *reporter*-DNA

3.3.5.1 Design des *reporter*-DNA-Systems

Als Grundlage für die Herstellung der *reporter*-DNA für die RT-iPCR wurde eine Sequenz aus dem *E. coli*-Plasmid pUC19 (Norlander *et al.* 1983) ausgewählt. Das Plasmid hat eine Gesamtlänge von 2686 bp und ist kommerziell erhältlich. Die für die *reporter*-DNA gewählte Sequenz ist nicht in tierischer oder pflanzlicher DNA enthalten. Da ein gewisses Maß an Hintergrundrauschen bei der RT-iPCR ohnehin unvermeidbar ist (Barletta 2006), war zu erwarten, dass eventuelle Kontaminationen von Probenmaterial oder Versuchsreagenzien mit *E. Coli*-DNA nicht wesentlich von Bedeutung für die Messergebnisse der RT-iPCR sein würden.

Es wurden zwei Primer-Systeme entwickelt, mit deren Hilfe die *reporter*-DNA hergestellt und detektiert werden konnte. Die beiden Primer *Bio-pUC19-reporter-f* und *Bio-pUC19-reporter-r* dienten der Herstellung eines doppelsträngigen *reporter*-DNA-Fragments mit einer Länge von 226 bp. Da beide Primer an ihrem 5'-Ende mit einem Biotin-Molekül markiert waren, entstand in der PCR ein bis-biotinyliertes Produkt. Die Primer *pUC19-f* und *pUC19-r* sowie die *TaqMan*-Sonde *pUC19-probe* binden innerhalb dieser Sequenz. Mit ihrer Hilfe kann ein 113 bp langer Abschnitt der *reporter*-DNA in der Real-Time PCR amplifiziert und quantifiziert werden. Die Bindungsstellen der beiden Primer-Systeme innerhalb der pUC19-Sequenz sind in Abbildung 3-10 dargestellt.

5'-AAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAACCATTATTATCATGACATTAACCTAT
AAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCgtctcgcgcgfttcggatgaCGGTGA
AAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAG
CGGATGCCGGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGG
CGGGTGTCGGGGCTGGCTTAA-3'

Abbildung 3-10 Bindungsstellen für die Primer-Systeme und die TaqMan-Sonde innerhalb der RT-iPCR-reporter-DNA. Die Bindungsstellen für *Bio-pUC19-reporter-f* und *Bio-pUC19-reporter-r* sind fettgedruckt. Fett-kursiv-gedruckte Buchstaben kennzeichnen die Bindungsstellen für die Real-Time PCR-Primer *pUC19-f* und *pUC19-r*. Der Sequenzbereich, in dem die *TaqMan*-Sonde *pUC19-probe* bindet, enthält fettgedruckte Kleinbuchstaben.

3.3.5.2 Herstellung der reporter-DNA

Die Schmelztemperaturen der PCR-Primer *Bio-pUC19-reporter-f* und *Bio-pUC19-reporter-r* liegen jeweils bei 59 °C. Die Amplifikation erfolgte daher im Gradientencycler mit Annealing-Temperaturen von 54, 55, 56 und 57 °C über 40 Zyklen. Aus Abbildung 3-11 wird ersichtlich, dass alle Temperaturen zur Bildung eines Produktes mit der erwarteten Fragmentgröße führten. Die Re-Amplifikation der *reporter*-DNA erfolgte aus der Bande, deren Amplifikat mit der höchsten Annealing-Temperatur von 57 °C hergestellt wurde, da die Spezifität der Primer-Anlagerung mit steigender Annealing-Temperatur zunimmt. Auch die Re-Amplifikation wurde mit einer Annealing-Temperatur von 57 °C durchgeführt.

Die Abbildung 3-12 zeigt das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der re-amplifizierten, gereinigten *reporter*-DNA. Anhand des DNA-Markers (MWM) IX wurde eine Konzentration der *reporter*-DNA von 28 ng/µl abgeschätzt. Dieses Ergebnis stimmte mit der spektrophotometrischen Messung überein (27,5 ng/µl).

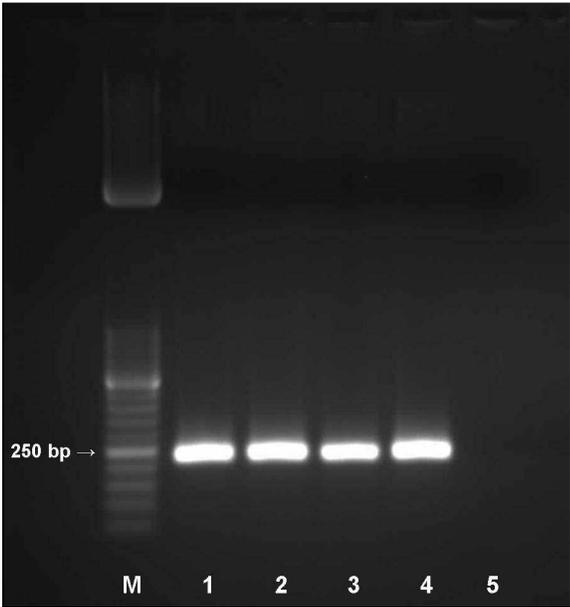


Abbildung 3-11 Gelelektrophoretische Auftrennung der *reporter*-DNA. M: MWM XIII, 1-4: Bis-biotinyliertes pUC19-Amplifikat (*reporter*-DNA, 226 bp), 5: PCR-Leerkontrolle (NTC)

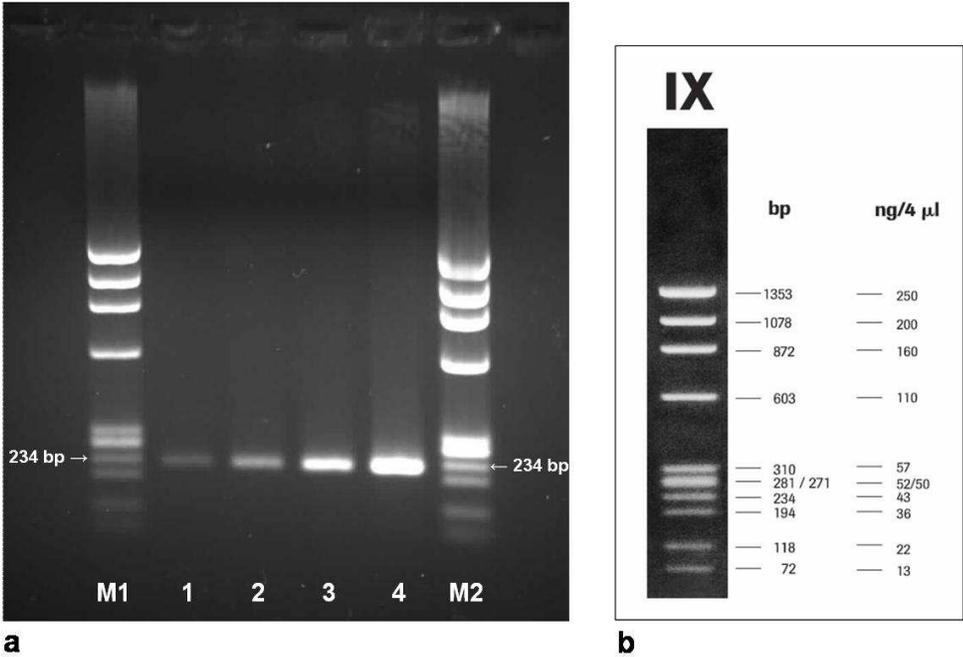


Abbildung 3-12 Gelelektrophoretische Auftrennung der re-amplifizierten, gereinigten *reporter*-DNA (a). M1: MWM IX (2 μ l), 1-4: Bis-biotinyliertes pUC19-Amplifikat (*reporter*-DNA) 0,5 μ l (1), 1 μ l (2), 2 μ l (3) und 4 μ l (4), M2: MWM IX (4 μ l); (b): Fragmentgrößen und -mengen des MWM IX.

3.3.5.3 TaqMan-System für die reporter-DNA

Das pUC-*TaqMan*-System wurde an Verdünnungsreihen der zur Herstellung der *reporter*-DNA verwendeten Plasmid-DNA und der *reporter*-DNA selbst getestet. Aus jeweils 5 ng Plasmid- und *reporter*-DNA wurden 1:10-Verdünnungsreihen angefertigt und als Dreifachbestimmungen in der Real-Time PCR eingesetzt. Die Analysen wurden in den für die RT-iPCR vorgesehenen *Robostrip*-Gefäßen mit dem ABI 7700 SDS-Gerät durchgeführt. Neben den verschiedenen Verdünnungen wurde genomische DNA aus 100 % MON810-Mais und aus Rindermuskulatur sowie 1:10 verdünnte RT-iPCR-Blocking-Lösung als Negativkontrollen in Triplikaten mitgeführt. *A. purif.* diente als Leerkontrolle (NTC).

Die gemessenen C_T -Werte für Plasmid- und *reporter*-DNA sind in Tabelle 3-5 aufgeführt. Für die Menge von 5 ng eingesetzter DNA ist bei der Plasmid-DNA eine deutliche Hemmung zu erkennen. Das Gleiche gilt bei der *reporter*-DNA für die Ausgangsmengen 5 ng bis 50 pg. Vermutlich führten in diesen Fällen die hohen Kopienzahlen im Bereich 10^8 bis 10^{10} zu einer Hemmung der PCR.

Die mitgeführten Kontrollen ergaben C_T -Werte von $36,36 \pm 0,17$ (MON810-DNA), $36,11 \pm 0,27$ (Rinder-DNA), $36,94 \pm 0,92$ (RT-iPCR Blocking-Lösung) und $35,95 \pm 0,6$ (NTC). Die Ursache für diese Real-Time PCR-Signale in den Negativkontrollen sind vermutlich in den PCR-Reagenzien vorhandene Spuren von *E. Coli*-DNA, die beispielsweise als Reste des Herstellungsprozesses der *Taq*-Polymerase im Puffer verbleiben. Durch ein Anheben des PCR-Thresholds ist es möglich, den Schwellenwert der Detektion über die Kurven der Negativ-Kontrollen hinaus anzuheben, sodass vor dem 40. PCR-Zyklus keine der Negativ-Kontrollen detektiert wird. Für den Einsatz des pUC-*TaqMan*-Systems in der RT-iPCR sind Signale im C_T -Wert Bereich über 35 jedoch nicht relevant, da aufgrund des der Methode eigenen Hintergrundrauschens die Real-Time PCR maximal bis zum 35. Zyklus durchgeführt wird (Barletta *et al.* 2006).

Tabelle 3-5 Real-Time PCR-Analyse von Verdünnungsreihen der pUC19-Plasmid-DNA und *reporter*-DNA, die mit dem pUC-*TaqMan*-System untersucht wurde.

<i>Eingesetzte DNA-Menge</i>	<i>Eingesetzte Kopienzahl</i>		<i>Mittlerer C_T-Wert^{a)} (n= 3) ± 1 SD</i>	
	<i>Plasmid-DNA</i>	<i>reporter-DNA</i>	<i>Plasmid-DNA</i>	<i>reporter-DNA</i>
5 ng	1,73E + 09	2,05E + 10	15,41 ± 0,13	> 40 ^{b)}
500 pg	1,73E + 08	2,05E + 09	16,29 ± 0,07	> 40 ^{b)}
50 pg	1,73E + 07	2,05E + 08	18,48 ± 0,06	16,18 ± 0,07
5 pg	1,73E + 06	2,05E + 07	21,93 ± 0,07	16,38 ± 0,03
500 fg	1,73E + 05	2,05E + 06	25,45 ± 0,13	18,51 ± 0,04
50 fg	1,73E + 04	2,05E + 05	28,60 ± 0,06	21,91 ± 0,16
5 fg	1730	2,05E + 04	32,79 ± 0,22	25,13 ± 0,04
500 ag	173	2050	35,72 ± 0,82	28,83 ± 0,23

^a Real-Time PCR-Threshold = 0,2; ^b Nicht nachweisbar innerhalb von 40 Zyklen der Real-Time PCR

Für die Beurteilung von Effizienz und Linearität des pUC-*TaqMan*-Systems wurden die C_T-Werte als Standardkurve gegen den Logarithmus (Lg) der eingesetzten Kopienzahl aufgetragen. Die Standard- und zugehörigen Amplifikationskurven sind in Abbildung 3-13 dargestellt. Die oben genannten C_T-Werte der die PCR deutlich inhibierenden höheren DNA-Konzentrationen wurden nicht in die Abbildungen und Berechnungen einbezogen.

Die PCR-Effizienzen wurden aus den Gleichungen der Geraden errechnet wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben und betragen 99,2 % für die Plasmid-DNA und 107,7 % für die *reporter*-DNA. Sie liegen in dem für Real-Time PCR-Systeme empfohlenen Effizienzbereich von 90 - 110 % (Applied Biosystems 2008). Regressionskoeffizienten von 0,996 für die Plasmid-DNA bzw. 0,993 für die *reporter*-DNA weisen auf eine sehr gute Linearität der C_T-Werte innerhalb der einbezogenen Quantifizierungsbereiche hin.

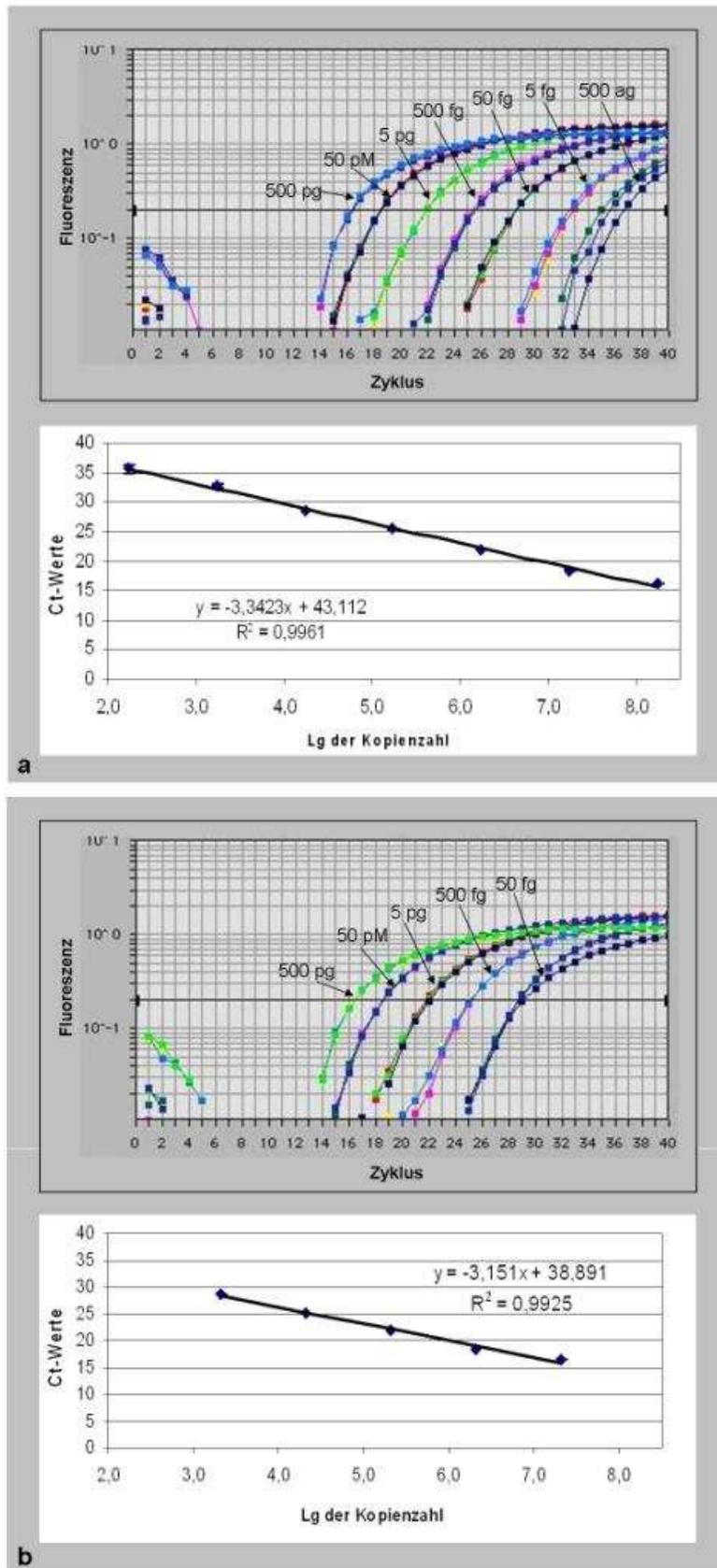


Abbildung 3-13 Amplifikationskurven und Standardkurven für DNA-Verdünnungsreihen von pUC19-Plasmid-DNA (a) und *reporter*-DNA (b).

3.3.6 Herstellung des Detektionskonjugats

Das Detektionskonjugat aus STV und *reporter*-DNA wurde für jeden RT-iPCR-Versuch frisch hergestellt. Anfangs wurde das Konjugat zur Qualitätsbeurteilung in Agarose-Gelen aufgetrennt. In Abbildung 3-14 ist beispielhaft das Ergebnis der Auftrennung verschiedener präformierter Detektionskonjugate gezeigt, die sich durch das bei ihrer Herstellung verwendete Verhältnis von STV zu *reporter*-DNA unterschieden. Der Vergleich mit DNA-Längenstandards und der ebenfalls aufgetragenen *reporter*-DNA zeigte, dass das Detektionskonjugat in drei sichtbaren Fragmentgrößen vorlag. Es handelte sich dabei vermutlich um Duplex-, Triplex- und Tetraplex-Oligomere, die die 226 bp lange *reporter*-DNA mit dem STV gebildet hatte. Die zu erwartenden Fragmentlängen von 452, 678 und 904 bp wurden im Gel im direkten Vergleich mit dem DNA-Marker leicht überschritten. Die Ursache ist wahrscheinlich eine durch die gebundenen Streptavidin-Moleküle verringerte Laufgeschwindigkeit im Agarose-Gel.

Niemeyer *et al.* (1999) haben in ihren Arbeiten festgestellt, dass die Größe der gebildeten Konjugat-Oligomere abhängig vom eingesetzten STV/*reporter*-DNA-Verhältnis war. Überschüssiges STV führte zur Bildung kleinerer Oligomere, wie sie in Abbildung 3-14 zu sehen sind. Ein äquimolares Verhältnis resultierte in der Bildung großer Aggregate, die im Gel langsamer diffundierten als 12 kbp große DNA-Marker-Fragmente. Ein 2facher Überschuss an DNA reichte aus, um einen gänzlichen Zusammenbruch der Oligomer-Bildung herbeizuführen. Diese Beobachtungen bestätigten sich in dieser Arbeit nicht, wie in der Abbildung zu erkennen ist. Auch bei einem höheren Überschuss einer der Reaktionskomponenten (bis zu 100:1) blieb das Muster der aufgetrennten Konjugate im Agarose-Gel gleich (Daten nicht gezeigt).

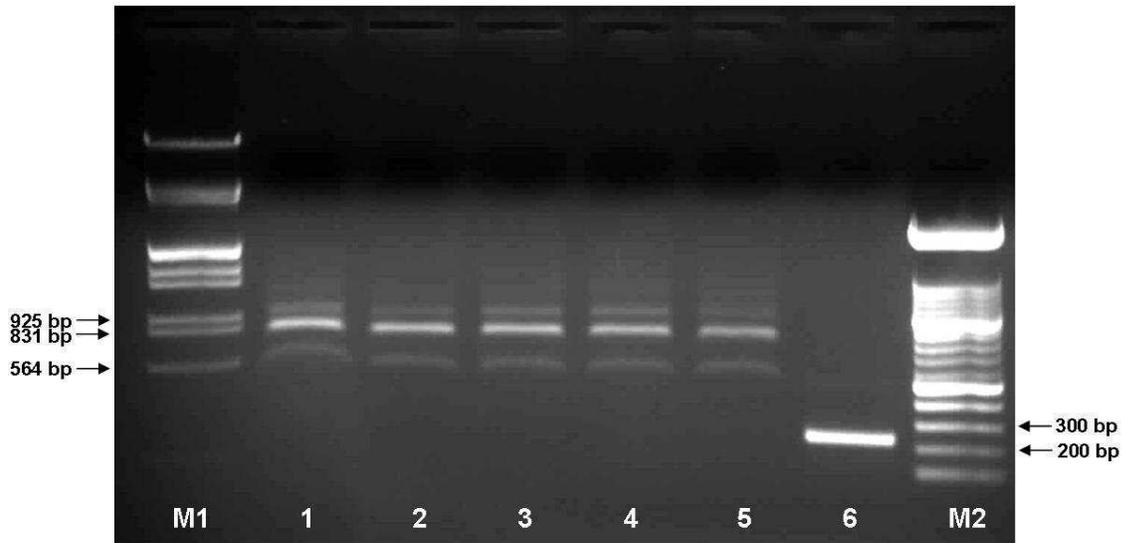


Abbildung 3-14 Gelelektrophoretische Auftrennung von mit verschiedenen STV/*reporter*-DNA-Mischverhältnissen hergestellten Konjugaten. *M1*: MWM III (4 μ l), *1-5*: je 40 μ l Detektionskonjugat (jeweils 70 ng *reporter*-DNA enthaltend) mit einem STV/*reporter*-DNA-Verhältnis von 10:1 (*1*), 2:1 (*2*), 1:1 (*3*), 1:2 (*4*) und 1:10 (*5*), *6*: *reporter*-DNA (84 ng), *M2*: MWM XIV (4 μ l); (1 % Agarose, breite Geltaschen)

3.3.7 Herstellung der Ziel-DNA

3.3.7.1 PCR-Amplifikate

Für jedes der für die Herstellung von Zielmolekülen verwendeten Primerpaare wurde im Gradientencycler die optimale Annealing-Temperatur ermittelt. In Abbildung 3-15 ist beispielhaft das Ergebnis einer Gradienten-PCR für das *Multi-bio-mail70bp*-Amplikon dargestellt: Während bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C eine unspezifische Produktbildung zu erkennen war und bei 58,5 °C die Produkt-Ausbeute bereits geringer erschien, war bei 56,5 °C ein einzelnes, etwa 70 bp großes PCR-Amplikon in ausreichender Menge entstanden. Um unspezifische Amplifikationen in der PCR zu vermeiden, wurde für alle Zielmoleküle jeweils die höchste Annealingtemperatur gewählt, bei der im Vorversuch noch eine zufriedenstellende Produkt-Ausbeute erzielt worden war. Diese Temperatur wurde dann für die eigentlichen PCRs zur Herstellung der Zielmoleküle verwendet und die resultierenden Produkte wurden aus einem Agarose-Gel aufgereinigt. Ihre Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (Tabelle 3-6).

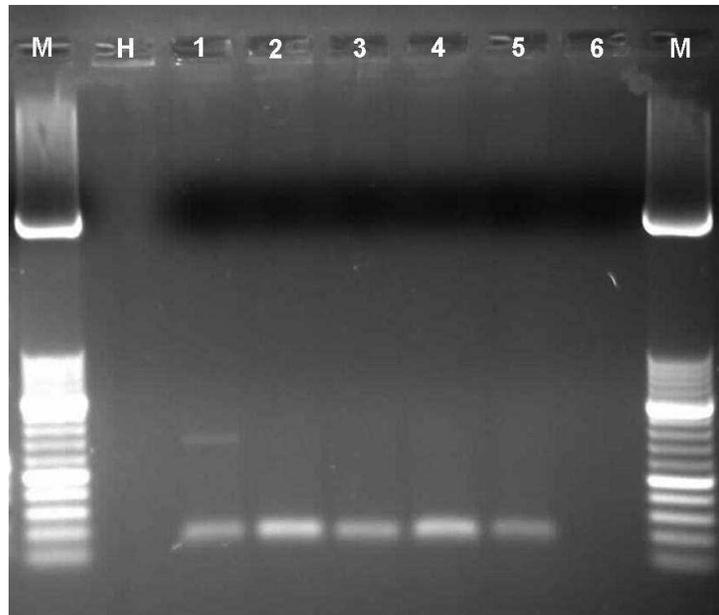


Abbildung 3-15 Gelelektrophoretische Auftrennung der in der Gradienten-PCR im Temperaturbereich von 50 bis 58,5 °C entstandenen Produkte für die Herstellung des *Multi-bio-mail70bp*-Zielmoleküls. *M*: MWM XIII (1 µg), *H*: *A. purif.*, 1 bis 5: *Multi-bio-mail70bp*-Fragmente aus Reaktionen mit 50 (1), 52 (2), 54,5 (3), 56,5 (4) und 58,5 (5) °C Annealing-Temperatur, 8: PCR-Leerkontrolle (10 µl).

Tabelle 3-6 Spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration der biotinylierten PCR-Produkte, die als Zielmoleküle für die RT-iPCR hergestellt wurden.

<i>PCR-Amplikon</i>	<i>Für die Herstellung verwendete Annealing-Temperatur (°C)</i>	<i>Spektrophotometrisch ermittelte DNA-Konzentration (ng/µl)</i>
Bio-adh50bp	56	7
Bio-adh70bp	56	18
Multi-bio-adh70bp	56	7,5
Multi-bio-mail70bp	56	3
Bio-adh512bp	57	26
Multi-bio-adh512bp	57	22,5
Bio-mail483bp	53	30

Zusätzlich wurden Aliquots der PCR-Produkte in einem Kontrollgel aufgetrennt, um erneut die Fragmentgröße zu überprüfen und durch Vergleich mit DNA-Standards die spektrophotometrisch bestimmte Konzentration zu bestätigen. In der Abbildung 3-16 ist für jedes der mittels PCR hergestellten Zielmoleküle ein beispielhaftes Kontrollgel dargestellt. Beim Vergleich mit den eingesetzten DNA-Standards fiel auf, dass die PCR-Produkte scheinbar größer waren als erwartet. Dies ist auf die in die PCR-Amplifikate eingebundenen Biotin-Moleküle zurückzuführen. Deren Mole-

Ergebnisse und Diskussion

kulargewicht von etwa 245 g/mol bewirkt eine langsamere Diffusion in der Agarose im Vergleich zu den unmarkierten DNA-Fragmenten der DNA-Marker. Deutlich wird dieser Zusammenhang besonders in Abbildung 3-16 d: Das multi-biotinylierte Amplikon *Multi-bio-adh512bp* erscheint größer als das lediglich bis-biotinylierte *Bio-adh512bp*-Amplikon, und beide Banden haben im Gel eine kürzere Laufstrecke zurückgelegt als die 500 bp-Bande des DNA-Markers.

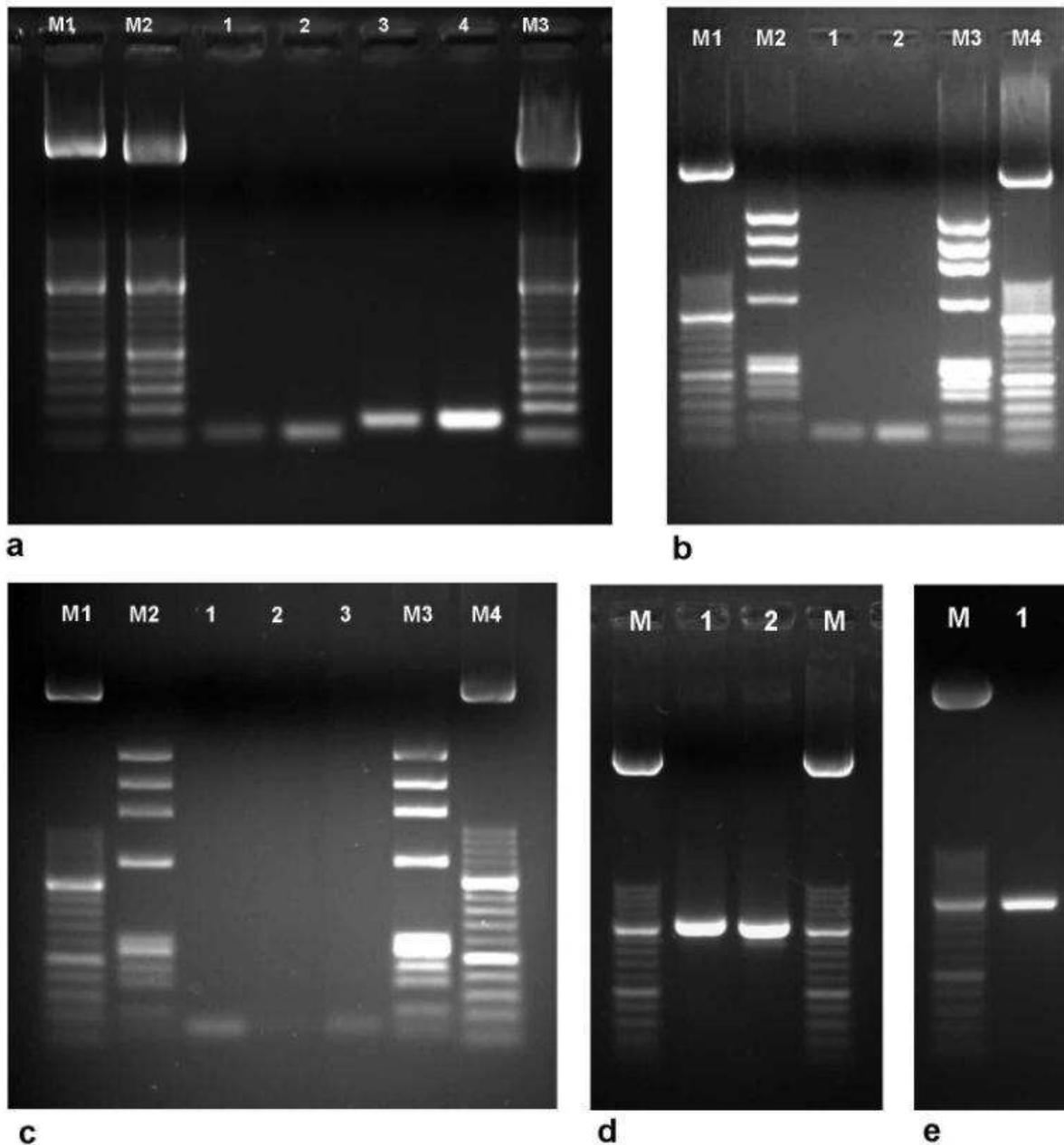


Abbildung 3-16 Kontrollgele der für die RT-iPCR hergestellten PCR-Amplifikate nach der Gelaufreinigung. **a:** M1: 0,5 µg, M2: 1 µg, M3: 2 µg MWM XIII, 1: 3 µl, 2: 6 µl *Bio-adh50bp*, 3: 3 µl, 4: 6 µl *Bio-adh70bp*; **b:** M1: 0,5 µg MWM XIII, M2: 0,5 µg MWM IX, 1: 2,5 µl, 2: 5 µl *Multi-bio-adh70bp*, M3: 1 µg MWM IX, M4: 1 µg MWM XIII; **c:** M1: 0,5 µg MWM XIII, M2: 0,5 µg MWM IX, 1: 2,5 µl *Multi-Bio-adh70bp*, 2: 2,5 µl; 3: 7,5 µl *Multi-bio-mail70bp*; M3: 1 µg MWM IX, M4: 1 µg MWM XIII; **d:** M: 1 µg MWM XIII, 1: 10 µl *Multi-bio-adh512bp*, 2: 10 µl *Bio-adh512bp*; **e:** M: 1 µg MWM XIII, 1: 8 µl *Bio-mail483bp*. (Die Fragmentgrößen der verwendeten DNA-Marker sind in **Tabelle 4-9** abgebildet.)

3.3.7.2 Biotinylierte Hintergrund-DNA

Biotinylierte mdaDNA oder gDNA wurde nach der Reinigung spektrophotometrisch und fluorometrisch quantifiziert, und die Biotinylierung wurde durch Detektion auf einer Nylonmembran überprüft. Im Folgenden werden beispielhaft die Untersuchungsergebnisse für Klenow-biotinylierte mdaDNA (Bio-mdadNA) dargestellt. Nach der an die Markierung anschließenden Reinigung war der Anteil einzelsträngiger DNA stark reduziert, vermutlich weil überschüssige Biotin-dUTPs und Zufallsprimer entfernt worden waren (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7 Spektrophotometrische und Fluorometrische Quantifizierung Klenow-biotinylierter mdaDNA.

<i>Biotinylierte mdaDNA 1:1 verdünnt</i>	<i>Spektrophotometrie</i>		<i>Fluorometrie</i>		<i>Errechnete ssDNA-Konz. (ng/μl)</i>	<i>Gesamtausbeute an dsDNA pro Reaktionsansatz (μg)</i>
	<i>DNA-Konz. (ng/μl)</i>	<i>A₂₆₀</i>	<i>dsDNA-Konz. (ng/μl)</i>			
<i>ungereinigt</i>	289	5,79	77		140	3,08
<i>gereinigt</i>	92	1,85	73		13	2,92

Bei der Kontrolle der Biotinylierung ergaben alle Verdünnungsstufen (Originallösung, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10 000) der gereinigten Bio-mdadNA auf der Nylonmembran ein etwas schwächeres Farbsignal als die ungereinigte Bio-mdadNA (Abbildung 3-17). Die ungereinigten Ansätze wiesen eine 70 μM Bio-dUTP-Konzentration auf (dies entspricht 1,4 nmol oder 8,4E+14 Biotin-Molekülen pro 20 μl-Reaktionsansatz), die durch den Zusatz einer bekannten Menge Bio-dUTP pro Klenow-Markierungs-Reaktion gegeben war. Da durch die Phenol-Chloroform-Reinigung mit anschließender Ethanolpräzipitation nicht inkorporierte Biotin-dUTPs entfernt wurden, deutete das Farbsignal der gereinigten Bio-mdadNA auf eine erfolgreiche Biotinylierung hin. Drei Mikrogramm DNA enthalten etwa 2,73E+15 Basenpaare. Wären sämtliche der Reaktion zugefügte dUTPs inkorporiert worden, hätte dies in einer theoretischen Markierungs-Dichte von einem Biotin-dUTP-Molekül in etwa 6,5 Basen resultiert. Die gereinigte Bio-mdadNA weist ein etwa um die Hälfte schwächeres Farbsignal auf als die ungereinigte. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die tatsächliche Biotin-dUTP-Dichte etwa im Größenbereich der vom Hersteller angegebenen, zu erwartenden Markierungsdichte von einem Biotin-Molekül in 20-25 Basen (Roche Applied Science 2009) liegt.

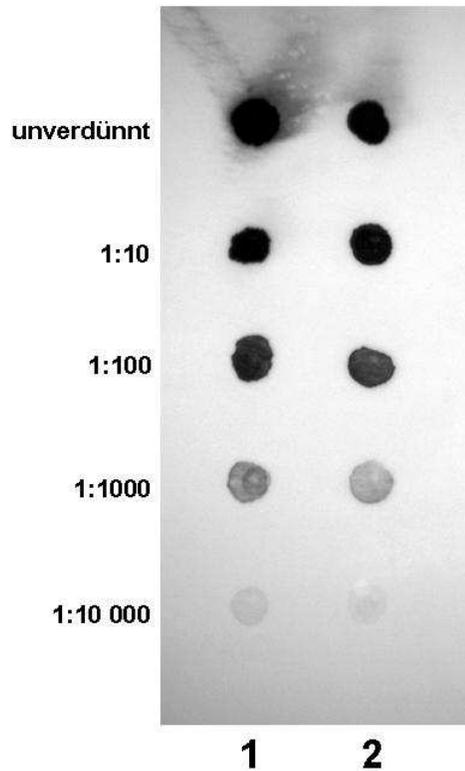


Abbildung 3-17 Markierungskontrolle biotinylierter mdaDNA. Je 1 μ l der ungereinigten (1) und gereinigten (2) Bio-mdaDNA wurden unverdünnt und in 1:10-Verdünnungen auf eine Nylonmembran aufgetragen. Die enthaltenen Biotin-dUTPs wurden mithilfe eines STV-AP-Konjugats detektiert und durch Umsetzung des Substrats NBT/BCIP sichtbar gemacht. In 1 μ l unverdünnter, ungereinigter Bio-mdaDNA waren etwa 70 pmol Biotin-Moleküle enthalten.

3.3.8 Prüfung der grundsätzlichen Durchführbarkeit

Die grundsätzliche Durchführbarkeit einer Detektion von DNA mittels RT-iPCR wurde mithilfe eines biotinylierten 16mer-Oligonukleotids getestet. Das *Bio-adh16mer*-Molekül weist die zur Fangsonde *Dig-adhPNA* revers-komplementäre Sequenz auf und wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (2 nM und 200 pM) mit der Sonde hybridisiert. Als negative Hybridisierungskontrolle (NHC) dienten Ansätze, bei denen das Zielmolekül in einer 2 nM Konzentration mit einer nicht-komplementären Fangsonde (*Dig-mailPNA*) anstelle der *Dig-adhPNA*-Sonde inkubiert wurde.

Dem Versuch lagen die folgenden RT-iPCR-Bedingungen zugrunde.

- 10 μ g/ml Anti-Digoxigenin-Konzentration
- unverdünnte Blocking-Lösung
- 20 nM PNA-Konzentration
- 38 °C Hybridisierungstemperatur

Ergebnisse und Diskussion

- 1:1 Streptavidin/*reporter*-DNA-Ratio
- 500 pM Detektionskonjugat-Konzentration
- Waschen mit einfacher Anzahl der Waschschritte bei Raumtemperatur

Abbildung 3-18 zeigt die resultierenden Real-Time PCR-Amplifikationskurven der Vierfachbestimmungen auf dem ABI 7700 SDS-Gerät. In Tabelle 3-8 sind die zugehörigen C_T -Werte angegeben. Die Ansätze, in denen das *Bio-adh16mer*-Molekül mit der komplementären Fangsonde *Dig-adhPNA* hybridisiert wurde, wiesen signifikant niedrigere C_T -Werte auf als die Ansätze mit der nicht-komplementären Sonde *Dig-mailPNA* (Mann-Whitney *U*-Test; jeweils $p < 0,05$). Dieses Ergebnis belegte die grundsätzliche Durchführbarkeit der DNA-Detektion mittels RT-iPCR (*proof-of-concept*).

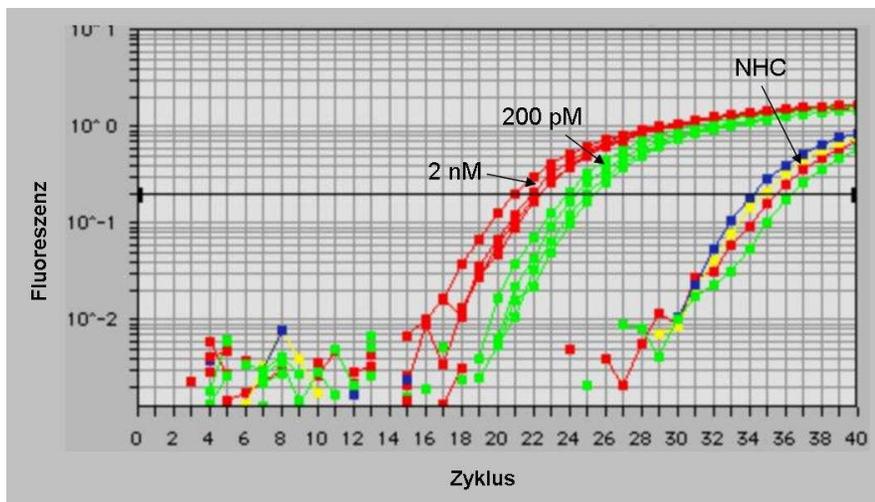


Abbildung 3-18 RT-iPCR-Amplifikationskurven für das Zielmolekül *Bio-adh16mer*. Bei einer Hybridisierung an die Fangsonde *Dig-adhPNA* weisen die Konzentrationen 2 nM und 200 pM des *Bio-adh16mer*-Moleküls niedrigere C_T -Werte auf als bei der Inkubation mit einer nicht-komplementären Sonde.

Tabelle 3-8 Beweis der grundsätzlichen Durchführbarkeit einer DNA-Detektion mittels RT-iPCR durch Analyse des synthetischen Oligonukleotids *Bio-adh16mer*.

<i>PNA-Sonde</i>	<i>Bio-adh16mer-Konzentration</i>	Mittlere C_T -Werte ($n = 4$) ± 1 SD
<i>Dig-adhPNA</i>	2 nM	21,72 \pm 0,55
	200 pM	24,55 \pm 0,68
<i>Dig-mailPNA</i>	2 nM	35,13 \pm 0,88

Real-Time PCR-Threshold = 0,2

3.3.9 Optimierung einzelner Arbeitsschritte

In Vorversuchen hatte sich bereits gezeigt, dass mit einer Veränderung von Reaktionsparametern, wie beispielsweise einer Erhöhung der Detektionskonjugat-Konzentration (siehe Abschnitt 3.3.9.3), zwar die C_T -Werte abnahmen, d.h. die Stärke der positiven Signale zunahm; gleichzeitig nahm jedoch häufig auch die Stärke der Hintergrundsignale zu. Dies äußerte sich darin, dass beim Einsatz von Negativkontrollen in Form von nicht zu der verwendeten Sonde komplementären Oligonukleotiden ebenfalls früher ein Signal detektiert wurde. Dementsprechend konnte es vorkommen, dass ein Zielmolekül bei Veränderung eines bestimmten Reaktionsparameters zwar bereits früher detektiert wurde, dieser Effekt aber durch einen ebenfalls erhöhten Hintergrund aufgehoben wurde. Deshalb wurde für die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen in jeder RT-iPCR zusätzlich zu dem zur verwendeten PNA-Sonde komplementären Zielmolekül ein nicht komplementäres Molekül als negative Hybridisierungskontrolle (NHC) eingesetzt.

Für einen einheitlichen Vergleich der Ergebnisse, der von der absoluten Höhe der gemessenen C_T -Werte unabhängig ist, werden im Folgenden die RT-iPCR-Ergebnisse meist als ΔC_T -Werte angegeben: Diese wurden jeweils durch Subtraktion des C_T -Wertes des Zielmoleküls von dem der negativen Hybridisierungskontrolle errechnet. Je größer ein ΔC_T -Wert ist, umso besser lässt sich das positive Signal vom Signal der Negativkontrolle unterscheiden. Die Größe eines ΔC_T -Wertes wird einerseits durch die Stärke des positiven Signals und andererseits durch die Stärke des NHC-Signals beeinflusst. Ein besonders großer ΔC_T -Wert kann also entweder allein durch ein stärkeres positives Signal (kleinerer C_T -Wert) oder geringeres NHC-Signal (höherer C_T -Wert) oder durch eine Kombination aus beidem bedingt sein. In den Optimierungs-Versuchen deutete bei gleich bleibender Konzentration der für die Hybridisierung eingesetzten DNA-Moleküle unter stufenweiser Veränderung eines anderen Reaktionsparameters der größte resultierende ΔC_T -Wert auf die am besten geeigneten Reaktionsbedingungen hin.

Bei als ΔC_T -Werte ausgedrückten RT-iPCR-Ergebnissen wird im Folgenden die Standardabweichung der Differenz (SD_{Diff}) angegeben. Sie wurde jeweils aus den Standardabweichungen der zugrunde liegenden Mittelwerte (SD_1 und SD_2) entsprechend der Formel

$$SD_{Diff} = \sqrt{SD_1^2 + SD_2^2}$$

berechnet.

Für viele Optimierungs- und spätere Vergleichsuntersuchungen wurde eine einheitliche Konzentration der Zielmoleküle von 200 pM gewählt. Diese Konzentration entspricht einer Menge von ca. 6 fmol pro Hybridisierungsreaktion und wurde in Vorversuchen als mittlere Zielmolekül-Konzentration ermittelt, bei der noch eine sehr deutliche Diskriminierung zwischen Positiv- und NHC-Signalen möglich war. Die 200 pM-Konzentration lag bezüglich des Zusammenhanges der Ziel-

molekül-Konzentration mit der Höhe des Detektionssignals etwa mittig im linearen Bereich der RT-iPCR-Detektion (siehe Abschnitt 3.3.10.1) und erschien daher als eine für die Optimierung geeignete Konzentration.

3.3.9.1 Plattenbeschichtung

Laut Herstellerangaben (Roche Applied Science 2009) ist eine Konzentration von 10 µg/ml des Anti-Digoxigenin-Antikörpers für die Beschichtung von Mikrotiterplatten geeignet. Für eine mögliche Optimierung der Plattenbeschichtung wurde die Konzentration in der RT-iPCR variiert. In Vierfachbestimmungen wurde der Anti-Digoxigenin-Antikörper in Konzentrationen von 2, 10 oder 50 µg/ml eingesetzt. Nach einer Immobilisierung der *Dig-adhPNA*-Sonde wurden die DNA-Oligonukleotide *Bio-adh30mer* und *Bio-mail30mer* in einer Konzentration von jeweils 200 pM mit der RT-iPCR detektiert. Für jede Anti-Digoxigenin-Konzentration wurde die Differenz der C_T -Werte zwischen dem positiven Signal (*Bio-adh30mer*) und dem NHC-Signal (*Bio-mail30mer*) berechnet und als ΔC_T -Wert aufgeführt (Tabelle 3-9).

Eine Erhöhung der Anti-Digoxigenin-Konzentration auf 50 µg/ml oder Absenkung auf 2 µg/ml brachten keine Verbesserung der ΔC_T -Werte im Vergleich zur bisher verwendeten Konzentration von 10 µg/ml, deshalb wurde die vom Hersteller empfohlene, ursprüngliche Konzentration von 10 µg/ml für alle folgenden Plattenbeschichtungen beibehalten.

Tabelle 3-9 Optimierung der Anti-Digoxigenin-Konzentration für die Plattenbeschichtung in der RT-iPCR.

Anti-Digoxigenin-Konzentration (µg/ml)	Mittlere C_T -Werte ($n = 4$) ± 1 SD		ΔC_T -Werte ± 1 SD_{Diff}
	<i>Bio-adh30mer</i>	Negativkontrolle	
2	17,75 \pm 0,07	26,10 \pm 0,10	8,35 \pm 0,12
10	17,65 \pm 0,10	26,20 \pm 0,08	8,56 \pm 0,13
50	17,64 \pm 0,08	26,10 \pm 0,11	8,46 \pm 0,13

3.3.9.2 Sondenkonzentration

a) Sondenkonzentration für die Detektion von Oligonukleotiden

Um die ideale Konzentration der PNA-Sonden für die Immobilisierung in den mit Anti-Digoxigenin beschichteten *Robostrips* zu ermitteln, wurde die *Dig-adhPNA*-Sonde in Konzentrationen von 2 µM bis 200 pM (jeweils in Triplikaten) immobilisiert. Anschließend wurde eine RT-iPCR durchgeführt. Als Zielmolekül diente das 30mer-Oligonukleotid *Bio-adh30mer*, das die zur *Dig-adhPNA*-Sonde komplementäre Sequenz enthält. Als NHC diente das nicht zu der Sonde komplementäre *Bio-mail30mer*-Molekül. Beide Oligonukleotide wurden durchgehend in einer Konzentration von jeweils 200 pM eingesetzt. Die resultierenden C_T -Werte sind in Tabelle 3-10 zusammengestellt.

Ebenfalls angegeben sind die durch Subtraktion der C_T -Werte des *Bio-adh30mers* von den C_T -Werten der Negativkontrolle errechneten ΔC_T -Werte.

Ausgehend von einer mittleren PNA-Sonden-Konzentration von 20 nM ergaben höhere Sonden-Konzentrationen von 200 nM bis 2 μ M keine Verbesserung der ΔC_T -Werte für die Hybridisierung der Oligonukleotid-Zielmoleküle. Bei Senkung der Konzentration zeigten die ΔC_T -Werte eine Tendenz zur Verschlechterung. Deshalb wurde bei allen folgenden Experimenten mit kurzen Zielmolekülen die anfangs gewählte PNA-Konzentration von 20 nM beibehalten. Diese Konzentration wurde beispielsweise auch für die Immobilisierung von PNA-Fangsonden auf Silikon-Oberflächen verwendet (Macanovic *et al.* 2004). Aus Kostengründen ist es sinnvoll, die verwendeten PNA-Konzentrationen niedrig zu halten.

Tabelle 3-10 Optimierung der Sondenkonzentration für die Detektion synthetischer Oligonukleotide in der RT-iPCR.

Sondenkonzentration (nM)	Mittlerer C_T -Werte ($n = 4$) ± 1 SD		ΔC_T -Werte ± 1 SD _{Diff}
	<i>Bio-adh30mer</i>	<i>Bio-mail30mer</i>	
2000	17,99 \pm 0,13	26,50 \pm 0,04	8,51 \pm 0,14
200	17,89 \pm 0,17	26,34 \pm 0,11	8,46 \pm 0,20
20	18,22 \pm 0,07	26,70 \pm 0,10	8,48 \pm 0,12
2	20,28 \pm 0,30	28,02 \pm 0,12	7,74 \pm 0,33
0,2	23,83 \pm 0,11	29,06 \pm 0,65	5,23 \pm 0,66

b) Sondenkonzentration für die Detektion von PCR-Amplifikaten

Im Verlauf der Methoden-Optimierung wurde die Sondenkonzentration für die Detektion längerer Zielmoleküle erneut optimiert. Wenn Fangsonden zu dicht auf der Oberfläche gebunden sind, kann es zu sterischen Einflüssen bei der Hybridisierung kommen (Shchepinov *et al.* 1997). Daher sollte überprüft werden, ob bei längeren Zielmolekülen eine geringere Sondenkonzentration aufgrund des möglichen Auftretens sterischer Hinderungen von Vorteil ist.

Die beiden bis-biotinylierten PCR-Amplifikate *Bio-adh70bp* und *Bio-mail483bp* wurden mit einer Konzentration von 200 pM jeweils mit den PNA-Sonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* inkubiert. Die PNA-Sonden wurden in Konzentrationen von 2 bis 200 nM eingesetzt. In Tabelle 3-11 sind die C_T -Werte für die jeweiligen Hybridisierungen dargestellt. Tabelle 3-12 zeigt die ΔC_T -Werte für die verschiedenen möglichen Kombinationen von Positiv- und NHC-Signalen.

Die gemessenen C_T -Werte ergaben, dass die Senkung der Sondenkonzentration auf 2 nM tendenziell in einem schlechteren positiven Hybridisierungssignal resultiert. Dieser Effekt wurde zum Teil durch eine gleichzeitige Abnahme des Hintergrundsignals ausgeglichen. Insgesamt bewirkte

Ergebnisse und Diskussion

eine geringere Sondenkonzentration aber keine Verbesserung der ΔC_T -Werte. Das um ca. 2,4 C_T -Werte verringerte Hybridisierungssignal des *Bio-adh70bp*-Moleküls mit der komplementären Sonde *Dig-adhPNA* führte sogar zu einer Verminderung der diese Werte einbeziehenden ΔC_T -Werte. Daraus wurde geschlossen, dass durch eine zu hohe Sondenkonzentration bedingte sterische Hinderungen keine Rolle bei der Detektion der längeren Zielmoleküle spielen, und die ursprüngliche Sondenkonzentration von 20 nM wurde in den nachfolgenden Experimenten beibehalten.

Tabelle 3-11 Optimierung der Sondenkonzentration für die Detektion von PCR-Amplifikaten in der RT-iPCR.

Sondenkonzentration (nM)	Mittlerer C_T -Werte ($n = 3$) ± 1 SD			
	<i>Bio-adh70bp</i>		<i>Bio-mail483bp</i>	
	<i>Dig-adhPNA</i>	<i>Dig-mailPNA</i>	<i>Dig-mailPNA</i>	<i>Dig-adhPNA</i>
200	20,01 \pm 0,08	26,55 \pm 0,07	18,97 \pm 0,07	27,67 \pm 0,06
20	20,40 \pm 0,05	26,60 \pm 0,04	18,76 \pm 0,10	27,82 \pm 0,13
2	22,76 \pm 0,04	27,37 \pm 0,07	19,45 \pm 0,03	28,58 \pm 0,38

Tabelle 3-12 Aus verschiedenen Kombinationen von Positiv- und NHC-Signal resultierende ΔC_T -Werte bei der Detektion PCR-amplifizierter Ziel-DNA in Abhängigkeit von der Sondenkonzentration.

Ziel-DNA	Sonde	Negativkontrolle		Sonden- konz. (nM)	ΔC_T -Werte ± 1 SD_{Diff}
		Amplikon	Sonde		
Bio-adh70bp	Dig- adhPNA	Bio- mail483bp	Dig- adhPNA	200	7,66 \pm 0,09
				20	7,42 \pm 0,14
				2	5,83 \pm 0,38
		Bio-adh70bp	Dig- mailPNA	200	6,54 \pm 0,10
				20	6,21 \pm 0,06
				2	4,61 \pm 0,08
Bio-mail483bp	Dig- mailPNA	Bio-adh70bp	Dig- mailPNA	200	7,58 \pm 0,09
				20	7,84 \pm 0,10
				2	7,92 \pm 0,08
		Bio- mail483bp	Dig- adhPNA	200	8,70 \pm 0,09
				20	9,06 \pm 0,16
				2	9,13 \pm 0,38

3.3.9.3 Detektionskonjugat

a) Verhältnis von Streptavidin und reporter-DNA im Detektionskonjugat

Streptavidin und *reporter*-DNA wurden im Verhältnis von 10:1, 2:1, 1:1, 1:2 und 1:10 miteinander gemischt und als Detektionskonjugat in der RT-iPCR eingesetzt. Die Konzentration der *reporter*-DNA (ca. 0,4 nM) war in allen Mischungen gleich (Tabelle 3-13). Jede der Mischungen wurde für die Detektion des DNA-Oligonukleotids *Bio-adh30mer* nach Hybridisierung an die Fangsonde *Dig-adhPNA* eingesetzt. Als NHC diente jeweils das *Bio-mail30mer*-Molekül. In Tabelle 3-14 sind die Messergebnisse als C_T -Werte und als Differenz der C_T -Werte (ΔC_T) von NHC und Zielmolekül dargestellt. Bei Betrachtung der C_T -Werte wird deutlich, dass mit einem sinkenden Anteil von STV im Detektionskonjugat die positiven Hybridisierungssignale stärker wurden. In gleichem Maße nahm aber auch die Stärke der Hintergrundsignale zu, sodass die ΔC_T -Werte zwischen Zielmolekül und Negativkontrolle letztlich gleich blieben.

Tabelle 3-13 Herstellung der Konjugatlösungen für die Optimierung der STV/*reporter*-DNA-Ratio in der RT-iPCR.

<i>Ratio</i> <i>STV : reporter-DNA</i>	<i>STV-Lösung</i> ^{a)} (μ l)	<i>reporter-DNA-Lösung</i> ^{a)} (μ l)	<i>Konjugatpuffer</i> (μ l)
10:1	50	5	75
2:1	10	5	115
1:1	5	5	120
1:2	2,5	5	122,5
1:10	0,5	5	124,5

^a Konzentration der Lösung: 9,5 μ M

Tabelle 3-14 Optimierung der STV/*reporter*-DNA-Ratio in der RT-iPCR unter Verwendung der Zielmoleküle *Bio-adh30mer* und *Bio-mail30mer*, die mit der Sonde *Dig-adhPNA* hybridisiert wurden.

<i>Ratio</i> <i>STV : reporter-DNA</i>	<i>Mittlere C_T-Werte (n = 4) \pm 1 SD</i>		ΔC_T -Werte \pm SD_{Diff}
	<i>Bio-adh30mer</i>	<i>Bio-mail30mer</i>	
10:1	21,03 \pm 0,08	29,19 \pm 0,08	8,16 \pm 0,11
2:1	18,65 \pm 0,09	27,45 \pm 0,15	8,81 \pm 0,18
1:1	17,65 \pm 0,10	26,20 \pm 0,08	8,56 \pm 0,13
1:2	16,74 \pm 0,07	24,79 \pm 0,23	8,05 \pm 0,24
1:10	16,40 \pm 0,06	23,33 \pm 0,17	6,94 \pm 0,18

Eine Ursache für die Verschiebung der absoluten C_T -Werte ist nicht auszumachen. Wie in Abschnitt 3.2.8 gezeigt, unterschieden sich die mit unterschiedlichen Mischverhältnissen von STV und *reporter*-DNA hergestellten Konjugate nicht hinsichtlich ihrer Struktur, soweit dies in der

gelelektrophoretischen Auftrennung sichtbar gemacht werden konnte. Zumindest die Größe der gebildeten Oligomere war im Agarose-Gel gleich. Denkbar ist jedoch eine unterschiedliche räumliche Anordnung der Moleküle: Beispielsweise kann ein Tetramer sowohl eine geschlossene Ring-Formation als auch eine lineare Struktur bilden (Niemeyer *et al.* 1999). Die naheliegendste Erklärung für die schlechteren Hybridisierungssignale bei einem STV-Überschuss im Konjugat ist eine Blockierung von Biotin-Molekülen der hybridisierten Ziel-DNA durch freie STV-Moleküle. Für alle folgenden RT-iPCR-Versuche wurde das Detektionskonjugat mit einem STV/*reporter*-DNA-Verhältnis von 1:1 hergestellt wie von Niemeyer *et al.* (1999) vorgeschlagen.

b) Konjugatkonzentration

In Vorversuchen hatte sich bereits gezeigt, dass mit zunehmender Konjugatkonzentration zwar die C_T -Werte abnahmen, aber beim Einsatz von Negativkontrollen in Form von nicht zur verwendeten Sonde komplementären Oligonukleotiden ebenfalls früher ein Signal detektiert wurde (Daten nicht dargestellt). Das bedeutet, dass Zielmoleküle in der RT-iPCR bei einer hohen Konzentration des Detektionskonjugats bereits früher detektiert werden, dieser Effekt aber möglicherweise durch einen ebenfalls erhöhten Hintergrund aufgehoben wird. Deshalb wurden für die Bestimmung der optimalen Konjugatkonzentration jeweils ein zur verwendeten *Dig-adhPNA*-Sonde komplementäres Zielmolekül (*Bio-adh30mer*) und eine nicht-komplementäre Negativkontrolle (*Bio-mail30mer*) mit der gleichen Konjugatkonzentration inkubiert. Nachdem in Vorversuchen innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 50 nM bis 50 pM der infrage kommende Bereich eingengt worden war (Daten nicht gezeigt), wurde für die Optimierung das Detektionskonjugat in Konzentrationen von 4 nM bis 125 pM eingesetzt. Anschließend wurde für jede Konzentration der ΔC_T -Werte die Differenz aus dem C_T -Wert der NHC und des Zielmoleküls berechnet (Tabelle 3-15). Die ermittelte optimale Konzentration von 500 pM stimmt mit der von Niemeyer *et al.* (1999) für die Protein-Detektion angegebenen Konzentration überein.

Tabelle 3-15 Optimierung der Konjugatkonzentration in der RT-iPCR unter Verwendung der Zielmoleküle *Bio-adh30mer* und *Bio-mail30mer*, die mit der Sonde *Dig-adhPNA* hybridisiert wurden.

Konjugatkonzentration (pM)	Mittlere C_T -Werte ($n = 4$) ± 1 SD		ΔC_T -Werte ± 1 SD _{Diff}
	<i>Bio-adh30mer</i>	<i>Bio-mail30mer</i>	
4000	18,83 \pm 0,30	24,78 \pm 0,27	5,95 \pm 0,41
2000	18,78 \pm 0,09	25,73 \pm 0,26	6,95 \pm 0,27
1000	18,71 \pm 0,02	26,49 \pm 0,26	7,78 \pm 0,26
500	19,20 \pm 0,08	27,69 \pm 0,33	8,49 \pm 0,34
250	20,44 \pm 0,10	28,75 \pm 0,10	8,32 \pm 0,14
125	21,80 \pm 0,19	29,95 \pm 0,17	8,15 \pm 0,25

3.3.9.4 Sonstige Parameter

a) Hybridisierungstemperatur

Es wurde getestet, ob eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur auf 48 °C einen Einfluss auf die Effizienz der Hybridisierung hat. Das Zielmolekül *Bio-adh30mer* wurde bei 38 und 48 °C jeweils mit der komplementären Fangsonde *Dig-adhPNA* sowie mit der nicht-komplementären Sonde *Dig-mailPNA* als Negativkontrolle hybridisiert. In Tabelle 3-16 sind vergleichend die resultierenden ΔC_T -Werte für die Konzentrationen 2 nM bis 20 pM des Zielmoleküls zusammengestellt. Die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur auf 48 °C führte bei den getesteten Zielmolekül-Konzentrationen zu einem etwa um Eins niedrigeren ΔC_T -Wert und damit tendenziell zu einer Verschlechterung der Ergebnisse.

Tabelle 3-16 ΔC_T -Werte in der RT-iPCR nach vergleichender Hybridisierung bei 38 oder 48 °C unter Verwendung verschiedener Konzentrationen des Zielmoleküls *Bio-adh30mer*, das mit den Fangsonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* hybridisiert wurde.

Konzentration des Zielmoleküls	ΔC_T -Werte $\pm 1 SD_{Diff}$	
	Hybridisierungstemperatur	
	38 °C	48 °C
2 nM	10,70 \pm 0,27	9,92 \pm 0,19
200 pM	9,26 \pm 0,31	8,20 \pm 0,22
20 pM	6,53 \pm 0,28	5,06 \pm 0,19

b) Blockinglösung

Eine 1:1-Verdünnung der Blockinglösung mit Waschpuffer hatte keinen Einfluss auf die Hybridisierungs- oder Hintergrundsignale der RT-iPCR (Daten nicht gezeigt) und wurde daher für alle folgenden Versuche verwendet.

c) Waschen

Der Einsatz von auf 60 °C erwärmtem Waschpuffer in allen Waschschritten hatte ebenso eine Verschlechterung der ΔC_T -Werte für die eingesetzten Oligonukleotid- und PCR-amplifizierten Zielmoleküle zur Folge wie eine Verdopplung der Anzahl von Waschschritten nach dem Entfernen des Detektionskonjugats (Daten nicht gezeigt).

3.3.10 Detektion eines synthetischen Oligonukleotids

3.3.10.1 Sensitivität

Die Nachweisgrenze (*Limit of detection*, LOD) der RT-iPCR für die DNA-Detektion unter optimalen Bedingungen wurde am Beispiel des synthetischen DNA-Oligonukleotids *Bio-mail48mer*

bestimmt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene molare Mengen des 48-basigen Zielmoleküls mit der Fangsonde *Dig-mailPNA* hybridisiert. Die eingesetzten DNA-Mengen reichten von 60 fmol bis 600 zmol und wurden – wie auch die Leerkontrolle (BC), die reine Hybridisierungslösung enthielt – jeweils in 6 Replikaten untersucht. Der Versuch wurde dreimal an verschiedenen Tagen durchgeführt. In Abbildung 3-19a ist das Ergebnis in Form von Real-Time PCR-Amplifikationskurven dargestellt. Jede der Kurven zeigt für die entsprechende DNA-Konzentration die mittleren Fluoreszenzwerte im Verlauf der Real-Time PCR, gewonnen aus den drei separaten Versuchen. Die Fehlerbalken repräsentieren die einfache Standardabweichung der Fluoreszenz-Datenpunkte.

Um die Nachweisgrenze der RT-iPCR für ein synthetisches Zielmolekül unter optimalen Hybridisierungsbedingungen festzulegen, wurden die erzielten C_T -Werte der eingesetzten DNA-Konzentrationen und der Leerkontrolle von der maximalen Anzahl von 30 PCR-Zyklen subtrahiert. Durch Darstellung der resultierenden ΔC_T -Werte in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge wurde eine Standardkurve generiert (Abbildung 3-19b). Anschließend konnte die Nachweisgrenze anhand einer *cut-off*-Linie bestimmt werden. Diese ist in der Abbildung als gestrichelte Linie dargestellt und repräsentiert einen Grenzwert, der nach DIN 32645 (DIN 2008) durch den mittleren ΔC_T -Wert der Leerkontrolle zuzüglich dessen dreifacher Standardabweichung definiert wurde (siehe auch Adler *et al.* 2007). Der *cut-off* ergab eine Nachweisgrenze von 6 amol des *Bio-mail48mer*-Oligonukleotids. Das entspricht etwa der Detektion von $3,6E+06$ DNA-Molekülen. Der Koeffizient der linearen Regression deutet mit einem Wert von 0,992 auf eine starke Korrelation zwischen der Konzentration des Zielmoleküls und den ΔC_T -Werten hin.

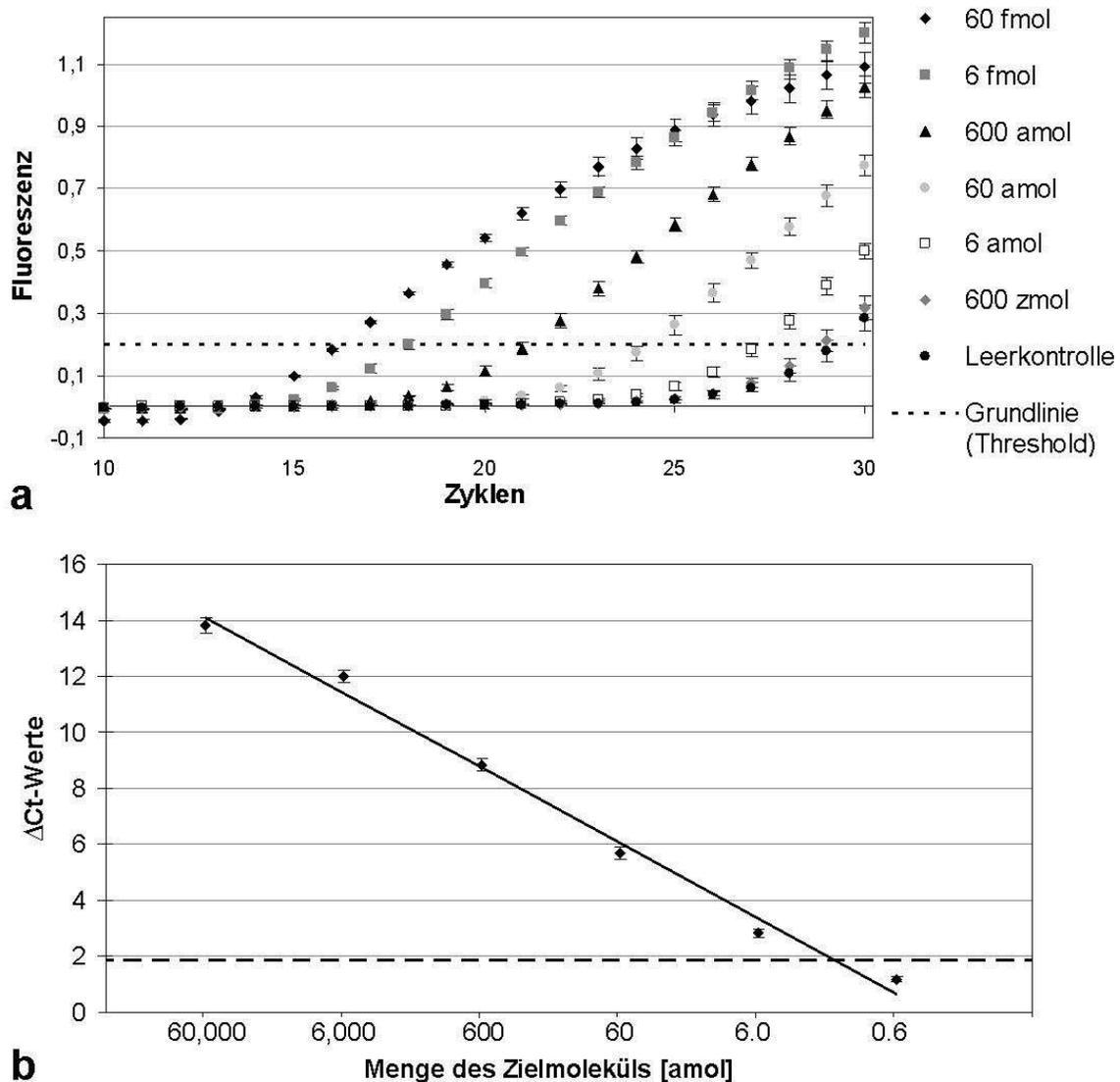


Abbildung 3-19 Effekt der Ziel-DNA-Menge (*Bio-mail48mer*) auf die C_T -Werte in der RT-iPCR. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus drei separaten Versuchen (Fehlerbalken: ± 1 SD) **a**: *TaqMan*-PCR Amplifikationskurven für 60 bis 0 fmol *Bio-mail48mer*. Die gestrichelte Linie zeigt die Fluoreszenz-Grundlinie (Threshold) der Real-Time PCR an. **b**: Standardkurve der ΔC_T -Werte in Abhängigkeit von der Menge an Ziel-DNA mit logarithmischer Skalierung der X-Achse. Die ΔC_T -Werte errechnen sich aus den gemessenen C_T -Werten, die von der maximalen Anzahl von 30 PCR-Zyklen subtrahiert wurden. Die gestrichelte Linie repräsentiert den *cut-off* für die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) für das *Bio-mail48mer*-Molekül. Der *cut-off* ist als der mittlere ΔC_T -Wert der Leerkontrolle +3 SD definiert.

Die Sensitivität der RT-iPCR im Modellversuch für die Detektion der synthetischen Ziel-DNA *Bio-mail48mer* war mit einer Nachweisgrenze von 6 amol ($3,6E+06$ Moleküle, 200 fM) hoch (vergleiche Abschnitt 3.3.15.2). Dies ließ allerdings noch keinen Schluß darauf zu, ob die Sensitivität der RT-iPCR auch für die direkte Hybridisierung genomischer DNA ausreichen würde.

Für die Detektion eines Einzelkopie-Gens in einem komplexen Genom mit einer Größe von 10^8 bis 10^9 bp kann man von der folgenden Rechnung ausgehen: Nach einer Fragmentierung der Proben-DNA in Abschnitte von etwa 500 bp Länge, die in der Regel am besten für Hybridisierungsversuche geeignet ist, wäre eine einzelne Kopie der gesuchten Sequenz von 10^5 bis 10^6 nicht zur Sonde komplementären Fragmenten umgeben (Lucarelli *et al.* 2008). Daraus ergibt sich, dass bei einem Einsatz von 10 µg genomischer, fragmentierter Proben-DNA pro Hybridisierungsreaktion etwa 10-100 pg der gesuchten DNA-Fragmente vorhanden sind. In 10 µg Proben-DNA stehen also $1,8E+13$ unspezifischen 500 bp-Fragmenten etwa $1,8E+07$ bis $1,8E+08$ Ziel-Fragmente gegenüber. Die ermittelte LOD von 6 amol, die der Detektion von etwa $3,6E+06$ Molekülen entspricht, liegt also im erforderlichen Sensitivitätsbereich, um theoretisch eine direkte Detektion eines *single-copy*-Gens in komplexer DNA zu ermöglichen. Allerdings ist die Nachweisgrenze von 6 amol unter optimalen Bedingungen bestimmt worden: In den Versuchen war keine Hintergrund-DNA vorhanden, sodass keinerlei die Detektion erschwerende Faktoren wie sterische Hinderungen oder das Auftreten von Fehl-Hybridisierungen eine Rolle spielten. Zusätzlich bezieht sich die ermittelte LOD lediglich auf die Detektion eines synthetischen Ziel-Moleküls geringer Länge.

3.3.10.2 Präzision

Die Präzision einer Methode ist das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen unabhängigen Messergebnissen, die unter festgelegten Bedingungen erhalten wurden. Eng mit der Messpräzision und Wiederholpräzision (Wiederholbarkeit) einer Methode verbunden sind auch ihre Genauigkeit und Sensitivität (ISO 2005a).

a) Messpräzision

Die Messung mehrerer Replikate einer Probe unter identischen Bedingungen liefert Informationen über die Messpräzision einer Methode bzw. über die *intra-assay*-Variabilität. Für die Prüfung der Präzision wurden in den 3 Sensitivitätsversuchen aus Abschnitt 3.3.10.1 für jede Zielmolekül-Menge und die Leerkontrolle je 6 Replikate eingesetzt. Die Abweichungen der Messergebnisse zwischen den Replikaten werden im Folgenden als Variationskoeffizienten (CV, relative Standardabweichung) der mittleren C_T -Werte ausgedrückt.

In Tabelle 3-17 sind die *intra-assay*-Abweichungen für jeden der drei Versuche anhand der Variationskoeffizienten der 6 Replikate in Prozent angegeben. Die Messabweichungen lagen in allen Fällen im Bereich von 0,3-1,0 % (Mittelwert 0,5 %).

Bereits bei den im Zusammenhang mit der Methodenoptimierung durchgeführten Versuchen (Abschnitt 3.3.9) wurde erkennbar, dass die Präzision der Detektion synthetischer Oligonukleotide mittels RT-iPCR hoch ist. Dies zeigte sich an geringen Standardabweichungen der C_T -Werte für mehrere Replikate, die den gleichen Reaktionsbedingungen unterlagen. Bei den in diesem Abschnitt

besprochenen Versuchen bestätigte sich dieses Ergebnis. Die Abweichungen der mittleren C_T -Werte von unter 1 % weisen auf eine sehr hohe Messpräzision der Methode hin. Zum Vergleich liegt beispielsweise die geforderte optimale Messpräzision für die C_T -Werte von Real-Time PCR-Analysen im höheren Kopienzahl-Bereich bei CV-Werten von < 1 % (Vaerman 2004).

Tabelle 3-17 Messpräzision für die Detektion des Zielmoleküls *Bio-mail48mer* in der RT-iPCR, ausgedrückt als *intra-assay-Variationskoeffizienten*.

<i>Konzentration des Zielmoleküls</i>	<i>Intra-assay-CV^{a)}</i> (%)		
	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>
60 fmol	0,65	0,40	0,72
6 fmol	0,34	0,69	0,41
600 amol	0,29	0,25	0,43
60 amol	0,34	0,39	0,41
6 amol	0,40	0,36	0,56
600 zmol	0,47	0,37	0,47
Leerkontrolle	0,45	0,57	0,52

^a Errechnet aus je 6 Replikaten.

b) Wiederholpräzision

Zusätzlich zur Messpräzision wurde die Wiederholpräzision der Ergebnisse untersucht. Die Wiederholpräzision einer Methode ergibt sich aus der mehrmaligen Durchführung eines methodischen Verfahrens unter denselben Bedingungen – d.h. Probe, Labor und durchführende Person sind bei jeder Durchführung identisch – zu verschiedenen Zeitpunkten (*inter-assay-Variabilität*). Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wurden drei unabhängige, an drei verschiedenen Tagen durchgeführte RT-iPCR-Versuche herangezogen (siehe Abschnitt 3.3.10.1). Schon an den Amplifikationskurven und der Standardkurve in Abbildung 3-19 lässt sich die Wiederholbarkeit der Analyseergebnisse abschätzen. Die Fehlerbalken der Fluoreszenzdaten und der ΔC_T -Werte, die aus den drei separaten Versuchen generiert wurden, sind klein.

In Tabelle 3-18 ist die *inter-assay*-Abweichung als Variationskoeffizient der ΔC_T -Werte aus den drei Versuchen aufgeführt. Sie betrug für die DNA-Mengen oberhalb der Nachweisgrenze 1,8-8,3 % (Mittelwert 3,5 %). Für die 600 zmol-Menge und die Leerkontrolle ergaben sich deutlich höhere Abweichungen von 44,7 % und 46,3 %. Die *inter-assay-CV*-Werte der tatsächlich gemessenen C_T -Werte lagen dagegen für alle DNA-Konzentrationen und die Leerkontrolle zwischen 0,9 und 1,3 % (Mittelwert 0,9 %).

Tabelle 3-18 Wiederholpräzision für die Detektion des Zielmoleküls *Bio-mail48mer* in der RT-iPCR, ausgedrückt als *inter-assay*-Variationskoeffizienten.

Menge des Zielmoleküls	<i>Inter-assay-CV^{a)}</i> (%)	
	der C_T -Werte	der ΔC_T -Werte
60 fmol	0,28	2,73
6 fmol	0,91	1,94
600 amol	1,11	1,80
60 amol	1,26	3,38
6 amol	0,87	8,29
600 zmol	1,19	44,70
Leerkontrolle	1,25	46,28

^a Errechnet aus je in 3 separaten RT-iPCR-Versuchen gemessenen mittleren C_T - ($n = 6$) bzw. ΔC_T -Werten.

Der Anstieg der *inter-assay*-CV-Werte mit abnehmender Menge Ziel-DNA ist durch die Darstellung der Ergebnisse als ΔC_T -Werte bedingt. Diese werden mit sinkender Menge Ziel-DNA kleiner. Die *inter-assay*-Abweichungen der tatsächlich gemessenen C_T -Werte waren für alle DNA-Konzentrationen und die Leerkontrolle sehr gering. Sie nehmen lediglich einen umso höheren Anteil der ΔC_T -Werte ein, je kleiner diese sind. Die RT-iPCR detektierte das synthetische Zielmolekül *Bio-mail48mer* also mit einer sehr guten Wiederholbarkeit. Zum Vergleich liegt die Wiederholpräzision von Real-Time PCR-Analysen bezogen auf die C_T -Werte im Bereich von 5-14 % (Gasparic *et al.* 2008).

3.3.11 Detektion synthetischer Oligonukleotide in Mischungen

3.3.11.1 Selektivität

Um zu untersuchen, ob die DNA-Detektion mittels RT-iPCR selektiv ist und auf Sequenzspezifischer Hybridisierung beruht, wurden verschiedene PNA-Sonden für die Detektion komplementärer DNA-Oligonukleotide verwendet. Diese Zielmoleküle wurden vor der Hybridisierung mit nicht-komplementären Oligonukleotiden gemischt (Tabelle 3-19).

Tabelle 3-19 DNA-Mischungen für die Untersuchung der RT-iPCR-Selektivität.

<i>PNA-Sonde</i>	<i>Komplementäres Zielmolekül</i>	<i>Für die Mischungen verwendetes, nicht-komplementäres Oligonukleotid</i>
Dig-adhPNA	Bio-adh30mer	Bio-mail30mer
	Bio-adh48mer	Bio-mail48mer
Dig-mailPNA	Bio-mail30mer	Bio-adh30mer
	Bio-mail48mer	Bio-adh48mer
Dig-hmgPNA	Bio-hmg30mer	Bio-inv30mer
Dig-invPNA	Bio-inv30mer	Bio-hmg30mer

Jede PNA-Sonde wurde mit biotinylierten Oligonukleotiden in einer Gesamtkonzentration von 2 nM inkubiert, die ein zur jeweiligen Sonde komplementäres DNA-Molekül in Anteilen von 100, 25, 6,25, 1,56, 0,4 oder 0 % enthielten. Die 0 %-Konzentration (100% nicht-komplementäres Oligonukleotid) diente als negative Hybridisierungskontrolle (NHC). Es wurden 3 identische Versuche an 3 verschiedenen Tagen durchgeführt. Jede Mischung wurde in 6 Replikaten pro Versuch analysiert.

In Abbildung 3-20 sind die Ergebnisse als ΔC_T -Werte dargestellt, die aus den mittleren gemessenen C_T -Werten der jeweiligen Mischung, subtrahiert vom mittleren C_T -Wert der NHCs, errechnet wurden. Alle Konzentrationen jedes Zielmoleküls wurden mit der RT-iPCR Sequenz-spezifisch detektiert. Die ΔC_T -Werte reichten von 5,02 - 10,6 (Mittelwert $8,79 \pm 2,13$) für die 100 %-Konzentration bis zu 0,56 - 4,49 (Mittelwert $2,72 \pm 1,6$) für die 0,4 %-Konzentration und wiesen damit deutliche Unterschiede in der Signalstärke auf: die beiden Zielmoleküle *Bio-hmg30mer* und *Bio-adh30mer* ergaben in allen Konzentrationen geringere ΔC_T -Werte als die anderen Oligonukleotide. Dadurch war für diese Oligonukleotide im unteren Konzentrationsbereich nur eine schwache Diskriminierung vom NHC-Signal möglich.

Die in Tabelle 3-20 aufgelisteten mittleren C_T -Werte für die verschiedenen DNA-Mischungen und Konzentrationen geben Aufschluss über die Ursache: Die niedrigen ΔC_T -Werte beruhten nicht auf einem schwächeren Hybridisierungs-, sondern auf einem verstärkten Hintergrundsignal. Die C_T -Werte für *Bio-hmg30mer* und *Bio-adh30mer* unterschieden sich für die 100 bis 0,4 %-Konzentrationen nicht von denen der anderen Zielmoleküle: Alle Zielmoleküle ergaben C_T -Werte zwischen 16,01 und 16,49 für die 100 %-Konzentration und zwischen 20,47 und 23,76 für die 0,4 %-Konzentration. Dagegen waren die C_T -Werte der NHCs für *Bio-hmg30mer* und *Bio-adh30mer* mit Werten von $21,03 \pm 0,05$ und $24,14 \pm 0,26$ erniedrigt (jeweils $p < 0,05$ im Mann-Whitney *U* Test). Alle anderen negativen Hybridisierungskontrollen wiesen einen mittleren C_T -Wert von $26,13 \pm 0,4$ auf.

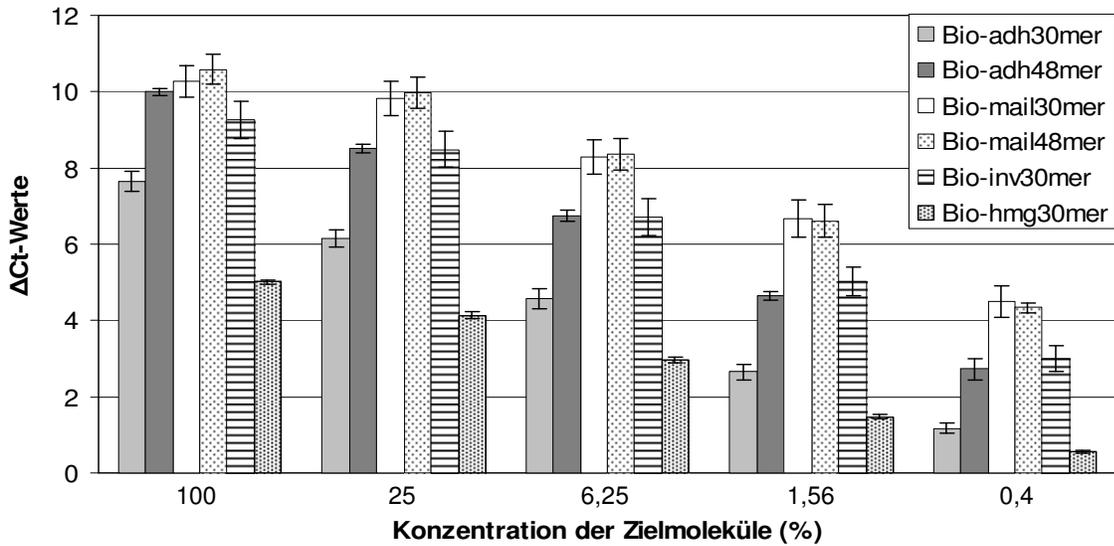


Abbildung 3-20 Detektion gemischter, synthetischer Oligonukleotide mittels RT-iPCR. Verschiedene DNA-Oligonukleotide wurden in Konzentrationen von 100 bis 0,4 % mit nicht-komplementären Oligonukleotiden auf eine Gesamtkonzentration von 2 nM aufgefüllt und mit den korrespondierenden PNA-Sonden in der RT-iPCR detektiert. Die ΔC_T -Werte wurden für jede Mischung errechnet, indem der mittlere gemessene C_T -Wert vom C_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle (100 % nicht-komplementäres Oligonukleotid) subtrahiert wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SD aus 3 separaten Versuchen.

Tabelle 3-20 Selektive Detektion synthetischer Zielmoleküle in Oligonukleotid-Mischungen.

Konz. der Zielmoleküle (%)	Mittlere C_T -Werte ($n = 3$) ^a ± 1 SD					
	Bio-adh30mer	Bio-adh48mer	Bio-mail30mer	Bio-mail48mer	Bio-hmg30mer	Bio-inv30mer
100	16,49 \pm 0,03	16,49 \pm 0,04	16,19 \pm 0,02	16,14 \pm 0,01	16,01 \pm 0,06	16,5 \pm 0,01
25	17,98 \pm 0,12	17,97 \pm 0,06	16,65 \pm 0,06	16,76 \pm 0,04	16,89 \pm 0,07	17,27 \pm 0,05
6,25	19,54 \pm 0,19	19,74 \pm 0,13	18,18 \pm 0,13	18,36 \pm 0,04	18,07 \pm 0,05	19,04 \pm 0,08
1,56	21,47 \pm 0,17	21,83 \pm 0,09	19,8 \pm 0,15	20,13 \pm 0,11	19,56 \pm 0,04	20,74 \pm 0,13
0,4	22,95 \pm 0,12	23,76 \pm 0,26	21,99 \pm 0,2	22,40 \pm 0,28	20,47 \pm 0,08	22,75 \pm 0,16
0,0	24,13 \pm 0,26	26,49 \pm 0,06	26,48 \pm 0,42	26,73 \pm 0,39	21,03 \pm 0,05	25,75 \pm 0,50

^a Errechnet aus in 3 separaten RT-iPCR-Versuchen gemessenen mittleren C_T -Werten ($n = 6$).

3.3.11.2 Präzision

a) Messpräzision

Die *intra-assay*-Variationskoeffizienten für jeweils 6 Messreplikate waren durchgehend niedrig (Tabelle 3-21). Sie lagen für alle Versuche und Mischungen zwischen 0,11 und 1,37 % (Mittelwert 0,51 %).

Tabelle 3-21 Messpräzision der Detektion synthetischer Zielmoleküle in Oligonukleotid-Mischungen, ausgedrückt als *intra-assay*-Variationskoeffizienten.

Konz. des Ziel- moleküls (%)	Ver- such	Intra-assay-CV ^{a)} (%)					
		Bio- adh30mer	Bio- adh48mer	Bio- mail30mer	Bio- mail48mer	Bio- hmg30mer	Bio- inv30mer
100	1	0,68	0,96	0,30	0,68	0,86	0,86
	2	0,75	0,68	0,59	0,53	1,02	0,59
	3	0,76	0,73	0,45	0,75	0,61	0,49
25	1	0,78	0,32	0,65	0,86	0,43	0,48
	2	0,53	0,38	0,56	0,53	0,69	0,65
	3	0,42	0,56	0,87	0,55	0,43	0,39
6,25	1	0,72	1,00	0,24	0,75	0,48	0,48
	2	0,72	1,07	0,32	0,33	0,43	0,22
	3	0,22	0,63	0,42	0,11	0,54	0,33
1,56	1	0,30	0,54	0,28	0,84	0,15	0,53
	2	0,53	0,78	0,47	0,50	0,28	0,34
	3	0,70	0,89	0,46	0,63	0,36	0,53
0,4	1	0,65	0,86	0,42	0,77	0,57	0,45
	2	0,65	0,44	0,62	0,40	0,43	0,31
	3	0,22	0,74	0,84	0,43	0,34	0,36
0,0	1	0,38	1,37	0,41	0,78	0,61	0,41
	2	0,14	0,63	0,23	0,93	0,31	0,86
	3	0,50	0,45	0,66	0,58	0,25	0,63

^{a)} Errechnet aus je 6 Messreplikaten.

b) Wiederholpräzision

Zur Abschätzung der Wiederholpräzision für die Detektion gemischter, synthetischer Zielmoleküle wurde für jede Konzentration die *inter-assay*-Abweichung als Variationskoeffizient aus 3 separaten Versuchen in Tabelle 3-22 zusammengestellt. Wie in Abschnitt 3.3.10.2 beschrieben, nahmen auch

Ergebnisse und Diskussion

in diesem Fall wegen der Darstellung der Ergebnisse als ΔC_T -Werte die prozentualen Abweichungen mit sinkender Zielmolekül-Konzentration zu und lagen daher im CV-Bereich von 0,86 bis 11,66 %. Die Abweichung der tatsächlich gemessenen C_T -Werte war dagegen mit CV-Werten zwischen 0,04 und 1,96 % (Mittel 0,64 %) wieder sehr gering (Tabelle 3-23).

Tabelle 3-22 Wiederholpräzision der Detektion synthetischer Zielmoleküle in Oligonukleotid-Mischungen, ausgedrückt als Variationskoeffizienten der ΔC_T -Werte.

Konzentration der Zielmoleküle (%)	Inter-assay-CV der ΔC_T -Werte ^{a)} (%)					
	Bio-adh30mer	Bio-adh48mer	Bio-mail30mer	Bio-mail48mer	Bio-hmg30mer	Bio-inv30mer
100	3,46	0,86	3,99	3,69	1,13	5,32
25	3,65	1,34	4,64	4,17	2,26	5,54
6,25	5,66	2,31	5,48	4,89	2,76	7,26
1,56	7,98	2,50	7,16	6,48	3,82	7,48
0,4	11,66	10,23	9,01	3,08	7,70	11,48

^a Bezogen auf die ΔC_T -Werte, die aus 3 separaten RT-iPCR-Versuchen gewonnen wurden.

Tabelle 3-23 Wiederholpräzision der Detektion synthetischer Zielmoleküle in Oligonukleotid-Mischungen, ausgedrückt als Variationskoeffizienten der gemessenen C_T -Werte.

Konzentration der Zielmoleküle (%)	Inter-assay-CV der C_T -Werte ^{a)} (%)					
	Bio-adh30mer	Bio-adh48mer	Bio-mail30mer	Bio-mail48mer	Bio-hmg30mer	Bio-inv30mer
100	0,18	0,22	0,09	0,04	0,35	0,09
25	0,64	0,33	0,37	0,22	0,42	0,31
6,25	0,95	0,66	0,70	0,22	0,27	0,42
1,56	0,80	0,40	0,74	0,52	0,22	0,62
0,4	0,54	1,10	0,90	1,24	0,37	0,70
0,0	1,08	0,23	1,59	1,44	0,24	1,96

^a Bezogen auf die C_T -Werte, die in 3 separaten RT-iPCR-Versuchen gemessen wurden.

3.3.12 Detektion PCR-amplifizierter Proben-DNA

Für eine direkte Hybridisierung genomischer DNA wird die Proben-DNA in der Regel mit verschiedenen Methoden wie Sonifikation oder Enzymverdau (DNase oder Restriktionsenzyme) zerkleinert, sodass Fragmente mit einer Länge von etwa 500 bp entstehen (Lucarelli *et al.* 2008, Sambrook & Russell 2001). Um die Versuchsbedingungen dieser Arbeit den realen Analysebedingungen anzunähern, war daher ein erster Schritt der Einsatz längerer, doppelsträngiger Zielmole-

küle, die mithilfe der PCR aus echtem Probenmaterial amplifiziert und anstelle synthetischer Oligonukleotide in der RT-iPCR eingesetzt wurden. Mithilfe der PCR wurden doppelsträngige, biotinylierte Zielmoleküle mit einer Länge von 70 und ca. 500 bp hergestellt.

Die Moleküle wurden entweder mithilfe biotinylierter Primer bis-biotinyliert (*Bio-adh50bp*, *Bio-adh70bp*, *Bio-adh512bp*, *Bio-mail483bp*), um die Vergleichbarkeit mit den ebenfalls an ihrem Ende biotinylierten, synthetischen Oligonukleotid-Zielmolekülen zu gewährleisten. Oder sie wurden durch den Einsatz biotinylierter Nukleotide im Laufe der PCR multi-biotinyliert (*Multi-Bio-adh70bp*, *Multi-Bio-adh512bp*). Dies geschah, um zu überprüfen, ob bei einer direkten Hybridisierung genomischer DNA aus realen DNA-Proben der Einsatz von Markierungs-Strategien möglich wäre, die zu einer Multi-Biotinylierung führen (z.B. Klenow-Markierung). Außerdem wurde angenommen, dass das Vorhandensein einer Vielzahl von Biotin-Molekülen pro hybridisiertem DNA-Molekül die Sensitivität der Detektion durch Bindung mehrerer Oligomere des Detektionskonjugats erhöhen würde. Die PCR-Produkte wurden als Zielmoleküle in verschiedenen RT-iPCR-Versuchen verwendet.

3.3.12.1 Vergleich von Ziel-Molekülen unterschiedlicher Längen und Biotinylierungsgrade

a) Vergleich von Oligonukleotiden mit PCR-Amplifikaten

In Abbildung 3-21 und Tabelle 3-24 sind beispielhaft die ΔC_T -Werte für synthetische und mittels PCR hergestellte, multi-biotinylierte Zielmoleküle dargestellt, die parallel in einer Konzentration von je 200 pM in der RT-iPCR eingesetzt und jeweils mit den Fangsonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* hybridisiert wurden. Der mittlere C_T -Wert des positiven Signals, bei dem das Zielmolekül mit der komplementären Fangsonde hybridisiert wurde (*Dig-adhPNA* für die Zielmoleküle *Bio-adh16mer*, *Bio-adh30mer* und *Multi-Bio-adh70bp*; *Dig-mailPNA* für *Bio-mail30mer* und *Multi-Bio-mail70bp*), wurde jeweils von dem der NHC, bei dem das Zielmolekül mit der nicht-komplementären Sonde hybridisiert wurde, subtrahiert. Die Differenzen sind als ΔC_T -Werte angegeben.

Die beiden multi-biotinylierten PCR-Fragmente wiesen kleinere ΔC_T -Werte auf als die korrespondierenden Oligonukleotide. Die kleineren ΔC_T -Werte waren durch ein deutlich schwächeres positives Hybridisierungssignal (grau hervorgehobene C_T -Werte in Tabelle 3-24) bedingt. Die C_T -Werte der negativen Hybridisierungskontrollen hingegen waren mit denen der Oligonukleotid-Moleküle vergleichbar.

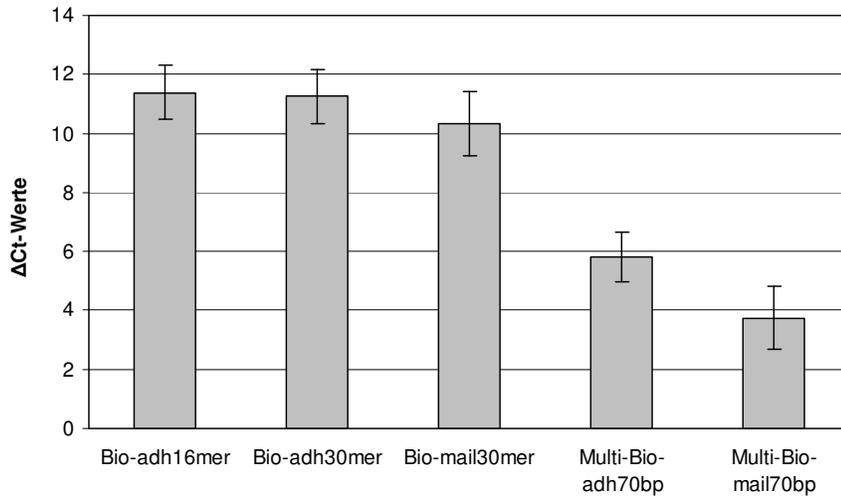


Abbildung 3-21 Parallele Detektion synthetischer und PCR-amplifizierter Ziel-DNA in der RT-iPCR. Die synthetischen Oligonukleotide *Bio-adh16mer*, *Bio-adh30mer* und *Bio-mail30mer* sowie die PCR-Fragmente *Multi-Bio-adh70bp* und *Multi-Bio-mail70bp* wurden jeweils in einer Konzentration von 200 pM mit den beiden Fangsonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* hybridisiert. Die ΔC_T -Werte wurden errechnet, indem jeweils der aus der Hybridisierung mit der komplementären Fangsonde resultierende mittlere C_T -Wert von dem der Negativkontrolle (Hybridisierung mit der nicht-komplementären Sonde) subtrahiert wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung dieser Differenz.

Tabelle 3-24 Vergleich der C_T -Werte verschiedener synthetischer und mittels PCR hergestellter Zielmoleküle in der RT-iPCR.

Zielmolekül	Mittlere C_T -Werte ($n = 6$) ± 1 SD		ΔC_T -Werte ± 1 SD _{Diff}
	<i>Dig-adhPNA</i>	<i>Dig-mailPNA</i>	
Bio-adh16mer	22,55 \pm 0,73	33,92 \pm 0,55	11,37 \pm 0,91
Bio-adh30mer	23,66 \pm 0,56	34,91 \pm 0,74	11,25 \pm 0,92
Bio-mail30mer	31,94 \pm 0,71	21,61 \pm 0,85	10,33 \pm 1,11
Multi-Bio-adh70bp	29,58 \pm 0,49	35,38 \pm 0,67	5,80 \pm 0,83
Multi-Bio-mail70bp	33,79 \pm 0,49	30,04 \pm 0,97	3,75 \pm 1,09

Grau hervorgehobene Zahlen kennzeichnen die C_T -Werte des jeweiligen positiven Hybridisierungssignals, bei dem das Zielmolekül mit der komplementären Fangsonde hybridisiert wurde.

b) Vergleich unterschiedlicher Biotinylierungsgrade

In Tabelle 3-25 werden die C_T - und ΔC_T -Werte einiger PCR-Fragmente verglichen, die als Zielmoleküle in der RT-iPCR eingesetzt wurden und sich in ihrem Biotinylierungsgrad unterschieden. Sie wurden wieder jeweils in einer Konzentration von 200 pM mit zwei verschiedenen PNA-Sonden hybridisiert.

Tabelle 3-25 Vergleichende Detektion der PCR-Fragmente *Multi-Bio-adh70bp*, *Bio-adh70bp*, *Multi-Bio-adh512bp* und *Bio-adh512bp*, die jeweils mit den Fangsonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* in der RT-iPCR hybridisiert wurden.

Zielmolekül ^{a)}	Versuch	n	Mittlere C_T -Werte ^{b)} ± 1 SD		ΔC_T -Wert ± 1 SD _{Diff}
			<i>Dig-adhPNA</i>	<i>Dig-mailPNA</i>	
Multi-Bio-adh70bp	1	6	29,58 \pm 0,49	35,38 \pm 0,67	5,80 \pm 0,83
	2	6	29,74 \pm 0,87	35,47 \pm 1,19	5,73 \pm 1,47
	3	6	29,62 \pm 1,34	34,62 \pm 0,42	5,00 \pm 1,40
Bio-adh70bp	1	5	23,73 \pm 0,22	27,94 \pm 0,86	4,21 \pm 0,89
	2	4	21,62 \pm 0,11	26,34 \pm 0,13	4,72 \pm 0,17
	3	4	22,59 \pm 0,13	27,16 \pm 0,08	4,65 \pm 0,15
Multi-Bio-adh512bp	1	4	31,08 \pm 0,75	34,41 \pm 0,83	3,33 \pm 1,12
	2	4	30,03 \pm 0,99	32,16 \pm 1,09	2,13 \pm 1,47
Bio-adh512bp	1	5	26,61 \pm 1,89	32,12 \pm 0,99	5,50 \pm 2,13
	2 ^{c)}	4	16,76 \pm 0,22	21,19 \pm 0,13	4,43 \pm 0,26

^{a)} Konzentration jeweils 200 pM; ^{b)} Arithmetisches Mittel aus je n Replikaten; ^{c)} Real-Time PCR-Threshold = 0,03

Alle errechneten ΔC_T -Werte der PCR-Amplifikate waren mit 2,13 bis 5,80 signifikant kleiner als die ΔC_T -Werte, die sich unter gleichen Bedingungen für die synthetischen Oligonukleotid-Zielmoleküle ergaben (ca. 9 bis 11; siehe z.B. Tabelle 3-24). Es ergab sich kein deutlicher Hinweis darauf, dass der Grad der Biotinylierung (Bis- oder Multi-Biotinylierung) einen Einfluss auf die ΔC_T -Werte hatte: Bei den Molekülen *Multi-Bio-adh70bp* und *Bio-adh70bp* wurde zwar ein tendenzieller Vorteil der Multi-Biotinylierung sichtbar. Bei den beiden längeren Molekülen *Multi-Bio-adh512bp* und *Bio-adh512bp* war jedoch das Gegenteil der Fall.

Das multi-biotinylierte Molekül *Multi-Bio-adh70bp* ergab ein schwächeres Hybridisierungssignal (Mittlerer C_T -Wert 29,65 \pm 0,08) als das bis-biotinylierte *Bio-adh70bp* (mittlerer C_T -Wert 22,64 \pm 1,06). Gleichzeitig war der Hintergrund bei dem *Multi-Bio-adh70bp*-Molekül geringer (mittlerer C_T -Wert 35,16 \pm 0,47) als bei *Bio-adh70bp* (mittlerer C_T -Wert 27,15 \pm 0,80). Für die beiden 512 bp langen Zielmoleküle zeichnete sich eine ähnliche Tendenz ab. Obwohl sich die resultierenden ΔC_T -Werte nicht signifikant unterschieden, könnte das insgesamt schwächere Hybridisierungssignal der

multi-biotinylierten Moleküle bei der Detektion geringerer Zielmolekül-Konzentrationen problematisch sein. Es ist fraglich, ob möglicherweise ein Absenken des Real-Time PCR-Thresholds wie bei Versuch 2 des *Bio-adh512bp*-Moleküls (Threshold = 0,03) praktikabel sein könnte, um die schwächeren Signale der multi-biotinylierten Moleküle auszugleichen. Insgesamt wurde das Ergebnis der Hybridisierung der PCR-generierten Zielmoleküle als ungünstig beurteilt, da sich die im Vergleich zur Oligonukleotid-Detektion kleineren ΔC_T -Werte im getesteten mittleren Konzentrationsbereich von 200 pM vermutlich negativ auf die Sensitivität der Detektion in unteren Konzentrationsbereichen auswirken würden.

Als Ursache für die niedrigen ΔC_T -Werte wurden unter anderem sterische Hinderungen bei der Hybridisierung in Betracht gezogen, die durch eine für die größeren Zielmoleküle zu dichte Verteilung der Fangsonden auf der Gefäßoberfläche bedingt sein konnten. Daher wurde erneut die optimale Konzentration der Fangsonden bei der Plattenbeschichtung untersucht (3.3.9.2 b). Eine Erniedrigung der PNA-Sondenkonzentration in der Beschichtungslösung auf 2 nM resultierte jedoch in einer weiteren Verschlechterung der ΔC_T -Werte, sodass die ursprüngliche Sondenkonzentration von 20 nM in den nachfolgenden Experimenten beibehalten wurde.

3.3.12.2 Längen-unabhängiger Vergleich eines PCR-Amplikons mit einem synthetischen Oligonukleotid

Für einen längenunabhängigen Vergleich eines mittels PCR hergestellten Zielmoleküls mit einem synthetischen Oligonukleotid-Zielmolekül wurde das bis-biotinylierte Zielmolekül *Bio-adh50bp* hergestellt und vergleichend mit dem Oligonukleotid *Bio-adh48mer* in der RT-iPCR untersucht. In Tabelle 3-26 sind die C_T - und ΔC_T -Werte aufgelistet, die sich aus der Hybridisierung der beiden Zielmoleküle in einer jeweiligen Konzentration von 200 pM mit zwei verschiedenen PNA-Sonden ergaben.

Tabelle 3-26 Vergleichende Detektion des mittels PCR hergestellten Zielmoleküls *Bio-adh50bp* und des etwa gleich langen synthetischen Oligonukleotids *Bio-adh48mer* nach Hybridisierung mit den Fangsonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* in der RT-iPCR.

Versuch	Zielmolekül ^{a)}	n	Mittlere C_T -Werte ^{b)} ± 1 SD		ΔC_T -Wert ± 1 SD _{Diff}
			<i>Dig-adhPNA</i>	<i>Dig-mailPNA</i>	
1	Bio-adh50bp	5	23,17 \pm 0,26	28,22 \pm 0,22	5,04 \pm 0,34
	Bio-adh48mer	5	17,76 \pm 0,09	27,94 \pm 0,23	10,18 \pm 0,25
2	Bio-adh50bp	4	20,96 \pm 0,13	26,34 \pm 0,13	5,25 \pm 0,18
	Bio-adh48mer	4	17,49 \pm 0,54	26,57 \pm 0,06	9,08 \pm 0,54

^a Konzentration jeweils 200 pM; ^b Arithmetisches Mittel aus je n Replikaten.

Mit einem mittleren ΔC_T -Wert von $5,15 \pm 0,15$ ($n = 2$) war eine Diskriminierung zwischen positivem Signal und Negativkontrolle bei dem mittels PCR hergestellten *Bio-adh50bp*-Molekül schlechter möglich als bei dem synthetischen Oligonukleotid *Bio-adh48mer* mit einem mittleren ΔC_T -Wert von $9,63 \pm 0,78$ ($n = 2$). Die beiden Moleküle waren etwa gleich lang und unterschieden sich auch nicht hinsichtlich ihres Biotinylierungsgrads. Außerdem waren die C_T -Werte der jeweiligen Negativkontrolle (Hybridisierung mit der nicht-komplementären Sonde *Dig-mailPNA*) für beide Moleküle gleich. Die Messergebnisse unterschieden sich ausschließlich in ihrem positiven Hybridisierungssignal. Diese Beobachtung bestätigte sich auch in anderen RT-iPCR-Versuchen, beispielsweise bei einem Vergleich der Moleküle *Bio-adh30mer* und *Bio-adh70bp* (Daten nicht gezeigt). Es ließ sich daraus schließen, dass bei dem *Bio-adh50bp* und anderen mittels PCR hergestellten Zielmolekülen die Hybridisierung der Moleküle an die komplementären Fangsonden gestört war.

Die synthetischen Oligonukleotide lagen bei der Hybridisierung bereits als Einzelstrang vor, während die mittels PCR hergestellten Zielmoleküle doppelsträngig waren und vor der Hybridisierung denaturiert werden mussten. Vorstellbar war daher eine unzureichende Denaturierung als Ursache für die schlechteren ΔC_T -Werte. Man kann davon ausgehen, dass das verwendete Denaturierungsprotokoll (Inkubation der DNA bei 95 °C für mindestens 6 min und sofort anschließendes Abkühlen im Eisbad) die Doppelstränge der kurzen PCR-Amplifikate zuverlässig in Einzelstränge auftrennte (Sambrook & Russell 2001). Wang *et al.* (2004) haben allerdings beschrieben, dass es bei kleinen Reaktionsvolumina zu einer raschen Wiederanlagerung (*re-annealing*) der Einzelstränge nach der Denaturierung kommen kann. Dies hätte bei der Verwendung von mittels PCR hergestellter Ziel-DNA möglicherweise eine reduzierte Verfügbarkeit einzelsträngiger Zielmoleküle während der Hybridisierung zur Folge, die die Ursache für das geschwächte Hybridisierungssignal sein konnte.

3.3.12.3 Denaturierung

Eine mögliche Wiederanlagerung der komplementären Stränge der denaturierten Ziel-DNA aufgrund der kleinen Reaktionsvolumina in der RT-iPCR würde auch bei der Untersuchung echter Proben-DNA die Sensitivität der Methode wahrscheinlich stark vermindern. Deshalb wurde ein alternatives Denaturierungsverfahren für eine mögliche Verbesserung der Detektion doppelsträngiger Ziel-DNA untersucht. Minunni *et al.* (2005) haben in ihren Arbeiten zur direkten Hybridisierung genomischer DNA an piezoelektrische Biosensoren eine einfache Denaturierungsmethode beschrieben, mit deren Hilfe auch bei kleinen Reaktionsvolumina eine nachhaltige Denaturierung erreicht werden konnte. Sie kombinierten die herkömmliche thermische Denaturierung mit dem Einsatz sogenannter „Blocking-Oligonukleotide“, die durch Bindung an die die Sonden-

Ergebnisse und Diskussion

bindungsstelle flankierenden Sequenzen ein *re-annealing* der Einzelstränge verhindern sollen, und detektierten mit Hilfe dieser Methode erfolgreich genomische DNA-Sequenzen in boviner DNA.

In vier separaten RT-iPCRs wurde untersucht, welchen Einfluss die Denaturierungsmethode auf die Detektion der Zielmoleküle *Bio-adh70bp* und *Bio-adh512bp* hatte. Die Hybridisierungssignale der Ziel-Moleküle mit der Sonde *Dig-adhPNA* blieben konstant, unabhängig davon, ob die klassische thermische Denaturierung oder eine thermische Denaturierung mit zusätzlichem Einsatz von Blocking-Oligonukleotiden verwendet wurde (Tabelle 3-27). Eine das Annealing der Blocking-Oligonukleotide begünstigende Veränderung der Oligonukleotid-Konzentration oder Annealing-Temperatur hatte keine Auswirkung auf die Hybridisierungssignale oder ΔC_T -Werte. Bei den Untersuchungen der Denaturierung wurde darauf geachtet, den Zeitraum zwischen Denaturierung der Ziel-DNA und Beginn der Hybridisierungsreaktion so kurz wie möglich zu halten (ca. 1 – 3 min). Dies könnte möglicherweise der Grund für das im Vergleich zu vorherigen Versuchen mit einem C_T -Wert von ca. 22,5 verbesserte Hybridisierungssignal des *Bio-adh512bp*-Amplifikons sein.

Tabelle 3-27 Detektion der Zielmoleküle *Bio-adh70bp* und *Bio-adh512bp* mit den Fangsonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* nach Verwendung verschiedener Denaturierungsmethoden für die Hybridisierung.

Ziel- molekül ^{a)}	Thermische Denaturierung + Blocking-Oligonukleotide					Thermische Denaturierung		
	Block- ing- Oligo- Nukl. Konz. (nM)	Anneal- ing- Temp. (°C)	Mittlere C_T -Werte ($n = 4$) $\pm 1 SD$		ΔC_T -Werte $\pm 1 SD_{Diff}$	Mittlere C_T -Werte ($n = 4$) $\pm 1 SD$		ΔC_T -Werte $\pm 1 SD_{Diff}$
			<i>Dig- adhPNA</i>	<i>Dig- mailPNA</i>		<i>Dig- adhPNA</i>	<i>Dig- mailPNA</i>	
Bio- adh70bp	200	57	22,51 \pm 0,05	28,91 \pm 0,05	6,40 \pm 0,10	22,41 \pm 0,10	28,45 \pm 0,10	6,04 \pm 0,14
	1000	54	22,34 \pm 0,02	28,47 \pm 0,16	6,13 \pm 0,16	22,37 \pm 0,11	27,98 \pm 0,08	5,61 \pm 0,14
	1000	45	22,49 \pm 0,06	28,14 \pm 0,17	5,65 \pm 0,18	22,81 \pm 0,18	27,78 \pm 0,12	4,97 \pm 0,22
Bio- adh512bp	1000	50	22,62 \pm 0,12	27,26 \pm 0,24	4,64 \pm 0,27	22,47 \pm 0,16	27,20 \pm 0,10	4,73 \pm 0,19

^a Konzentration jeweils 200 pM

In zusätzlichen Versuchen unter Verwendung des Zielmoleküls *Bio-adh512bp* wurden eine Erhöhung der Oligonukleotid-Konzentration auf 2 μ M, die Verwendung von PCR-Puffer für die Durchführung der Denaturierung und des Annealings sowie weitere Variationen der Annealing-Temperaturen getestet, ohne dass eine Verbesserung der Hybridisierungssignale beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine zusätzliche Denaturierungsstrategie nach dem Prinzip der alkalischen Denaturierung mittels Natriumhydroxid war ebenso erfolglos (Daten nicht gezeigt).

Die Kombination aus thermischer Denaturierung und dem Einsatz von Blocking-Oligonukleotiden in unterschiedlichen Konzentrationen ergab auch bei dem Zielmolekül *Bio-mail483bp* keine Er-

höhung der Hybridisierungssignale oder der ΔC_T -Werte im Vergleich zur herkömmlichen Hitze-denaturierung (Abbildung 3-22).

Das im Zeitraum direkt vor dieser Versuchsdurchführung erstmals hergestellte *Bio-mail483bp*-Molekül zeigte aber insgesamt bemerkenswert hohe ΔC_T -Werte: Der mittlere ΔC_T -Wert lag, unabhängig von der verwendeten Denaturierung, bei $9,45 \pm 0,20$. Dieser ΔC_T -Wert war erstmals mit den ΔC_T -Werten der synthetischen Oligonukleotide bei gleicher Konzentration vergleichbar. Die C_T -Werte der Negativkontrolle (*Bio-mail483bp* mit *Dig-adhPNA*) war mit Werten zwischen 27,70 und 28,19 (Mittelwert $27,97 \pm 0,18$) vergleichbar mit den bei anderen doppelsträngigen Zielmolekülen beobachteten Werten. Die eingesetzte 200 pM Konzentration des *Bio-mail483bp*-Moleküls ergab jedoch mit C_T -Werten zwischen 18,46 und 18,59 (Mittelwert $18,52 \pm 0,05$) ein signifikant stärkeres positives Signal in der RT-iPCR als beispielsweise das Zielmolekül *Bio-adh512bp*. Dies deutete darauf hin, dass die geringe Hybridisierungseffizienz der *adh*-Moleküle sequenzbedingt sein könnte.

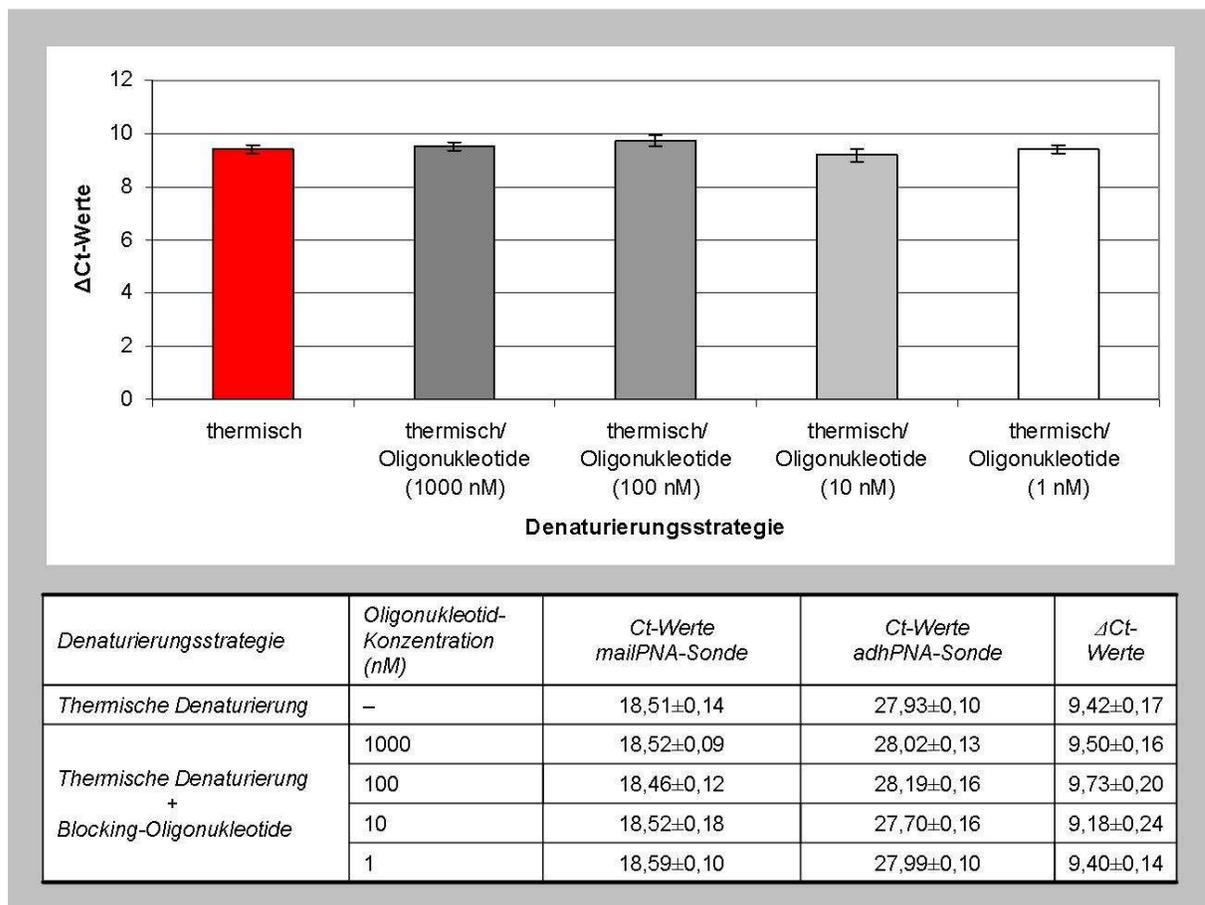


Abbildung 3-22 C_T -Werte und ΔC_T -Werte für das Zielmolekül *Bio-mail483bp* (200 pM) in Abhängigkeit von der verwendeten Denaturierungs-Strategie in der RT-iPCR. Die C_T -Werte sind als arithmetisches Mittel aus je 4 Replikaten plus/minus der einfachen Standardabweichung angegeben. Die ΔC_T -Werte sind plus/minus der Standardabweichung der Differenz angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren ebenfalls die Standardabweichung der Differenz.

3.3.12.4 Sensitivität

Aus genomischer Mais-DNA der GV-Maislinie MON810 wurde das PCR-Amplikon *Bio-mail483bp* amplifiziert, mit anderen PCR-Fragmenten gemischt und in der RT-iPCR detektiert. Das *Bio-mail483bp*-Molekül hat eine Länge von 483 bp und enthält die zur Fangsonde *Dig-mailPNA* komplementäre Sequenz, die im Bereich des Übergangs von Wirtsgenom und Transgen (35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus) liegt und für den *event*-spezifischen Nachweis von MON810 geeignet ist (Holck *et al.* 2002). Das *Bio-mail483bp*-Fragment wurde vor der Detektion mit den nicht zur *Dig-mailPNA*-Sonde komplementären PCR-Amplifikaten *Bio-adh70bp* oder *Bio-adh512bp* gemischt. In den Hybridisierungen wurden biotinylierte DNA-Moleküle in einer konstanten Gesamtkonzentration von 2 nM eingesetzt. Darin war das Zielmolekül *Bio-mail483bp* in Anteilen von 100, 10, 1, 0,1 oder (nur bei den *Bio-adh70bp*-Mischungen) 0,01 % enthalten. Der Versuch wurde insgesamt dreimal an verschiedenen Tagen durchgeführt.

In Abbildung 3-23 sind die ΔC_T -Werte für die verschiedenen *Bio-mail483bp*-Konzentrationen dargestellt. Sie wurden durch Subtraktion der jeweiligen gemessenen C_T -Werte vom C_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle (NHC) errechnet, die 100 % (2 nM) des jeweiligen nicht-komplementären Amplikons enthielt. Die Ergebnisse stammen jeweils aus drei separaten Versuchen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden.

Gemischt mit dem PCR-Fragment *Bio-adh70bp* wurde das *Bio-mail483bp*-Amplikon mit größeren ΔC_T -Werten detektiert als in den Mischungen mit dem *Bio-adh512bp*-Fragment. Bei den *Bio-adh70bp*-Mischungen lagen die mittleren ΔC_T -Werte im Bereich von $9,63 \pm 0,15$ für die 100 %- und $0,17 \pm 0,11$ für die 0,01 %-Konzentration. Gemischt mit dem *Bio-adh512bp*-Fragment ergaben sich mittlere ΔC_T -Werte im Bereich von $7,80 \pm 0,10$ für die 100 %- und $0,63 \pm 0,02$ für die 0,1 %-Konzentration.

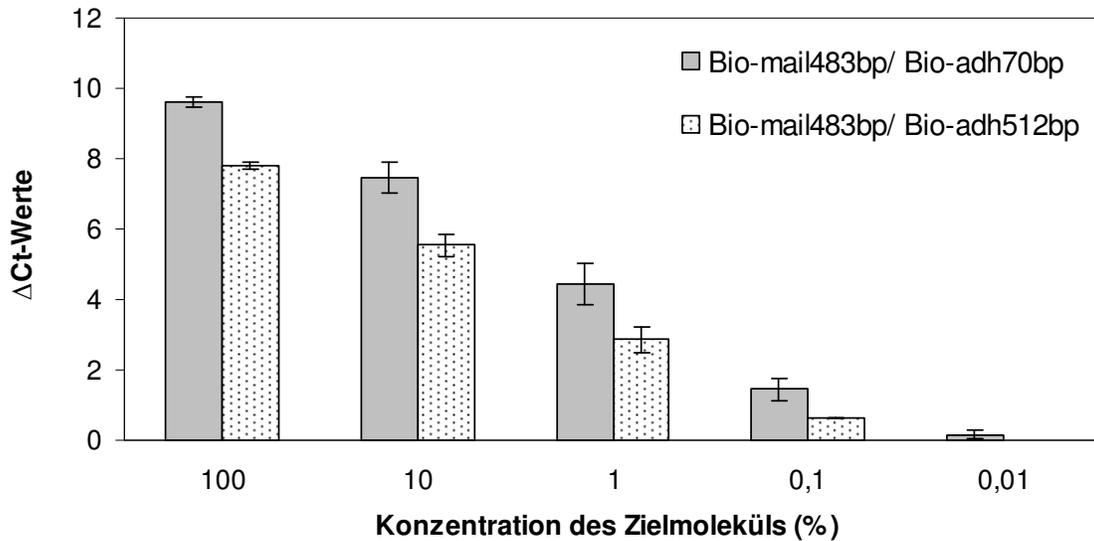


Abbildung 3-23 Detektion des PCR-amplifizierten Zielmoleküls *Bio-mail483bp* in Mischungen mit den PCR-Amplifikaten *Bio-adh70bp* und *Bio-adh512bp* mittels RT-iPCR. In einer Gesamtkonzentration von 2 nM biotinylierter DNA-Moleküle war das Zielmolekül *Bio-mail483bp* in Konzentrationen von 100, 10, 1, 0,1 oder 0,01 % enthalten und wurde mit der Fangsonde *Dig-mailPNA* nachgewiesen. Die ΔC_T -Werte wurden für jede Mischung errechnet, indem der mittlere gemessene C_T -Wert vom C_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle (100 % nicht-komplementäres PCR-Amplikon) subtrahiert wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SD aus 3 separaten Versuchen.

Für die Bestimmung der LOD wurden zunächst die C_T -Werte der verschiedenen Zielmolekül-Konzentrationen und der negativen Hybridisierungskontrollen von der maximalen Anzahl von 30 Real-Time PCR-Zyklen subtrahiert. Die resultierenden ΔC_T -Werte wurden in Abhängigkeit von der *Bio-mail483bp*-Konzentration als Standardkurve aufgetragen (Abbildung 3-24). Anschließend wurde die Nachweisgrenze durch eine *cut-off*-Linie bestimmt, basierend auf dem mittleren ΔC_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle aus den drei separaten Versuchen, zu dem das Dreifache der Standardabweichung addiert wurde.

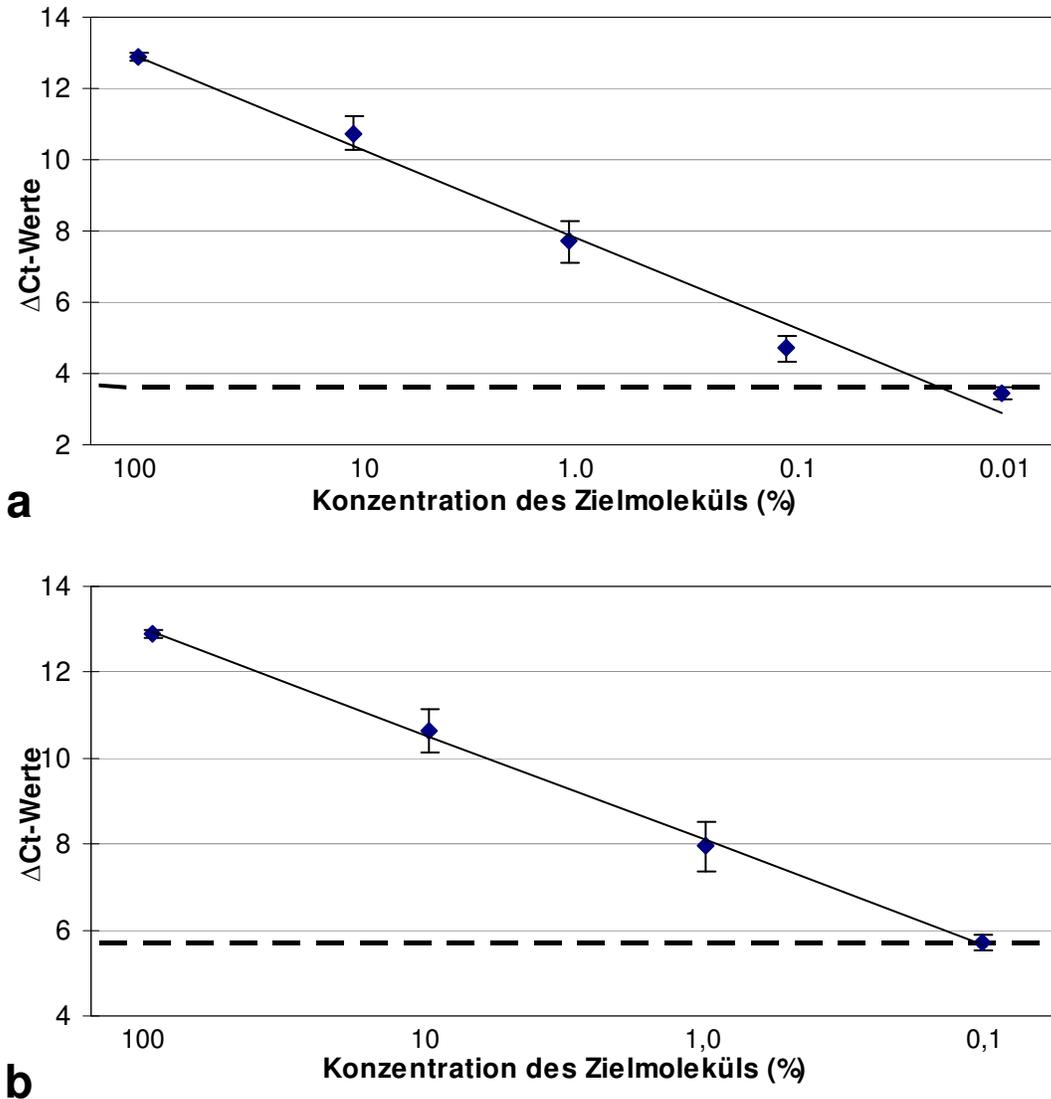


Abbildung 3-24 Detektion von PCR-amplifizierter Proben-DNA. Das PCR-Fragment *Bio-mail483bp* war in Anteilen von 100, 10, 1,0, 0,1 oder 0,01 % in Mischungen mit den PCR-Amplifikaten *Bio-adh70bp* (**a**) bzw. in Anteilen von 100, 10, 1,0, oder 0,1 in Mischungen mit *Bio-adh512bp* (**b**) enthalten und wurde mit der Fangsonde *Dig-mailPNA* detektiert. Nach Subtraktion der in der RT-iPCR gemessenen C_T -Werte von der maximalen Anzahl von 30 PCR-Zyklen wurde eine Standardkurve der resultierenden ΔC_T -Werte in Abhängigkeit von der Konzentration an Ziel-DNA erstellt (logarithmische Skalierung der X-Achsen). Die gestrichelte Linie repräsentiert den *cut-off* für die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) für das *Bio-mail483bp*-Amplikon. Der *cut-off* ist als der mittlere ΔC_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle + 3 SD aus 3 separaten Versuchen definiert.

Das *Bio-mail483bp*-Molekül konnte in der RT-iPCR bis zu einer Konzentration von 0,1 % nachgewiesen werden, wenn es mit dem *Bio-adh70bp*-Amplikon gemischt wurde. Dies entspricht der Detektion von 60 amol des *Bio-mail483bp*-Moleküls pro Mikrotiterkavität. Wenn das Zielmolekül mit

dem *Bio-adh512bp*-Amplikon gemischt wurde, konnte es lediglich bis zu einem Gehalt von 1 % nachgewiesen werden.

Eine denkbare Ursache für diese geringere Sensitivität ist ein mögliches Auftreten sterischer Hindernisse durch das größere *Bio-adh512bp*-Amplikon, die die Hybridisierung des *Bio-mail483bp*-Moleküls hemmen. Tatsächlich war aber der Sensitivitäts-Unterschied nicht durch ein stärkeres Hybridisierungssignal des *Bio-mail483bp*-Amplikons in den Mischungen mit dem *Bio-adh512bp*-Amplikon bedingt, sondern durch ein höheres Hintergrundsignal der Negativkontrolle, d.h. der 100 % *Bio-adh512bp*-Konzentration, die für die Berechnung des *cut-offs* herangezogen wurde. An den in Tabelle 3-28 zusammengestellten C_T -Werten wird deutlich, dass die Hybridisierungssignale für die 100 bis 1 %-Konzentrationen des *Bio-mail483bp*-Moleküls in den Mischungen mit beiden Negativkontrollen nahezu identisch waren. Lediglich das NHC-Signal (100 % nicht zur Fangsonde komplementäres PCR-Fragment) war bei dem *Bio-adh512bp*-Amplikon mit einem mittleren C_T -Wert von $24,91 \pm 0,21$ stärker als bei dem *Bio-adh70bp*-Amplikon (Mittlerer C_T -Wert $26,74 \pm 0,11$). Infolge dessen war der *cut-off*-Wert in den Mischungen mit der *Bio-adh512bp*-Kontrolle größer und dadurch die Nachweisgrenze des *Bio-mail483bp*-Moleküls geringer.

Eine mögliche Ursache für den höheren Hintergrund könnte in der Größe des *Bio-adh512bp*-Amplikons vermutet werden: Da es etwa um den Faktor 7 länger ist als das *Bio-adh70bp*-Fragment, war bei einer identischen molaren Konzentration der beiden Moleküle die absolute Menge (Masse) an Hintergrund-DNA beim Einsatz des *Bio-adh512bp*-Amplikons deutlich größer. Dies sollte jedoch keinen Einfluss auf die Höhe des Hintergrund-Signals haben, da durch die Bis-Biotinylierung der Moleküle die absolute Menge von Biotin-Molekülen in der Hybridisierungsreaktion bei gleicher molarer Konzentration der Amplifikate gleich war. Die Ergebnisse deuten daher eher darauf hin, dass es – wahrscheinlich Sequenz-bedingt – bei dem *Bio-adh512bp*-Amplikon zu vermehrten Fehl-Hybridisierungen mit der *Dig-mailPNA*-Fangsonde kam.

Lineare Regressionskoeffizienten von 0,986 für die Detektion des *Bio-mail483bp*-Fragments in Mischungen mit dem *Bio-adh70bp*-Amplikon und 0,999 für die Detektion in *Bio-adh512bp*-Mischungen weisen auf eine starke Korrelation zwischen der Konzentration des Zielmoleküls und den ΔC_T -Werten hin.

Tabelle 3-28 Mittlere C_T - und ΔC_T -Werte des *Bio-mail483bp*-Amplikons bei der Detektion in Mischungen mit den PCR-Amplifikaten *Bio-adh70bp* und *Bio-adh512bp* in der RT-iPCR.

Konz. des Zielmoleküls <i>Bio-mail483bp</i> (%)	Mittlere C_T -Werte ($n = 3$) ^b ± 1 SD		Mittlere ΔC_T -Werte ($n = 3$) ^c ± 1 SD	
	Mischungen mit		Mischungen mit	
	<i>Bio-adh70bp</i>	<i>Bio-adh512bp</i>	<i>Bio-adh70bp</i>	<i>Bio-adh512bp</i>
100	17,11 \pm 0,10	17,11 \pm 0,10	12,89 \pm 0,10	12,89 \pm 0,10
10	19,27 \pm 0,46	19,35 \pm 0,52	10,73 \pm 0,46	10,65 \pm 0,52
1	22,30 \pm 0,60	22,05 \pm 0,59	7,70 \pm 0,60	7,95 \pm 0,59
0,1	25,29 \pm 0,35	24,28 \pm 0,19	4,71 \pm 0,35	5,72 \pm 0,19
0,01	26,57 \pm 0,16		3,43 \pm 0,16	
0,0 ^a	26,74 \pm 0,11	24,91 \pm 0,21	3,26 \pm 0,11	5,09 \pm 0,21

^a 0 % des *Bio-mail483bp*-Fragments, 100 % (2 nM) der Negativkontrolle (nicht-komplementäres Amplikon);

^b Errechnet aus 3 separaten RT-iPCR-Versuchen; ^c Jeweils errechnet aus den Differenzen der maximalen Anzahl von 30 PCR-Zyklen und den mittleren C_T -Werten ($n = 6$) jedes Versuchs.

3.3.12.5 Präzision

a) Messpräzision

Bei der Detektion des *Bio-mail483bp*-Moleküls lagen die ermittelten *intra-assay*-CV-Werte im Bereich von 0,29 bis 1,27 % (Mittelwert 0,53 %) für die Mischungen mit dem *Bio-adh70bp* – Amplikon und von 0,25 bis 0,79 % (Mittelwert 0,49 %) für die Mischungen mit dem *Bio-adh512bp*-Amplikon und wiesen auf eine hohe Messpräzision hin (Tabelle 3-29 und Tabelle 3-30).

Tabelle 3-29 Messpräzision der Detektion des PCR-Amplikons *Bio-mail483bp* in Mischungen mit dem PCR-Fragment *Bio-adh70bp* in der RT-iPCR, ausgedrückt als *intra-assay*-Variationskoeffizienten.

Konzentration des Zielmoleküls (%)	<i>Intra-assay</i> -CV ^a (%)		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
100	0,44	0,49	0,77
10	0,68	0,38	0,72
1	0,78	0,31	0,67
0,1	0,49	0,29	0,36
0,01	1,27	0,31	0,49
0,0	0,29	0,39	0,39

^a Errechnet aus je 6 Replikaten.

Tabelle 3-30 Messpräzision der Detektion des PCR-Amplikons *Bio-mail483bp* in Mischungen mit dem PCR-Fragment *Bio-adh512bp* in der RT-iPCR, ausgedrückt als *intra-assay*-Variationskoeffizienten.

Konzentration des Zielmoleküls (%)	Intra-assay-CV ^{a)} (%)		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
100	0,44	0,49	0,77
10	0,44	0,48	0,65
1	0,79	0,32	0,31
0,1	0,56	0,30	0,59
0,0	0,25	0,38	0,54

^a Errechnet aus je 6 Replikaten.

b) Wiederholpräzision

Eine ebenfalls hohe Wiederholpräzision spiegelte sich in den *inter-assay*-CV-Werten wider (Tabelle 3-31 und Tabelle 3-32). Der *inter-assay*-CV der gemessenen C_T-Werte in den drei Versuchen reichte von 0,42 bis 2,68 % (Mischung mit *Bio-adh70bp*, Mittelwert 1,35 %) bzw. von 0,60 bis 2,67 % (Mischung mit *Bio-adh512bp*, Mittelwert 1,51 %). Bezogen auf die ΔC_T-Werte lagen die *inter-assay*-CV-Werte bei den *Bio-mail483bp/Bio-adh70bp*-Mischungen innerhalb der Nachweisgrenzen zwischen 1,58 % für die 100 % Konzentration und 23,06 % für die 0,1 %-Konzentration (Mittelwert 11 %). Die *inter-assay*-CV-Werte der *Bio-mail483bp/Bio-adh512bp*-Mischungen lagen zwischen 1,32 und 13,29 % (Mittelwert 5,75 %).

Tabelle 3-31 Wiederholpräzision der Detektion des PCR-Amplikons *Bio-mail483bp* in Mischungen mit dem PCR-Fragment *Bio-adh70bp* in der RT-iPCR, ausgedrückt als *inter-assay*-Variationskoeffizienten.

Konzentration des Zielmoleküls (%)	Inter-assay-CV ^{a)} (%)	
	der C _T -Werte	der ΔC _T -Werte
100	0,60	1,58
10	2,40	5,96
1	2,68	13,40
0,1	1,40	23,06
0,01	0,58	67,65
0,0	0,42	

^a Errechnet aus je in 3 separaten RT-iPCR-Versuchen gemessenen mittleren C_T- ($n = 6$) bzw. ΔC_T-Werten.

Tabelle 3-32 Wiederholpräzision der Detektion des PCR-Amplikons *Bio-mail483bp* in Mischungen mit dem PCR-Fragment *Bio-adh512bp* in der RT-iPCR, ausgedrückt als *inter-assay-Variationskoeffizienten*

Konzentration des Zielmoleküls (%)	<i>Inter-assay-CV^{a)}</i> (%)	
	der C_T -Werte	der ΔC_T -Werte
100	0,60	1,32
10	2,67	5,65
1	2,65	13,29
0,1	0,78	2,76
0,0	0,83	

^a Errechnet aus je in 3 separaten RT-iPCR-Versuchen gemessenen mittleren C_T - ($n = 6$) bzw. ΔC_T -Werten.

3.3.13 Detektion in genomischer Hintergrund-DNA

Für den direkten Nachweis genomischer Zielsequenzen durch Hybridisierung ohne eine vorherige Amplifikation werden bei komplexen Genomen wie dem Mais-Genom große DNA-Mengen benötigt. Erst bei einem Einsatz genomischer Proben-DNA im Mikrogramm-Bereich sind Sequenzen, die als Einzelkopie im Genom vorkommen, in ausreichender Anzahl in der Reaktion vorhanden. Für diese Arbeit galt es daher zu prüfen, bis zu welcher Menge genomische DNA als Hintergrund in der RT-iPCR eingesetzt werden kann, ohne dass es zu Störungen der Detektion kommt. Um den genomischen DNA-Hintergrund echten Probenmaterials zu simulieren, wurden Zielmoleküle mit biotinylierter boviner gDNA gemischt und in der RT-iPCR nachgewiesen. Im Folgenden werden beispielhaft drei repräsentative Versuche beschrieben. Zunächst wurde ein synthetisches Oligonukleotid als Zielmolekül eingesetzt, abschließend wurde ein PCR-amplifiziertes Fragment aus echter Proben-DNA im DNA-Hintergrund nachgewiesen.

3.3.13.1 Synthetisches Oligonukleotid in Klenow-biotinylierter mdaDNA

Verschiedene Mengen des synthetischen Oligonukleotids *Bio-adh30mer* im Bereich von 60 fmol bis 600 zmol (Konzentrationen von 2 nM bis 20 fM) wurden mit je 1,6 µg biotinylierter mdaDNA (Bio-mdaDNA) gemischt und in der RT-iPCR detektiert. Die Biotinylierung der mdaDNA wurde mithilfe des Klenow-Enzyms vorgenommen. Als Positivkontrolle wurde das *Bio-adh30mer* in einer 200 pM Konzentration ohne die Anwesenheit von Hintergrund-DNA mit den Sonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* hybridisiert; der resultierende ΔC_T -Wert $\pm 1 SD_{Diff}$ lag mit $11,80 \pm 0,33$ im zu erwartenden Bereich. Als negative Hybridisierungskontrolle dienten 1,6 µg Bio-mdaDNA.

Die für die verschiedenen Zielmolekül-Mengen und die negative Hybridisierungskontrolle gemessenen mittleren C_T -Werte ($n = 4$) wurden von der maximalen Anzahl von 30 Real-Time PCR-

Zyklen subtrahiert. Die resultierenden ΔC_T -Werte wurden in Abhängigkeit von der enthaltenen *Bio-adh30mer*-Menge als Standardkurve aufgetragen (Abbildung 3-25). Anschließend wurde die Nachweisgrenze durch eine *cut-off*-Linie bestimmt, basierend auf dem mittleren ΔC_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle zuzüglich dessen dreifacher Standardabweichung.

Das Hybridisierungssignal des *Bio-adh30mer*-Moleküls konnte bis zu einer Menge von 60 amol vom Hintergrundsignal unterschieden werden. Da 60 amol des *Bio-mail30mer*-Moleküls eine Masse von etwa 550 pg aufweisen, entspricht der Gehalt von 60 amol des Moleküls in 1,6 μ g Gesamt-DNA einem Anteil von 0,03 %. Die Messpräzision war mit Variationskoeffizienten von 0,34 bis 1,74 % hoch. Die Linearität im Bereich oberhalb der Nachweisgrenze wurde durch einen linearen Regressionskoeffizienten von 0,891 charakterisiert, der auf eine schwächere Korrelation zwischen der Konzentration des Zielmoleküls und den ΔC_T -Werten im Vergleich zu vorherigen Versuchen (ohne mdaDNA-Hintergrund) hinweist.

Insgesamt waren die Differenzen zwischen Hybridisierungs- und Hintergrundsignalen gering. Wurden ΔC_T -Werte durch Subtraktion der mittleren C_T -Werte ($n = 4$) für die verschiedenen *Bio-adh30mer*-Mengen vom mittleren C_T -Wert ($n = 4$) der negativen Hybridisierungskontrolle errechnet, ergaben sich mittlere ΔC_T -Werte $\pm 1 SD_{\text{Diff}}$ im Bereich von nur $3,11 \pm 0,15$ für 60 fmol und $0,24 \pm 0,15$ für 600 zmol des *Bio-adh30mers*. Die geringen Differenzen waren durch niedrige C_T -Werte der negativen Hybridisierungskontrolle bedingt: Die Anwesenheit von 1,6 μ g Bio-mdadNA (negative Hybridisierungskontrolle) ergab einen mittleren C_T -Wert ($n = 4$) $\pm 1 SD$ von $18,71 \pm 0,18$ in der RT-iPCR. In vorherigen Versuchen ohne den Einsatz genomischer Hintergrund-DNA lagen die positiven Hybridisierungssignale in etwa diesem C_T -Wert-Bereich, während die negativen Hybridisierungskontrollen im C_T -Bereich über 26 lagen. Beispielsweise ergab der Einsatz von 2 nM des *Bio-adh70bp*-Fragments, hybridisiert mit der nicht-komplementären Sonde *Dig-mailPNA*, einen mittleren C_T -Wert ($n = 3$ in separaten Versuchen) von $26,74 \pm 0,11$. Die in dem Fall eingesetzte Konzentration von 2 nM als Hintergrund-DNA entspricht einer eingesetzten Menge des *Bio-adh70bp*-Amplikons von 60 fmol und damit einer Masse von 3 ng. Die eingesetzte Menge biotinylierter mdaDNA als Hintergrund-DNA überstieg also die davor verwendeten Mengen der negativen Hybridisierungskontrollen um ein Vielfaches.

Die trotzdem relativ niedrige Nachweisgrenze des *Bio-adh30mers* von 60 amol war nur durch die geringen *intra-assay*-Abweichungen der Messwerte möglich. Beispielsweise wies der mittlere C_T -Wert der 4 Replikate der Negativkontrolle (1,6 μ g Bio-mdadNA) eine Messabweichung von 0,34 % bzw. eine absolute SD von 0,06 Ct-Werten auf. Bei wesentlich höheren Werten, beispielsweise einer theoretischen absoluten SD der C_T -Werte von 0,5 (CV = 2,65 %), hätte die Detektion eine um 3 Größenordnungen höhere LOD aufgewiesen: Nicht einmal die 6 nmol-Konzentration des *Bio-adh30mers* hätte dann noch vom Hintergrund diskriminiert werden können. Dieses Beispiel

soll noch einmal auf die Bedeutung der Messpräzision für die Sensitivität der Nachweismethode hinweisen.

Die *intra-assay*-CV-Werte der C_T -Werte aller *Bio-adh30mer*-Mischungen oberhalb der Nachweisgrenze lagen zwischen 0,35 und 0,89 % (Mittelwert 0,71 %).

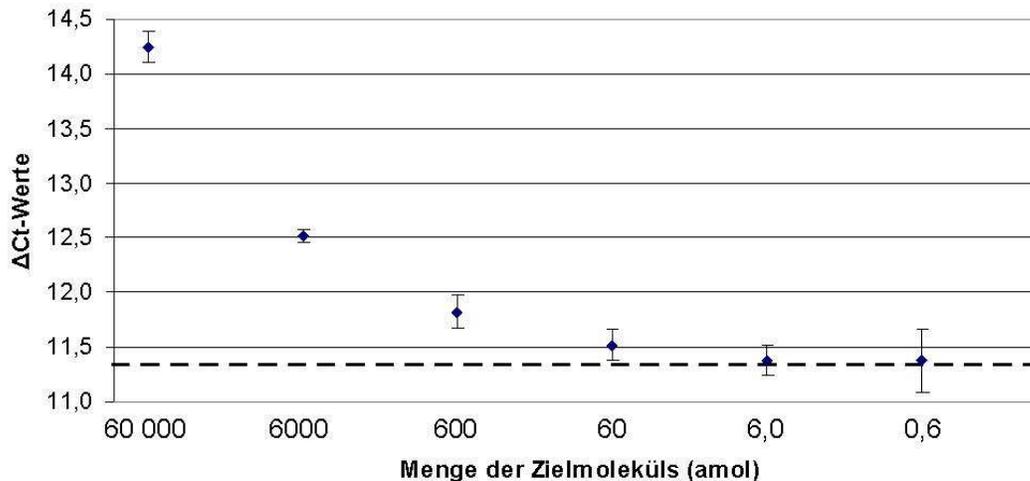


Abbildung 3-25 Detektion des synthetischen Oligonukleotids *Bio-adh30mer* in Mischungen mit Klenow-biotinylierter *mdaDNA* in der RT-iPCR. Es wurden 60 fmol bis 600 zmol des Zielmoleküls *Bio-adh30mer* mit je 1,6 μg *Bio-mdadNA* gemischt und mit der Fangsonde *Dig-adhPNA* nachgewiesen. Nach Subtraktion der in der RT-iPCR gemessenen C_T -Werte von der maximalen Anzahl von 30 PCR-Zyklen wurde eine Standardkurve der resultierenden ΔC_T -Werte in Abhängigkeit von der Konzentration an Ziel-DNA erstellt (logarithmische Skalierung der X-Achse). Die gestrichelte Linie repräsentiert den *cut-off* für die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) für das *Bio-adh30mer*. Der *cut-off* ist als mittlerer ΔC_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle + 3 SD definiert. Die Fehlerbalken der Datenpunkte repräsentieren ± 1 SD aus 4 Replikaten.

3.3.13.2 Synthetisches Oligonukleotid in TdT-biotinylierter gDNA

Für die Herstellung der genomischen Hintergrund-DNA wurde eine zur Klenow-Markierung alternative Markierungsstrategie getestet. Das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) katalysiert die Anbindung von Desoxynucleotiden aus dNTPs an das 3'-Ende von DNA unter Abspaltung anorganischen Phosphats (Kato *et al.* 1967). Gegenüber Inkorporations-basierten Methoden wie der Klenow-Markierung hat diese Methode den Vorteil, eine vorhersagbare und gleichmäßigere Anzahl von gebundenen Biotinmolekülen pro DNA-Fragment zu gewährleisten. Die Markierung genomischer DNA mit TdT hat sich in direkten Hybridisierungsexperimenten im Microarray-Format den herkömmlichen Methoden gegenüber als überlegen erwiesen (persönliche Mitteilung von Arne Holst-Jensen, Veterinary Institute, Oslo/Norwegen).

In der RT-iPCR wurden je Reaktionsansatz 330 ng TdT-biotinylierte gDNA eingesetzt. Darin enthalten waren 60 fmol (2 nM) bis 60 amol (2 pM) des Zielmoleküls *Bio-mail48mer*. Die für die

verschiedenen Zielmolekül-Mengen und die negative Hybridisierungskontrolle (330 ng Bio-gDNA) gemessenen mittleren C_T -Werte ($n = 4$) wurden jeweils von der maximalen Anzahl von 30 Real-Time PCR-Zyklen subtrahiert. Die resultierenden ΔC_T -Werte wurden gegen die in den Mischungen enthaltene *Bio-adh30mer*-Menge als Standardkurve aufgetragen (Abbildung 3-26). Anschließend wurde die Nachweisgrenze durch eine *cut-off*-Linie bestimmt, basierend auf dem mittleren ΔC_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle zuzüglich dessen dreifacher Standardabweichung.

Nur 60 und 6 fmol des *Bio-mail48mers* konnten vom Hintergrund der Bio-gDNA unterschieden werden. Wie schon bei der Detektion des *Bio-adh30mer*-Oligonukleotids in Klenow-biotinylierter Hintergrund-DNA beobachtet wurde, waren auch hier die ΔC_T -Werte $\pm 1 SD_{\text{Diff}}$ zwischen den Hybridisierungssignalen und dem Signal der negativen Hybridisierungskontrolle sehr gering ($2,99 \pm 0,05$ für 60 fmol, $1,56 \pm 0,13$ für 6 fmol des *Bio-mail48mers*). Mit einem mittleren C_T -Wert von $19,85 \pm 0,05$ war das Hintergrund-Signal der TdT-markierten Bio-gDNA nicht wesentlich schwächer als bei der Klenow-markierten Bio-mdaDNA (18,71). Der Unterschied von 1,2 C_T -Werten ist dadurch zu erklären, dass von der TdT-markierten DNA nur ein Fünftel der zuvor eingesetzten Menge Klenow-biotinylierter DNA eingesetzt wurde. Die TdT-Markierung der Hintergrund-DNA führte also tendenziell zu einer Verschlechterung der Sensitivität in der RT-iPCR.

Der lineare Regressionskoeffizient für die Datenpunkte der 60 und 6 fmol-Mengen (innerhalb der Nachweisgrenze) und die 600 amol-Menge (zusätzlicher Wert für die Berechnung, da aus 2 Werten nicht möglich) hatte einen Wert von 0,999. Die Einbeziehung aller Datenpunkte ergab einen Regressionskoeffizienten von 0,896.

Die Positivkontrolle, eine 200 pM Konzentration des *Bio-mail48mers* auf den Sonden *Dig-adhPNA* und *Dig-mailPNA* ohne die Zugabe von Bio-gDNA, ergab einen ΔC_T -Wert $\pm 1 SD_{\text{Diff}}$ von $9,85 \pm 0,08$ und belegte die grundsätzlich erfolgreiche Durchführung der RT-iPCR.

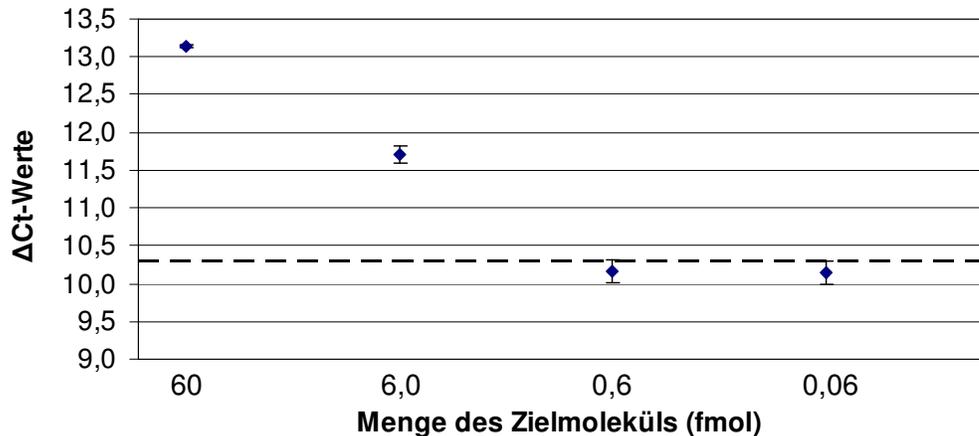


Abbildung 3-26 Detektion des synthetischen Oligonukleotids *Bio-mail48mer* in Mischungen mit TdT-biotinylierter gDNA in der RT-iPCR. Es wurden 60 fmol bis 60 amol des Zielmoleküls *Bio-mail48mer* mit je 330 ng Bio-gDNA gemischt und mit der Fangsonde *Dig-mailPNA* nachgewiesen. Nach Subtraktion der in der RT-iPCR gemessenen C_T -Werte von der maximalen Anzahl von 30 PCR-Zyklen wurde eine Standardkurve der resultierenden ΔC_T -Werte in Abhängigkeit von der Konzentration an Ziel-DNA erstellt (logarithmische Skalierung der X-Achse). Die gestrichelte Linie repräsentiert den *cut-off* für die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) für das *Bio-mail48mer*. Der *cut-off* ist als mittlerer ΔC_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle +3 SD definiert. Die Fehlerbalken der Datenpunkte repräsentieren ± 1 SD aus 4 Replikaten.

3.3.13.3 PCR-Amplikon in Klenow-biotinylierter mdaDNA

Das PCR-Amplikon *Bio-mail483bp* wurde mit verschiedenen Mengen Klenow-biotinylierter gDNA gemischt und in der RT-iPCR detektiert. Die absolute Menge des *Bio-mail483bp*-Fragments in den Mischungen war mit einer 200 pM Konzentration (6 fmol pro Hybridisierungsreaktion) konstant. Zusätzlich waren in den Reaktionen 0, 0,6, 6,0, 60 oder 600 ng biotinylierte mdaDNA vorhanden. Unter Berücksichtigung der Fragmentlänge der Zielsequenz von 483 Basen und ausgehend von einem durchschnittlichen Basengewicht von $5,5E-22$ g (Stephenson 2005) wurde errechnet, mit welchem prozentualen Anteil die Zielsequenz in jeder Reaktion vorhanden war. Wurde das doppelsträngige Fragment *Bio-mail483bp* mit 0,6 ng mdaDNA gemischt, entsprach der Anteil der zur Fangsonde *Dig-mailPNA* komplementären Sequenz etwa 40 % der Gesamt-DNA. Gemischt mit 6,0/ 60 bzw. 600 ng mdaDNA betrug der Anteil der Zielsequenz etwa 10/ 1,0 bzw. 0,1 %. Als Negativkontrollen wurden vergleichbare Mischungen der biotinylierten mdaDNA mit jeweils 6 fmol des nicht zur *Dig-mailPNA* komplementären PCR-Fragments *Bio-adh70bp* hergestellt. Alle Mischungen wurden in der RT-iPCR mit der Fangsonde *Dig-mailPNA* hybridisiert.

Die in der RT-iPCR gemessenen C_T -Werte für die verschiedenen Konzentrationen des *Bio-mail483bp*-Fragments wurden von den korrespondierenden C_T -Werten der *Bio-adh70bp*-Mischungen subtrahiert, um die in Abbildung 3-27 dargestellten ΔC_T -Werte zu errechnen. Die RT-iPCR-Signale für 6 fmol des *Bio-mail483bp*-Amplikons waren mit zunehmender Menge Hinter-

grund-DNA nur bis zu einem Anteil von 10 % von den Signalen der Negativkontrolle zu unterscheiden. Bereits ab einem Gehalt von 60 ng biotinylierter mdaDNA wurden die Hybridisierungssignale der zu 1 % enthaltenen *Bio-mail483bp*-Sequenz vom Hintergrund überlagert. Die Messpräzision war mit Variationskoeffizienten der C_T -Werte von 0,33 bis 0,73 % hoch.

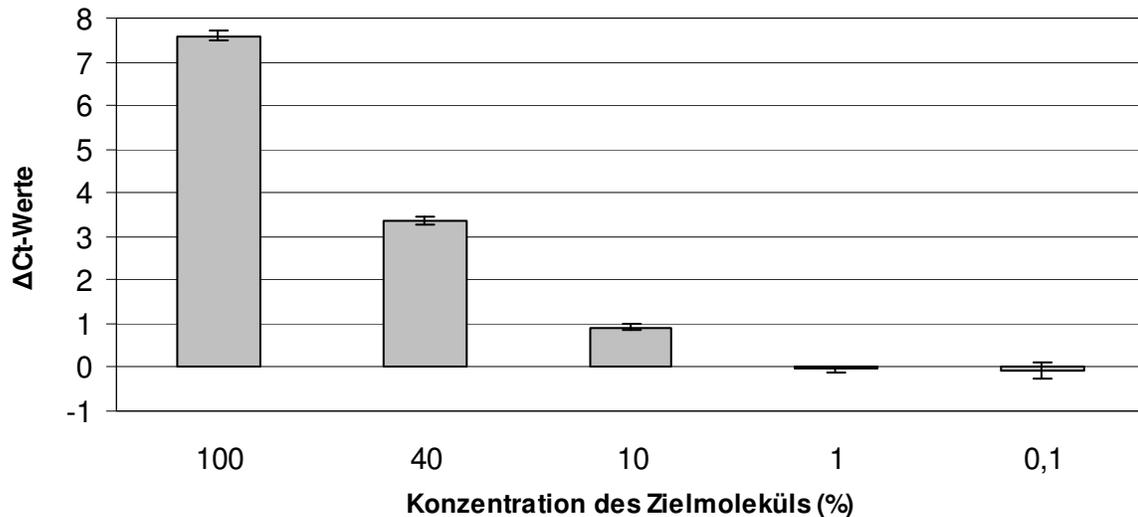


Abbildung 3-27 Detektion des PCR-amplifizierten Zielmoleküls *Bio-mail483bp* in Mischungen mit Klenow-biotinylierter mdaDNA. Die Mischungen enthielten 0, 0,6, 6, 60 oder 600 ng biotinylierter mdaDNA sowie eine konstante Menge von 6 fmol des Zielmoleküls *Bio-mail483bp*, das dadurch mit einem Anteil von 100, 40, 10, 1, oder 0,1 % in der RT-iPCR eingesetzt und mit der Fangsonde *Dig-mailPNA* detektiert wurde. Die ΔC_T -Werte wurden für jede Mischung errechnet, indem der mittlere gemessene C_T -Wert vom C_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle (6 fmol des nicht-komplementären PCR-Amplikons *Bio-adh70bp* gemischt mit den entsprechenden Mengen mdaDNA) subtrahiert wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren $\pm 1 SD_{Diff}$.

Die 100 %-Konzentration diente als Positiv-Kontrolle, deren ΔC_T -Wert auf der Differenz aus den mittleren C_T -Werten für je 6 fmol des *Bio-adh70bp* und des *Bio-mail483bp*-Amplikons ohne die Anwesenheit von Hintergrund-DNA basierte. Der für diese Kontrolle errechnete ΔC_T -Wert $\pm 1 SD_{Diff}$ betrug $7,60 \pm 0,13$. Als weitere positive Hybridisierungskontrolle diente der Vergleich der Hybridisierungen der Amplifikate *Bio-mail483bp* und *Bio-adh70bp* (je 200 pM) mit der Sonde *Dig-adhPNA* im Vergleich zu *Dig-mailPNA* ohne die Anwesenheit von Hintergrund-DNA. Für diese Kontrollen wurden ΔC_T -Werte $\pm 1 SD_{Diff}$ von $8,89 \pm 0,34$ für das *Bio-mail483bp*-Fragment und $6,08 \pm 0,08$ für das *Bio-adh70bp*-Fragment errechnet. Die ΔC_T -Werte aller Kontrollen entsprachen den in vorherigen Versuchen für diese Zielmoleküle beobachteten Ergebnissen und belegten die grundsätzlich erfolgreiche Durchführung der RT-iPCR. Außerdem zeigten sie, dass der das Detektionssignal überlagernde Hintergrund nicht durch das in den Negativkontrollen vorhandene *Bio-adh70bp*-Fragment, sondern durch die Bio-mdadNA verursacht wurde.

Ergebnisse und Diskussion

An den in Tabelle 3-33 zusammengestellten C_T -Werten lässt sich ablesen, dass ab einer Menge von 60 ng gDNA das Hybridisierungssignal der Zielsequenz mit einem mittleren C_T -Wert von etwa 18 bereits vom Hintergrund überlagert wurde. Das durch die Bio-mdaDNA verursachte Hintergrund-Signal war damit stärker als zuvor bei Mischungen von Zielmolekülen mit vergleichbaren Mengen Oligonukleotiden oder PCR-Fragmenten gemessen. Zum Vergleich entspricht eine 2 nM Konzentration, wie sie in vorherigen Versuchen als Negativkontrolle/Hintergrund verwendet wurde, einer Menge von 600 fmol PCR-Fragmenten pro Reaktion. Die Masse von 600 fmol eines 70 bp-PCR-Fragments beträgt etwa 30 ng, liegt also im gleichen Größenbereich. Trotzdem konnten 6 fmol (200 pM) des *Bio-mail483bp*-Fragments mit einem ΔC_T -Wert $\pm 1 SD_{Diff}$ von $7,47 \pm 0,48$ nachgewiesen werden, wenn sie in 30 ng des *Bio-adh70bp*-Amplikons enthalten waren (Tabelle 3-28). In Mischungen mit dem größeren *Bio-adh512bp*-Amplikon wurden 6 fmol des *Bio-mail483bp*-Fragments mit einem ΔC_T -Wert $\pm 1 SD_{Diff}$ von $5,55 \pm 0,56$ sogar in 200 ng Gesamt-DNA nachgewiesen.

Tabelle 3-33 C_T - und ΔC_T -Werte bei der Detektion des PCR-Amplikons *Bio-mail483bp* in Mischungen mit Klenow-biotinylierter mdaDNA.

Menge biotinylierter mdaDNA (ng)	Absolute Konz. des PCR- Amplikons ^{a)} (pM)	Relative Konz. des PCR- Amplikons ^{a)} (%)	Mittlere C_T -Werte ($n = 4$) $\pm 1 SD$		ΔC_T -Werte ± 1 SD_{Diff}
			<i>Bio-mail483bp</i>	<i>Bio-adh70bp</i> ^{b)}	
0,0		100	$18,81 \pm 0,10$	$26,41 \pm 0,08$	$7,60 \pm 0,13$
0,6		40	$18,96 \pm 0,09$	$22,33 \pm 0,02$	$3,37 \pm 0,09$
6	200	10	$18,17 \pm 0,06$	$19,08 \pm 0,01$	$0,91 \pm 0,06$
60		1	$16,32 \pm 0,06$	$16,29 \pm 0,05$	$-0,04 \pm 0,08$
600		0,1	$16,14 \pm 0,12$	$16,08 \pm 0,14$	$-0,06 \pm 0,19$

^a *Bio-mail483bp* oder *Bio-adh70bp*; ^b Negativkontrolle

Der starke Hintergrund, der durch den Einsatz von Klenow-biotinylierter mdaDNA hervorgerufen wurde, könnte mit einem höheren Biotinylierungsgrad der mdaDNA zusammenhängen. Laut Hersteller des Markierungs-Kits resultiert die Biotinylierungsreaktion jedoch nur in einer Dichte von etwa einem Biotin-Molekül in 20 - 25 Basen (Roche Applied Science 2009). Die Kontrolle der Biotinylierung (siehe Abschnitt 3.3.7.2) bestätigte eine etwa in diesem Größenbereich liegende Markierungsdichte. Die Biotinylierungsdichte der Klenow-markierten DNA war also nicht höher als die der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide und nur geringfügig höher als die der mittels PCR hergestellten, bis-biotinylierten Zielmoleküle. Es konnte daher nicht abschließend geklärt werden, was die Ursache für die hohen Hintergrundsignale beim Einsatz von Bio-mdaDNA als Hintergrund-DNA war.

3.3.14 Direkte Detektion GVO-spezifischer Sequenzen in genomischer Pflanzen-DNA

Die ausgewählte Methodik dieser Arbeit (siehe Abschnitt 3.3.1.2) beinhaltet den Plan, die RT-iPCR im Falle einer ausreichenden Sensitivität entsprechend der schematischen Darstellung in Abbildung 3-6 für die direkte GVO-Detektion in echter, mit der MDA amplifizierter Proben-DNA einzusetzen. Entsprechende Versuche wurden nicht durchgeführt, da in Abschnitt 3.3.13 gezeigt wurde, dass die Sensitivität der RT-iPCR für eine direkte Detektion von Einzelkopie-Sequenzen in pflanzlicher genomischer DNA nicht ausreichte.

3.3.15 Gesamtbeurteilung der RT-iPCR für die DNA-Detektion

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Nachweismethode basiert auf einer Kombination aus Sequenz-spezifischer Hybridisierung, immunologischer Detektion und einer Signal-Amplifikation nach dem Prinzip der iPCR. Mit der vorgestellten Methode konnten DNA-Zielmoleküle Sequenz-spezifisch und selektiv detektiert werden. Diese Arbeit belegt nach dem Wissen der Autorin erstmals den Nachweis von DNA mittels des bisher für die Protein-Detektion verwendeten RT-iPCR-Prinzips.

Die für die DNA-Detektion modifizierte RT-iPCR erfüllt viele der vorab an die zu entwickelnde Methode gestellten Anforderungen (siehe Abschnitt 3.1.1). Im Folgenden werden die Möglichkeiten und Grenzen der Methode beurteilt.

3.3.15.1 Allgemeine Anforderungen

Die RT-iPCR ermöglicht den parallelen Nachweis mehrerer GVO-Zielsequenzen im Mikrotiter-Format. Es müssen keine individuellen Reaktionsansätze vorbereitet werden, da für alle Reaktionen der gleiche Real-Time PCR-*Mastermix* eingesetzt werden kann.

Die in dieser Arbeit verwendete Methodik basiert auf der parallelen DNA-Detektion nach dem Prinzip „getrennte Detektion – uniforme Visualisierung durch Signalverstärkung“ und bietet damit einige Vorteile gegenüber DNA-Nachweismethoden, die auf dem Multiplex-Prinzip basieren. Bei Multiplex-Methoden werden mehrere Zielsequenzen in demselben Reaktionsgefäß detektiert, wie z.B. bei der Multiplex-PCR oder ähnlichen Methoden der Zielsequenz-Amplifikation. Bei diesen „One Tube“-Multiplex-Methoden tritt in der Regel das Problem eines kompetitiven Verbrauchs der Reaktionskomponenten auf: Beispielsweise detektiert eine gegebene Multiplex-PCR eine bestimmte GVO-Zielsequenz in Anwesenheit von unspezifischer Hintergrund-DNA mit einer Nachweisgrenze von 0,1 % GVO-Gehalt. Wenn in der Hintergrund-DNA jedoch gleichzeitig andere Zielsequenzen vorhanden sind, kommt es zur Konkurrenz der PCR-Systeme um die Reaktionskomponenten, und die Nachweisgrenze steigt unter Umständen erheblich. Besonders aus-

geprägt ist dieser Effekt, wenn eine der Zielsequenzen in größerer Anzahl vorhanden ist als die anderen (Walsh *et al.* 1992).

Zusätzlich spricht für das Prinzip „getrennte Detektion – uniforme Visualisierung“, dass ein bestehendes Nachweissystem jederzeit durch neue Fangsonden erweitert werden kann, ohne dass beispielsweise ein zusätzliches Real-Time PCR-System aufwendig validiert werden muss. Die verwendeten 96-Well-Mikrotiterplatten könnten gegen 384-Well-Platten ersetzt werden, um den Reaktionsdurchsatz zu erhöhen. Sogar eine Adaption der Methode an ein PCR-Mikrosystem (*microscale*-PCR) oder Array-Format und eine Automatisierung wären denkbar. Da alle Reaktionsschritte der Detektion in demselben Gefäß durchgeführt werden und für die Datenauswertung keine weitere Manipulation der Reaktionen notwendig ist, wird das Risiko für Kreuz-Kontaminationen und Pipettierfehler minimiert.

Die RT-iPCR kann in jedem Labor mit einer normalen Laborausstattung durchgeführt werden. Außer einem Real-Time PCR-Cycler, der inzwischen zur Standardausrüstung eines DNA-Labors gehört, werden keine speziellen Geräte oder sonstige Ausrüstung benötigt.

Bezüglich der Anwenderfreundlichkeit der RT-iPCR besteht vor allem bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten Verbesserungsbedarf. Die Immobilisierung der PNA-Fangsonden an die Oberflächen der Mikrotitergefäße über eine immunologische Bindung (Digoxigenin/Anti-Digoxigenin) lässt keine längere Lagerung vorbereiteter Platten zu. Die beschichteten Platten können für etwa eine Woche problemlos bei 4 °C aufbewahrt werden. Längere Lagerzeiten oder Lagerung bei -20 oder -80 °C beeinträchtigen die Leistungsfähigkeit der RT-iPCR (Daten nicht gezeigt). Für eine Optimierung der Plattenbeschichtung sollte ein gänzlich anderes Immobilisierungs-Verfahren angestrebt werden, beispielsweise basierend auf einer kovalenten PNA-Bindung an entsprechend aktivierte Oberflächen.

Die Labor-externe Synthese von PNA-Oligomeren ist zurzeit mit relativ hohen Kosten verbunden, verglichen mit der Synthese von DNA-Oligomeren. Dies liegt hauptsächlich an den – wegen einer vergleichsweise noch geringen Nachfrage – hohen Preisen für PNA-Monomere. Da aber die Grundkomponenten und der Produktionsprozess für PNA-Monomere nicht wesentlich teurer sind als für DNA-Monomere, sollten sich bei steigender Nachfrage die Preise für die PNA-Synthese denen der DNA-Synthese annähern (Brandt *et al.* 2006).

Die *reporter*-DNA für diese Arbeit wurde aus einem *E. coli*-Plasmid mittels PCR hergestellt. Die gewählte Sequenz ist nicht in tierischer oder pflanzlicher DNA enthalten. Kontaminationen von Probenmaterial oder auch Versuchsreagenzien (siehe Abschnitt 3.3.5.3) mit *E. Coli*-DNA, die Signale in der Real-Time PCR verursachen können, sind aber möglich. Dies spielte für die vorliegende Arbeit keine wesentliche Rolle, da ein gewisses Maß an Hintergrundrauschen bei der RT-iPCR ohnehin unvermeidbar ist (Barletta 2006). In den meisten in der Literatur beschriebenen Arbeiten

wurden ebenfalls aus *E. coli* hergestellte *reporter*-DNA-Fragmente verwendet (z.B. Saito et al. 1999, Lind & Kubista 2005). Eine mögliche Lösung für die Bereitstellung einer *reporter*-DNA mit einer einzigartigen Sequenz wäre die Herstellung einer DNA-Chimäre, die beispielsweise aus je einer Sequenz mit einem eukaryonten und prokaryonten Ursprung besteht, wie von Gofflot *et al.* (2005) verwendet.

Die Angabe der RT-iPCR-Ergebnisse als ΔC_T -Werte macht die Daten-Auswertung von der Höhe des Hintergrundes und dem Fluoreszenz-Schwellenwert (Threshold) der Real-Time PCR unabhängig und erlaubt somit einen direkten Vergleich von Daten aus verschiedenen Versuchen und/oder verschiedenen Real-Time PCR-Geräten (Adler *et al.* 2003). Die Festlegung einer Nachweisgrenze mittels eines *cut-offs*, der als mittlerer ΔC_T -Wert der negativen Hybridisierungskontrolle plus dreimal dessen Standardabweichung definiert ist, entspricht den Vorschriften gemäß DIN 32645 (DIN 2008).

Prinzipiell ist die RT-iPCR außer für den qualitativen Nachweis auch für quantitative Analysen geeignet. Die Quantifizierung einer Zielsequenz in einer unbekannt Probe könnte analog zu dem für die Protein-Detektion verwendeten Verfahren (Adler *et al.* 2007) durchgeführt werden: Der ΔC_T -Wert einer unbekannt Probe kann durch Subtraktion des gemessenen C_T -Wertes von der maximalen Anzahl durchgeführter PCR-Zyklen errechnet werden. Für eine Quantifizierung können dann die entsprechenden ΔC_T -Werte einer im gleichen Versuch eingesetzten Standard-Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus ihres Zielsequenz-Gehaltes aufgetragen werden. Anschließend kann durch lineare Regression des ΔC_T -Wertes der unbekannt Probe gegen die logarithmische Konzentration in der Standardkurve der Gehalt der Zielsequenz quantifiziert werden.

In den durchgeführten Versuchen wurde die Linearität der RT-iPCR-Signalstärken für verschiedene Mengen DNA durch lineare Regressionskoeffizienten zwischen 0,986 und 0,999 gekennzeichnet und erfüllt damit die Voraussetzung für den Einsatz der RT-iPCR für den quantitativen DNA-Nachweis. Dies gilt für die Detektion von synthetischen und PCR-amplifizierten Zielmolekülen mit und ohne nicht-komplementäre DNA (PCR-Amplifikate) als Hintergrund-DNA. Beim Einsatz von gDNA oder mdaDNA als Hintergrund deuteten die linearen Regressionskoeffizienten zum Teil mit kleineren Werten (0,891, 0,999/0,896) auf eine schwächere Korrelation von Signalintensität und Ziel-DNA-Gehalt hin.

3.3.15.2 Sensitivität

Die Sensitivität der Detektion synthetischer Oligonukleotide im Modellversuch war mit einer Nachweisgrenze von 6 amol (200 fM) hoch. Zum Vergleich wurden bei ähnlichen, neueren Detektionssystemen, die eine direkte Hybridisierungstechnik mit Signal-Amplifikation verbinden, meist höhere LOD-Werte erzielt. Beispielsweise konnten Cai *et al.* (2002) komplementäre Oligonukleotide mit einer elektrochemischen Detektion und Signal-Amplifikation über eine Silber-vermittelte

Differential-Puls-Voltammetrie (DPV) nur bis zu einer 50 pM Konzentration nachweisen. In ihrem *Science*-Artikel beschrieben Park *et al.* (2002) die Detektion von Oligonukleotiden in einer mit der RT-iPCR vergleichbaren Größenordnung von bis zu 500 fM. Sie hatten in einem Array-System Gold-funktionalisierte DNA-Moleküle über Leitungsänderungen einer Sensor-Elektrode detektiert. In einem ebenfalls vielzitierten Artikel berichten Gao *et al.* (2004) von der ultra-sensitiven, elektrochemischen Detektion komplementärer Oligonukleotide mit PNA-Fangsonden, die auf einem Silikon-Nanodraht immobilisiert waren. Die Nachweisgrenze lag bei 10 fM. Allerdings wiesen die Autoren darauf hin, dass die Signalintensität sehr schwach und von hohem Hintergrundrauschen überlagert war. Andere auf PNA-Hybridisierung beruhende Verfahren erreichten nur deutlich höhere Nachweisgrenzen von beispielsweise 200 nM (Burgener *et al.* 2000) oder 2,5 nM (Raymond *et al.* 2005).

Nur wenige Artikel, die ein neuartiges Verfahren auf Basis von Hybridisierung mit immobilisierten Sonden und Signal-Amplifikation beschreiben, berichten von einer besseren Sensitivität im Modellversuch, als in dieser Arbeit für die RT-iPCR-Detektion synthetischer Ziel-DNA ermittelt wurde. In einigen Fällen jedoch war die Sensitivität der Methoden sogar ausreichend für die Sequenz-spezifische DNA-Detektion in komplexer genomischer DNA: Patolsky *et al.* (2001) detektierten Mutationen in humaner genomischer DNA mit einer Sensitivität von 1×10^{-14} mol/ml (1 pM). Bao *et al.* (2005) wiesen SNPs in 500 ng humaner genomischer DNA bis zu einer Kopienzahl von 150.000 (50 fM Konzentration) nach. Auch Minunni *et al.* (2004) gelang der direkte Sequenz-Nachweis in genomischer boviner DNA.

Im klassischen Southern Blot* können bis zu 0,1 pg eines Einzelkopie-Gens in 1 µg humaner gDNA nachgewiesen werden (Roche Applied Science 2009): Das entspricht dem Nachweis von etwa 600 zmol der gesuchten Sequenz. Die Sensitivität des Southern Blots bleibt damit von anderen Hybridisierungssystemen unerreicht. Allerdings kann bei einem klassischen Southern Blot nur eine einzelne Zielsequenz untersucht werden, und die Durchführung ist aufwendig und nicht für hohe Probendurchsätze geeignet.

Die Sensitivität in der RT-iPCR war beim Einsatz von PCR-Produkten als Ziel-Moleküle geringer als bei den kürzeren synthetischen Ziel-Molekülen. Eine geringere Bindungsstärke der PCR-Amplifikate an die Sonden als Ursache war angesichts der zum Teil geringen Länge der verwendeten Moleküle (50 bp, 70 bp) und der hohen Stabilität von PNA/DNA-Duplexen unwahrscheinlich. Ein Längen-unabhängiger Vergleich eines synthetisch hergestellten mit einem PCR-amplifizierten

* Auftrennung fragmentierter Proben-DNA in einem Agarose-Gel mit einem anschließenden Zielsequenz-Nachweis mittels einer Detektionssonde.

Zielmolekül wies darauf hin, dass die Abnahme der Signalintensität der Hybridisierung beim Einsatz von PCR-amplifizierten Zielmolekülen durch deren doppelsträngige Struktur bedingt war.

Die Sensitivität der RT-iPCR für die Detektion PCR-amplifizierter Proben-DNA (*Bio-mail483bp*) in Mischungen mit einem nicht-komplementären PCR-Amplikon war um etwa eine Größenordnung geringer als beim Nachweis synthetischer Oligonukleotide ohne Hintergrund-DNA. Dies ist wahrscheinlich zum Teil auf die Anwesenheit der biotinylierten Hintergrund-DNA zurückzuführen. Zusätzlich war aber in vielen Fällen das Hybridisierungssignal deutlich verschlechtert und wies ebenfalls auf ein Problem bei der Hybridisierung doppelsträngiger Ziel-DNA hin. Eine mögliche Ursache der geringeren Hybridisierungssignale war eine erneute Zusammenlagerung der Ziel-DNA-Stränge nach der Denaturierung aufgrund der kleinen Reaktionsvolumina in der RT-iPCR (vergleiche Wang *et al.* 2004). Die Verwendung einer alternativen Denaturierungstechnik nach Minunni *et al.* (2005), die ein *re-annealing* der Ziel-DNA-Stränge verhindern sollte, führte nicht zu einer Verbesserung der Sensitivität. Es wurde aber beobachtet, dass eine Verkürzung der Zeitspanne zwischen Denaturierung der Proben-DNA und Beginn des Hybridisierungsschrittes das Signal/Hintergrund-Verhältnis tendenziell verbesserte (Daten nicht gezeigt).

Beim Einsatz biotinylierter genomischer Hintergrund-DNA wurde ein synthetisches Oligonukleotid bis zu einer Nachweisgrenze von 60 amol in 1,6 µg Bio-mdaDNA – also bis zu einem Gehalt von 0,02 % – detektiert. Dagegen wurde das Signal des PCR-Amplikons *Bio-mail483bp* schon ab einem Gehalt von 1 % vom Hintergrund überlagert.

Zurzeit ist die Sensitivität des im Rahmen dieser Arbeit etablierten RT-iPCR-Systems nicht hoch genug für den Nachweis von Einzelkopie-Genen in genomischer DNA. Dies ist vor allem durch ein hohes Maß an Hintergrundsignalen bedingt. In der RT-iPCR ist es unmöglich, das Auftreten von Hintergrundsignalen vollständig zu vermeiden, weil durch die exponentielle Amplifikation in der PCR bereits geringe Mengen unspezifisch adsorbierter oder an fehlhybridisierte Proben-DNA gebundener *reporter*-DNA einen gewissen Hintergrund verursachen. Deshalb ist im Gegensatz zur Standard-PCR das Auftreten von Hintergrund-Signalen in der RT-iPCR normal. Nicht die absolute Höhe des Hintergrundsignals, sondern das Verhältnis des spezifischen Detektionssignals zum Hintergrundsignal bestimmt die Qualität und Leistungsfähigkeit eines RT-iPCR-Verfahrens (Adler *et al.* 2007).

Eine Reduktion der Hintergrundsignale und Verbesserung der Sensitivität konnte von der Verwendung geringer Konzentrationen eines effizienteren Detektionskonjugats erwartet werden. Deshalb wurde ein kommerzielles, für die Protein-Detektion erhältliches RT-iPCR-Kit (Imperacer™ CHI-Biotin Kit, Chimera Biotec GmbH, Dortmund) als Gesamtsystem und in Einzelkomponenten (Detektionskonjugat mit zugehörigem Real-Time PCR-System) für die DNA-Detektion mit der in dieser Arbeit vorgestellten Strategie verwendet. Es bewirkte aber keine

Verbesserung des Signal/ Hintergrund-Verhältnisses im Vergleich zur eigenen Methode (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde ein alternatives Detektionskonjugat durch die kovalente Kopplung eines monoklonalen Anti-Fluorescein-Antikörpers an Neutravidin® (Biotin-bindendes Streptavidin-Derivat; Pierce Biotechnology Inc. Rockford/USA), Sättigung der Biotin-Bindungsstellen mit *reporter*-DNA und anschließende Aufreinigung mittels Protein A-Affinitätschromatographie hergestellt. Dieses Konjugat wurde für die Detektion Fluorescein-markierter DNA-Oligonukleotide getestet und sollte die zweifache Anwendung der Biotin-Streptavidin-Interaktion innerhalb der RT-iPCR vermeiden und eine besser definierte Molekülstruktur und genauere Titration des Konjugats ermöglichen. Das Fluorescein-Konjugat wies jedoch keine Vorteile gegenüber dem herkömmlichen Konjugat auf, sondern resultierte in niedrigeren Hybridisierungssignalen und höherem Hintergrund (Daten nicht gezeigt).

Der Einsatz der beiden genannten Detektionskonjugate bewirkte keine Verbesserung. Dennoch ist eine Steigerung der RT-iPCR-Sensitivität durch die Verwendung neuerer, hoch-aktiver Detektionskonjugate zu erwarten, die durch chemisch-kovalente Vernetzung (*cross-linking*) hergestellt werden und für die Protein-Detektion ständig weiterentwickelt werden (Adler *et al.* 2008).

3.3.15.3 Selektivität

In Mischungen verschiedener Zielmoleküle wurden alle eingesetzten Konzentrationen Sequenzspezifisch detektiert. Während das Hybridisierungssignal für alle Zielmoleküle etwa gleich war, wurden für die negativen Hybridisierungskontrollen zweier Zielmoleküle (*Bio-hmg30mer* und *Bio-adh30mer*) signifikant geringere C_T -Werte gemessen, die in kleineren ΔC_T -Werten resultierten. Dies deutet auf eine Sequenz-Abhängigkeit der Hintergrund-Intensität hin. Auch die Beobachtung, dass in der RT-iPCR die C_T -Werte von Leerkontrollen in der Regel höher waren als die C_T -Werte negativer Hybridisierungskontrollen, weist darauf hin, dass die Hintergrund-Signale nicht ausschließlich durch eine Adhäsion des Detektionskonjugats an die Gefäßoberfläche bedingt ist. Ein Teil des Hintergrundes ist vermutlich durch das Auftreten unspezifischer Hybridisierungseffekte von biotinylierten DNA-Molekülen und PNA-Sonden bedingt. Hierfür sprechen auch die deutlich höheren C_T -Werte ($C_T > 35$ für eine 2 nM Ziel-DNA-Konzentration) von „no-PNA“-Kontrollen, die Ziel-DNA und das Detektionskonjugat, aber keine Fangsonde enthielten (Daten nicht gezeigt).

Unspezifische Bindungen nicht-komplementärer DNA an PNA-Sonden sind von verschiedenen Autoren beobachtet worden (Weiler *et al.* 1997, Yao *et al.* 2004, Liu *et al.* 2005). Nur vier unterschiedliche PNA-Sonden sind im Rahmen dieser Arbeit getestet worden. Bei zwei der Sonden (*Dig-adhPNA* und *Dig-hmgPNA*) wurden im Vergleich zu den anderen Sonden höhere Hintergrundsignale der negativen Hybridisierungskontrollen beobachtet. Modifikationen des PNA-Designs könnten den Hintergrund in der RT-iPCR-Detektion möglicherweise verringern. Beispielsweise

konnte durch den Einbau chiraler Monomere in die grundsätzlich achiralen PNA-Sonden die Selektivität der Hybridisierung verbessert werden. Auf diese Weise wurden in einer Studie von Corradini *et al.* (2004) unvollständige und unspezifische Hybridisierungsereignisse reduziert und damit die Sensitivität der verwendeten Methode verbessert.

3.3.15.4 Präzision

Die RT-iPCR detektiert DNA mit einer ausgezeichneten Mess- und Wiederholpräzision. Die typische *intra-assay*-Variabilität der C_T -Werte einer RT-iPCR für die Protein-Detektion liegt bei 1,2-4,4 % (Barletta 2006). In dieser Arbeit lagen die Abweichungen zwischen 0,11 und 1,37 %, wobei sie in fast allen Fällen < 1 waren (Mittelwert ca. 0,5 %). Zum Vergleich wird für ein ideales Real-Time PCR-System eine Standardabweichung für 3 Replikate von höchstens 0,167 C_T -Werten gefordert (Applied Biosystems 2008). Dies entspricht z.B. bei einem C_T -Wert von 20 einem CV-Wert von 0,8 %. Variationskoeffizienten der C_T -Werte in der Real-Time PCR sollten für eine optimale Messpräzision im höheren Kopienzahl-Bereich < 1 % liegen (Vaerman 2004). In der Praxis liegen die tatsächlichen *intra-assay*-Abweichungen jedoch häufig deutlich darüber (Cankar *et al.* 2006).

Die typische *inter-assay*-Variabilität der C_T -Werte einer RT-iPCR für die Protein-Detektion beträgt bei drei unabhängigen Versuchen etwa 5,3-9,1 % (Barletta 2006, Adler *et al.* 2003). Die in dieser Arbeit ermittelten *inter-assay*-CV-Werte von 0,04 bis 2,7 %, bezogen auf die C_T -Werte, weisen auf eine hohe Robustheit der Methode hin. Zum Vergleich liegt die Wiederholpräzision von Real-Time PCR-Analysen, bezogen auf die C_T -Werte, im Bereich von 5-14 % (Gasparic *et al.* 2008).

Bei der Beurteilung der Mess- und Wiederholpräzision der RT-iPCR, beispielsweise im Vergleich zur Real-Time PCR, muss bedacht werden, dass zusätzlich zu dem ohnehin vorhandenen Real-Time PCR-Schritt in der RT-iPCR zusätzlich noch Plattenbeschichtung, Hybridisierung, Bindung des Detektionskonjugats und diverse Wasch- und Blocking-Schritte Einfluss auf die Präzision der Methode nehmen und viele Fehlerquellen bergen. Vor diesem Hintergrund ist die Präzision der Methode nach Einschätzung der Autorin bemerkenswert hoch. Die hohe Präzision der Detektion ermöglicht den Einsatz weniger Replikate in der RT-iPCR. Eine Anzahl von 3 Replikaten pro Einzelbestimmung wäre beim Einsatz der Methode wahrscheinlich ausreichend.

3.3.15.5 Fazit und Ausblick

Mit der für die DNA-Detektion modifizierten RT-iPCR lässt sich synthetische und aus echter Proben-DNA amplifizierte Ziel-DNA mit einer Länge von 16 bis etwa 500 bp Sequenz-spezifisch nachweisen. Die Sensitivität der Detektion synthetischer DNA im Modellversuch ohne die Anwesenheit von Hintergrund-DNA ist mit einer Nachweisgrenze von 6 Attomol sehr gut. Bei der Anwesenheit von gDNA oder mdaDNA als Hintergrund ist die Sensitivität geringer und nicht aus-

reichend für die direkte Detektion von Einzelkopie-Sequenzen in komplexer genomischer DNA, wie z.B. Proben-DNA in der GVO-Analyse. Durch eine Optimierung des Sonden-Designs und den Einsatz neuerer, hoch-aktiver Detektionskonjugate könnte möglicherweise eine weitere Verbesserung der Sensitivität erreicht werden. Hervorzuheben ist die ausgezeichnete Präzision und Wiederholbarkeit der RT-iPCR-Messungen, die eine gute Basis für eine mögliche Weiterentwicklung der Methode bilden. Auch mit der bisher erreichten Leistungsfähigkeit der RT-iPCR ist eine Anwendung für die parallele DNA-Detektion in Einsatzgebieten denkbar, in denen entweder kleinere Genome (z.B. von Bakterien) oder mehrfach im Genom vorhandene Zielsequenzen (z.B. in Chloroplasten) untersucht werden.

3.4 Zusammenfassung

Es wurde eine neue Strategie für die Sequenz-spezifische DNA-Detektion entwickelt, bei der eine Kombination aus komplementärer Hybridisierung, immunologischer Detektion und Signal-Amplifikation mittels einer uniformen PCR eingesetzt wird. Die Durchführung individueller Zielsequenz-Amplifikationen wird dabei vermieden. Die DNA-Detektion basiert auf dem Prinzip der Real-Time Immuno-PCR (RT-iPCR), die in der Protein-Analytik erfolgreich für die ultra-sensitive Detektion von Proteinen angewendet wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen erstmals den Sequenz-spezifischen und selektiven Nachweis von DNA mit der RT-iPCR, die nach Wissen der Autorin bisher ausschließlich für den Nachweis von Antigenen verwendet wurde. Sowohl synthetische Oligonukleotide als auch PCR-amplifizierte Proben-DNA ließen sich mit und ohne die Anwesenheit von Hintergrund-DNA mit sehr hoher Messpräzision und Wiederholbarkeit nachweisen. Die Nachweisgrenze für ein synthetisches DNA-Oligomer unter optimalen Nachweisbedingungen lag bei 6 Attomol, während PCR-amplifizierte DNA in Mischungen mit einem nicht-komplementären PCR-Amplikon bis zu einer Menge von 60 Attomol detektiert wurde.

Die Amplifikationsstärke der PCR erzeugt eine hohe Signalstärke der Detektion. Gleichzeitig bringt die starke Signal-Amplifikation den Nachteil hoher Hintergrund-Signale mit sich, die die Sensitivität der DNA-Detektion in Anwesenheit größerer Mengen unspezifischer DNA verringern. Versuche mit genomischer Hintergrund-DNA zeigten, dass die Sensitivität der RT-iPCR zurzeit nicht für den Nachweis von Einzelkopie-Sequenzen in komplexer genomischer DNA ausreicht. Mit ihrer derzeitigen Sensitivität ist die RT-iPCR daher für die GVO-Detektion in Pflanzen-DNA ohne vorherige Zielsequenz-Amplifikation, beispielsweise in Kombination mit der im ersten Teil der Arbeit vorgestellten *multiple displacement amplification*, nicht geeignet. Ein Einsatz für andere Anwendungen ist denkbar, bei denen entweder kleinere Genome oder mehrfach im Genom vorhandene Zielsequenzen untersucht werden.

3.5 Literatur

- ABI Probe Designer (2009) Applied Biosystems, Online Software Tool, URL: <https://www2.appliedbiosystems.com/support/pnadesigner.cfm> (2009)
- Ader, M., Wacker, R. & Niemeyer, C.M. (2003) A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 308 (2):240-250
- Adler, M., Schulz, S., Fischer, R. & Niemeyer, C.M. (2005a) Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333(4):1289-1294
- Adler, M., Wacker, R. & Niemeyer, C.M. (2008) Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies. *Analyst* 133(6):702-718
- Adler, M., Wacker, R., Bootink, E., Manz, B. & Niemeyer, C.M. (2005b) Detection of femtogram amounts of biogenic amines using self-assembled DNA-protein nanostructures. *Nature Methods* 2:147-149
- Altschul, S. F., Gisch, W., Miler, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410
- Applied Biosystems (2008) ABI Application Note: Real-Time PCR – Understanding Ct, URL: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf (05/2008)
- Arumugunathan, K. & Earle, E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:208-218
- Bao, Y.P., Huber, M., Wie, T.F., Marla, S.S., Storhoff, J.J. & Müller, U.R. (2005) SNP identification in unamplified human genomic DNA with gold nanoparticle probes. *Nucleic Acids Research* 33 (2):E15
- Barletta J (2006) Applications of real-time immuno-polymerase chain reaction (rt-IPCR) for the rapid diagnoses of viral antigens and pathologic proteins. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2-3):224-253
- Barletta, J.M., Edelman, D.C. & Constantine, N.T. (2004) Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *American Journal of Clinical Pathology* 122(1):20-27
- Biochemistry Online (2009) Jakubowski, H., URL: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bcintro/default.html>; AAAS (04.03.2010).
- Brandt, O., Feldner, J., Stephan, A., Schroeder, M., Schnoelzer, M., Arlinghaus, H.F., Hoheisel, J.D. & Jacob, A. (2003) PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA Samples. *Nucleic acids research* 31 (19):E119
- Brandt, O., Feldner, J., Hellweg, S., Schröder, M., Stephan, A., Arlinghaus, H.F., Hoheisel, J.D. & Jacob, A. (2006) Development towards label- and amplification-free genotyping of genomic DNA. *Applied Surface Science* 252 (19):6935-6940
- Burgener, M., Sängler, M. & Candrian, U. (2000) Synthesis of a stable and specific surface plasmon resonance biosensor surface employing covalently immobilized peptide nucleic acids. *Bioconjugate Chemistry* 11:749-754
- Cai, H., Wang, Y., He, P. & Fang, Y. (2002) Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Analytica Chimica Acta* 469 (2):165-172

Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J. & Gruden, K. (2006) Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 6:37

Cao, Y., Kopplow, K. & Liu, G.Y. (2000) In-situ immuno-PCR to detect antigens. *Lancet* 356(9234):1002-1003

Chandler, D.P. & Jarrell & A.E. (2003) Enhanced nucleic acid capture and flow cytometry detection with peptide nucleic acid probes and tunable-surface microparticles. *Analytical Biochemistry* 312:183-190

Corradini, R., Feriotto, G., Sforza, S., Marchelli, R. & Gambari, R. (2004) Enhanced recognition of cystic fibrosis W1282X DNA point mutation by chiral peptide nucleic acid probes by a surface plasmon resonance biosensor. *Journal of Molecular Recognition* 17(1):76-84

Demidov, V.V., Yavnilovich, M.V., Belotserkovskii, B.P., Frank-Kamenetskii, M.D. & Nielsen, P.E. (1995) Kinetics and mechanism of polyamide ("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (7):2637-2641

DIN (2008) DIN 32645: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung; Beuth Verlag 11/2008

Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S.M., Driver, D.A., Berg, R.H., Kim, S.K., Norden, B. & Nielsen, P.E. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365:566-568

Fritzsche, W. & Taton, T.A. (2003) Metal nanoparticles as labels for heterogeneous, chip-based DNA detection. *Nanotechnology* 14 (12):R63-R73

Gašparič, M.B., Cankar, K., Žel, J. & Gruden, K. (2008) Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms *BMC Biotechnology* 8:26

Germini, A., Rossi, S., Zanetti, A., Corradini, R., Fogher, C. & Marchelli, R. (2005) Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:3958-62

Giesen, U., Kleider, W., Berding, C., Geiger, A. Orum, H. & Nielsen, P.E. (1998) A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucleic Acids Research* 26 (21):5004-5006

Gofflot, S., Deprez, M., el Moualij, B., Osman, A., Thonnart, J.F., Hougrand, O., Heinen, E., Zorzi, W. (2005) Immunoquantitative PCR for prion protein detection in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Clinical Chemistry* 51 (9):1605-1611

Guo, Z., Guilfoyle, A., Thiel, A.J., Wang, R. & Smith, L.M. (1994) Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acid Research* 22 (24): 5456-5465

Henterich, N., Osman, A.A., Méndez, E. & Mothes, T. (2003) Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung* 47 (5):345-348

Holck, A., Va, M., Didierjean, L. & Rudi, K. (2002) 5'Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified MON810 MaisGard maize. *European Food Research and Technology* 214:449-453

Holst-Jensen, A., Ronning, S.B., Lovseth, A. & Berdal, K.G. (2003) PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375:985-993

- Hyrup, B. & Nielsen, P.E. (1996) Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem.* 4(1):5-23
- Isacsson, J., Cao, H., Ohlsson, L., Nordgren, S., Svanik, N., Westman, G., Kubista, M., Sjoback, R. & Sehlstedt, U. (2000) Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. *Molecular and Cellular Probes* 14 (5):321-324
- ISO (2005a) ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ©ISO AA2005
- Kato, K.I., Gonçalves, J.M., Houts, G.E. & Bollum, F.J. (1967) Deoxynucleotide polymerizing enzymes of calf thymus gland II. Properties of terminal deoxynucleotidyl transferase. *Journal of Biological Chemistry* 242 (11):2780–2789
- Komatsu, M., Kobayashi, D., Saito, K., Furuya, D., Yagihashi, A., Araake, H., Tsuji, N., Sakamaki, S., Niitsu, Y. & Watanabe, N. (2001) Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clinical Chemistry* 47(7):1297-1301
- Kuhn, H., Demidov, V.V., Gildea, B.D., Fiandaca, M.J., Coull, J.C. & Frank-Kamenetskii, M.D. (2001) PNA beacons for duplex DNA. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 11 (4):265-270
- Leimanis, S., Hamels, S., Naze, F., Mbongolo, G., Sneyers, M., Hochegger, R., Broll, H., Roth, L., Dallmann, K., Micsinai, A., La Paz, J.L., Pla, M., Brünen-Nieweler, C., Papazova, N., Taverniers, I., Hess, N., Kirschneit, B., Bertheau, Y., Audeon, C., Laval, V., Busch, U., Pecoraro, S., Neumann, K., Rösel, S., van Dijk, J.P., Kok, E., Bellocchi, G., Foti, N., Mazzara, M., Moens, w., Remacle, J. & Eede, G. van (2008) Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray detection. *European Food Research and Technology* 227:1621–1632
- Lind, K. & Kubista, M. (2005) Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. *Journal of Immunological Methods* 304:107-116
- Lucarelli, F., Tombelli, S., Minunni, M., Marrazza, G. & Mascini, M. (2008) Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Analytica Chimica Acta* 609 (2):139-159
- Macanovic, A., Marquette, C., Polychronakos, C. & Lawrence, MF. (2004) Impedance-based detection of DNA sequences using a silicon transducer with PNA as the probe layer. *Nucleic Acids Research* 32(2):e20
- Minunni, M., Tombelli, S., Fonti, J., Spiriti, M.M., Mascini, M., Bogani, P. & Buiatti, M. (2005) Detection of Fragmented Genomic DNA by PCR-Free Piezoelectric Sensing Using a Denaturation Approach. *Journal of the American Chemical Society* 127 (22):7966-7967
- NCBI (2009) National Center for Biotechnology Information (NCBI) Database, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (07.03.2010)
- Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H. & Buchardt, O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254 (5037):1497-1500
- Niemeyer, C.M., Adler, M. & Wacker, R. (2005) Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends in Biotechnology* 23 (4)
- Niemeyer, C.M., Adler, M. & Wacker, R. (2007) Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. *Nature Protocols* 2(8):1918-1930
- Niemeyer, C.M., Adler, M., Pignataro, B., Lenhert, S., Gao, S., Chi, L., Fuchs, H. & Blohm, D. (1999) Self-assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR. *Nucleic Acids Research* 27 (23):4553-4561

- Norrande, J., Kempe, T. & Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26 (1):101-106
- Orum, H., Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., Buchardt, O. & Stanley, C. (1993) Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Research* 21 (23):533-536
- Patolsky, F., Lichtenstein, A. & Willner, I. (2001) Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction. *Nature Biotechnology* 19 (3):253-257
- Peffer, N.J., Hanvey, J.C., Bisi, J.E., Thomson, S.A., Hassman, C.F., Noble, S.A. & Babiss, L.E. (1993) Strand-invasion of duplex DNA by peptide nucleic acid oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 90 (22): 10648-10652
- Perry-O'Keefe, H., Yao, X.W., Coull, J.M., Fuchs, M. & Egholm, M. (1996) Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: An alternative to Southern Hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 93 (25): 14670-14675
- Ray, A. & Norden, B. (2000) Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J* 14 (9): 1041-1060
- Raymond, F.R., Ho, H.A., Peytavi, R., Bissonnette, L., Boissinot, M., Picard, F.J., Leclerc, M., & Bergeron, M.G. (2005) Detection of target DNA using fluorescent cationic polymer and peptide nucleic acid probes on solid support. *BMC Biotechnology* 5:10
- Roche Applied Science (2009) www.roche-applied-science.com (2010)
- Ross, P.L., Lee, K. & Belgrader, P. (1997) Discrimination of Single-Nucleotide Polymorphisms in Human DNA Using Peptide Nucleic Acid Probes Detected by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 69 (20):4197-4202
- Saito, K., Kobayashi, D., Sasaki, M., Araake, H., Kida, T., Yagihashi, A., Yajima, T., Kameshima, H. & Watanabe, N. (1999) Detection of human serum tumor necrosis factor-alpha in healthy donors, using a highly sensitive immuno-PCR assay. *Clinical Chemistry* 45 (5):665-669
- Sambrook J. & Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sano, T., Smith, C.L. & Cantor, C.R. (1992) Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-conjugates. *Science* 258:120-122
- Schäferling, M., & Nagl, S. (2006) Optical technologies for the read out and quality control of DNA and protein microarrays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385:500-517
- Schiavo, S., Yang, W.C., Chin, N.H. & Krull, I.S. (2005) Comparison of fluorometric detection methods for quantitative polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 26 (1):1-12
- Schwarz, F.P., Robinson, S. & Butler, J.M. (1999) Thermodynamic comparison of PNA/DNA and DNA/DNA hybridization reactions at ambient temperature. *Nucleic Acids Research* 27 (24):4792-4800
- Shchepinov, M.S., Case-Green, S.C., Southern, E.M. (1997) Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research* 25(6):1155-61
- Sims, P.W., Vasser, M., Wong, W.L., Williams, P.M. & Meng, Y.G. (2000) Immunopolymerase Chain Reaction Using Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection. *Analytical Biochemistry* 281 (2):230-232
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517

- Stephenson, F.H. (2005) *Mathematik im Labor*. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier, München.
- Vaerman, J.L., Saussoy, P. & Ingargiola, I. (2004) Evaluation of real-time PCR data. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 18:212-214
- Valasek, M.A. & Repa, J.J. (2005) The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29 (3):151-159
- Walsh, P.S., Erlich, H.A. & Higuchi, R. (1992) Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *Genome Research* 1 (4):241-250
- Wang, R., Minunni, M., Tombelli, S., & Mascini, M. (2004) A new approach for the detection of DNA sequences in amplified nucleic acids by a surface plasmon resonance biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (3):598-605
- Weiler, J., Gausepohl, H., Hauser, N., Jensen, O.N. & Hoheisel, J.D. (1997) Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Research* 25 (14): 2792–2799
- Worden, A.Z., Chisholm, S.W. & Binder, B.J. (2000) In situ hybridization of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (marine cyanobacteria) spp. with rRNA-targeted peptide nucleic acid probes. *Applied Environmental Microbiology* 66 (1):284-289
- Wu, H.C., Huang, Y.L., Lai, S.C., Huang, Y.Y. & Shaio, M.F. (2001) Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR. *Letters in Applied Microbiology* 32(5):321-325

4 Anhang

Anhang A Materialien

Produkt- und Markennamen sind unter Irrtumsvorbehalt aufgeführt. In dieser Arbeit verwendete Markennamen oder Produktbezeichnungen sind im Allgemeinen geschützte Warenzeichen oder Marken ihrer Firmen und unterliegen markenrechtlichem Schutz. Das Fehlen eines Markenschutzvermerks bei Erwähnung eines Produkt- oder Markennamens in diesem Kapitel bedeutet nicht, dass dieser Produkt- oder Markenname ungeschützt und zur freien Verwendung freigegeben ist. In den übrigen Abschnitten dieser Arbeit wurde auf eine zusätzliche Kennzeichnung von Marken- oder Urheberrechten verzichtet.

Tabelle 4-1 Chemikalien.

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose Molecular Biology Grade	Eurogentec, Seraing/Frankreich
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Millipore, Bedford, USA
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 1 %ige Lösung	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Gereinigtes Wasser, <i>Aqua purificata (A. purif.)</i> ; DNA-, RNA-frei	Fluka, Buchs, Schweiz
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma, Deisenhofen
Ready Red™ (Chloroform/Isoamylalkohol)	Qbiogene, Heidelberg
Salzsäure 25 %ig	Merck, Darmstadt
TBE-Puffer	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Tween® 20	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Anhang A

Materialien

Tabelle 4-2 Enzyme und biochemische Fertigreagenzien.

<i>Produktname</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Digoxigenin	Roche Applied Science, Mannheim
Biotin-16-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate (Biotin-16-dUTP)	Roche Applied Science, Mannheim
Blocking Reagent for ELISA	Roche Applied Science, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Applied Science, Mannheim
DNAeasy® Plant Mini Kit zur DNA Extraktion	QIAGEN, Hilden
DNase, 10x DNase Puffer	New England Biolabs, Schwalbach
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)	Applied Biosystems, Darmstadt
GenomiPhi™ DNA Amplification Kit	GE Healthcare, Freiburg
High Prime DNA Labeling Kit	Roche Applied Science, Mannheim
Hotstar Taq PCR Core Kit	QIAGEN, Hilden
NBT/BCIP ready-to-use tablets	Roche Applied Science, Mannheim
Perfectprep® Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg
Proteinase K	Macherey & Nagel
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
qPCR Mastermix Plus	Eurogentec, Seraing/Frankreich
RNase A	Macherey & Nagel
Streptavidin, rekombinant	Roche Applied Science, Mannheim
Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche Applied Science, Mannheim
Terminale Deoxynucleotidyl Transferase	Promega, Mannheim

Tabelle 4-3 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen.

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
10x TBS/EDTA	50 mM Tris; 150 mM NaCl; 2mM EDTA; pH 7,4
Bisbenzimid-Lösung (100 ng/ml)	10 ml TNE-Puffer (10x) 10 µl Bisbenzimid-Stammlösung ad 100 ml
Bisbenzimid-Stammlösung	1 mg/ml Bisbenzimid
Blockinglösung für die RT-iPCR	1x TBS/EDTA; 1 % (w/v) Blocking Reagent for ELISA; 250 µg/ml DNA from Fish Sperm; 0,05 % (v/v) Tween
CTAB-Extraktionspuffer	20 g/l CTAB; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris; 20 mM EDTA; pH 8,0
CTAB-Präzipitationslösung	5 g/l CTAB; 0,04 M NaCl
Konjugatpuffer für die RT-iPCR	10 mM Tris, pH 7,5; 5 mM EDTA
TNE-Puffer (10x)	100 mM Tris; 10 mM EDTA; 2 M NaCl; pH 7.4
Waschpuffer für die RT-iPCR	1x TBS/EDTA; 0,05 % (v/v) Tween

Tabelle 4-4 Genomische DNA.

<i>Herkunft</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Beschaffenheit</i>
<i>Zea mays</i> (Mais), Linie Event176	Syngenta Seeds	Bipea, Frankreich	Saatgut; 100 % GVO
<i>Zea mays</i> , Linie MON810	Monsanto	RAGT Semences, Frankreich	Mehl; 100 % (w/w) und 0 % GVO
<i>Zea mays</i> , Linie MON810	Monsanto	LGC Promochem GmbH, Wesel	Pulver; IRMM zertifiziertes Referenzmaterial; 5 % (w/w) GVO
<i>Zea mays</i> , Linie T25	Avegro	Nordsaat Saatzeitgesellschaft mbH, Böhnshausen	Mehl; 100 % GVO
<i>Bos taurus</i> (Rind)	–	Lebensmittel-Einzelhandel	Muskelgewebe
<i>E.coli</i> RRI, <i>pUC19</i> -Plasmid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	DNA
Calf Thymus DNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	DNA
DNA from Fish Sperm	Roche Applied Science, Mannheim	Roche Applied Science, Mannheim	DNA

Anhang A Materialien

Tabelle 4-5 PCR-Primer und TaqMan-Sonden.

Herkunft	Name	Sequenz 5'→3' inclusive Modifizierung	Länge (bp)	Accession Number	Verwendung in der Arbeit	Referenz
<i>Zea mays, adh1</i>	adh-f3	CgTCgTTTCCCATCTC TTCCTCC	23	X04049.1	Real-Time PCR-Primer <i>sense</i> , 134bp-Amplikon	a
<i>Zea mays, adh1</i>	adh-r4	CCACTCCgAgACCTC AgTC	20	X04049.1	Real-Time PCR-Primer <i>antisense</i> , 134bp-Amplikon	a
<i>Zea mays, adh1</i>	adh-mdo- probe	AATCAgggCTCATT CTCgCTCC	27	X04049.1	Real-Time PCR-Sonde, korrespondierend zu <i>adh-f3</i> und <i>adh-r4</i>	a
<i>Zea mays, hmg</i>	ZM1-f	TTggACTAgAAATCTC gTgCTgA	23	AJ131373.1	Real-Time PCR-Primer <i>sense</i> , 79bp-Amplikon	a
<i>Zea mays, hmg</i>	ZM1-r	gCTACATAgggAgCCT TgTCCT	22	AJ131373.1	Real-Time PCR-Primer <i>antisense</i> , 79bp-Amplikon	a
<i>Zea mays, hmg</i>	ZM1-Sonde	FAM-CAATCCACACA AACgCACgCg-TAMRA	24	AJ131373.1	Real-Time PCR-Sonde, korrespondierend zu <i>ZM1-f</i> und <i>ZM1-r</i>	a
<i>Zea mays, inv</i>	ZmayInv-f	CACTCCATCgTggAgA gCTT	20	U16123.1	Real-Time PCR-Primer <i>sense</i> , 111bp-Amplikon	b
<i>Zea mays, inv</i>	ZmayInv-r	ggCgTTgTTgAAgAggA AgA	20	U16123.1	Real-Time PCR-Primer <i>antisense</i> , 111bp-Amplikon	b
<i>Zea mays, inv</i>	ZmayInvFT- Sonde	FAM-TACCCACACg AgCCATCTACgACT- Tamra	26	U16123.1	Real-Time PCR-Sonde, korrespondierend zu <i>ZmayInv-f</i> und <i>ZmayInv-r</i>	b
<i>Zea mays</i> , Linie MON810, mail- Konstrukt	mail-f1	TCgAAggACgAAggAC TCTAACgT	24	AF434709.1	Real-Time PCR-Primer <i>sense</i> , 92bp-Amplikon	a
<i>Zea mays</i> , Linie MON810, mail- Konstrukt	mail-r1	gCCACCTTCCTTTTC CACTATCTT	24	AF434709.1	Real-Time PCR-Primer <i>antisense</i> , 92bp-Amplikon	a
<i>Zea mays</i> , Linie MON810, mail- Konstrukt	mail-s2	FAM-AACATCCTTTg CCATTgCCCAgC- TAMRA	24	AF434709.1	Real-Time PCR-Sonde, korrespondierend zu <i>mail-f1</i> und <i>mail-r1</i>	a
<i>E.coli</i> RRI, <i>pUC19</i> -Plasmid	pUC19-f	CggCATCCgCTTACA gACA	19	M77789.2	Real-Time PCR-Primer <i>sense</i> , 113bp-Amplikon; Nachweis der <i>reporter</i> -DNA (RT-iPCR)	c
<i>E.coli</i> RRI, <i>pUC19</i> -Plasmid	pUC19-r	AAATAggCgTATCAC gAggC	20	M77789.2	Real-Time PCR-Primer <i>antisense</i> , 113bp-Amplikon; Nachweis der <i>reporter</i> -DNA (RT-iPCR)	c
<i>E.coli</i> RRI, <i>pUC19</i> -Plasmid	pUC19- probe	FAM-TCATCACCCgAA ACgCgCgAgAC- TAMRA	22	M77789.2	Real-Time PCR-Sonde korrespondierend zu <i>pUC19-f</i> und <i>pUC19-r</i> ; Nachweis der <i>reporter</i> -DNA (RT-iPCR)	c
<i>E.coli</i> RRI, <i>pUC19</i> -Plasmid	Bio-pUC19- Reporter-f	Bio-TTAAgCCAgCCCC gACAC	18	M77789.2	PCR-Primer <i>sense</i> , 226bp- Amplikon für Herstellung der <i>reporter</i> -DNA (RT-iPCR)	c
<i>E.coli</i> RRI, <i>pUC19</i> -Plasmid	Bio-pUC19- Reporter-r	Bio-AAgTgCCACCT gACgTCTAAgA	22	M77789.2	PCR-Primer <i>antisense</i> , 226bp- Amplikon für Herstellung der <i>reporter</i> -DNA (RT-iPCR)	c

^a ISO 21570:2005 Foodstuffs – methods of analysis for the detection of GMOs and derived products – quantitative nucleic acid based methods (2005); ^b Ronning, S. *et al.* (2003): Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize. *Eur Food Res Technol* 216:347; ^c Im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Primer und Sonden.

Tabelle 4-6 PNA-Oligonukleotide für die RT-iPCR.

Herkunft	Name	Sequenz 5'→3' inclusive Modifizierung	Länge (bp)	Accession Number	Synthese/ Hersteller
<i>Zea mays</i> , <i>adh1</i>	Dig-adhPNA	Dig-OO-CACGGACCACGGCCACGGCTAT	16	X04049.1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
<i>Zea mays</i> , <i>hmg</i>	Dig-hmgPNA	Dig-OO-AAATCTCGTGCTGA	14	AJ131373.1	
<i>Zea mays</i> , <i>inv</i>	Dig-invPNA	Dig-OO-CTGCTCATTATTGC	14	U16123.1	Panagene (Daejeon, Korea)
<i>Zea mays</i> , Linie MON810, <i>mail</i> -Konstrukt	Dig-mailPNA	Dig-OO-TTTgCCATTgCCCAgC	16	AF434709.1	

adh1 = Alkoholdehydrogenase 1; *hmg* = High Mobility Group1; *inv* = Invertase

Tabelle 4-7 DNA-Oligonukleotide für die RT-iPCR.

Herkunft	Name	Sequenz 5'→3' inclusive Modifizierung	Länge (bp)	Accession Number
<i>Zea mays</i> , <i>adh1</i>	Bio-adh-16mer	(Biotin)-CACGGACCACGGCTAT	16	X04049.1
<i>Zea mays</i> , <i>adh1</i>	Bio-adh-30mer	(Biotin)-ACATAGCCGTGGTCCTGGACGTGGTTTTC	30	X04049.1
<i>Zea mays</i> , <i>adh1</i>	Bio-adh-48mer	(Biotin)-ACCTGGAGTGGAACATAGCCGTGGTCCGTGGACGTGGTTTTCGCTCGT	48	X04049.1
<i>Zea mays</i> , <i>hmg</i>	Bio-hmg-30mer	(Biotin)-TCAGCACGAGATTTCTAGTCCAATCAACTA	30	AJ131373.1
<i>Zea mays</i> , <i>inv</i>	Bio-inv-30mer	(Biotin)-TCAGAAGCAATAATGAGCAGTGCGAGAAGA	30	U16123.1
<i>Zea mays</i> , Linie MON810, <i>mail</i> -Konstrukt	Bio-mail-30mer	(Biotin)-TAAAGTGACAGATAGCTGGGCAATGGCAAA	30	AF434709.1
<i>Zea mays</i> , Linie MON810, <i>mail</i> -Konstrukt	Bio-mail-48mer	(Biotin)-CACAATAAAGTGACAGATAGCTGGGCAATGGCAAAGGATGTAAACGT	48	AF434709.1

adh1 = Alkoholdehydrogenase 1; *hmg* = High Mobility Group1; *inv* = Invertase

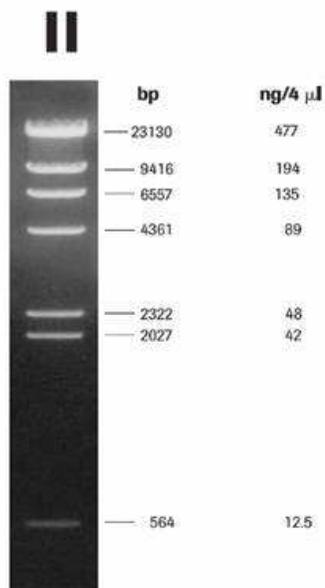
Anhang A Materialien

Tabelle 4-8 Primer für die Herstellung von Zielmolekülen für die RT-iPCR.

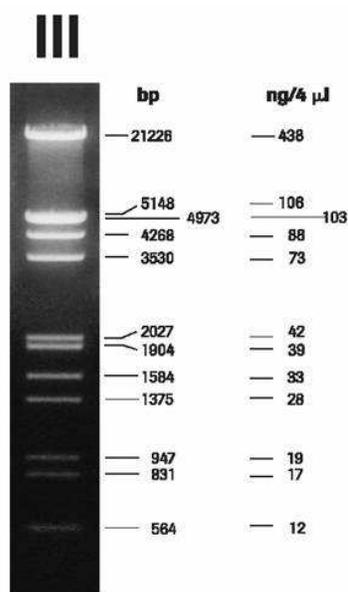
<i>Herkunft</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz 5'→3' inklusive Modifizierung</i>	<i>Länge (bp)</i>	<i>Accession Number</i>	<i>Verwendung in der Arbeit</i>
<i>Zea mays, adh1</i>	Bio-adh-50bp-f	Biotin-ACgAgCgAAAACCAC	15	X04049.1	<i>sense</i> -Primer für <i>Bio-adh50bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	Bio-adh-50bp-r	Biotin-CACCTggAgTggAACA	16	X04049.1	<i>antisense</i> -Primer für <i>Bio-adh50bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	adh-70bp-f	ACCAgTCCACCACCTC	16	X04049.1	<i>sense</i> -Primer für <i>Multi-bio-adh70bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	adh-70bp-r	ACCTggAgTggAACAT	16	X04049.1	<i>antisense</i> -Primer für <i>Multi-bio-adh70bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	Bio-adh-70bp-f	Biotin-ACCAgTCCACCACCTC	16	X04049.1	<i>sense</i> -Primer für <i>Bio-adh70bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	Bio-adh-70bp-r	Biotin-ACCTggAgTggAACAT	16	X04049.1	<i>antisense</i> -Primer für <i>Bio-adh70bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	adh-512-f	CgTgCggTgAAAATgTgAA	19	X04049.1	<i>sense</i> -Primer für <i>Multi-bio-adh512bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	adh-512-r	AAgCgAgATgAgCCTgTgAg	20	X04049.1	<i>antisense</i> -Primer für <i>Multi-bio-adh512bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	Bio-adh-512-f	Biotin-CgTgCggTgAAAATgTgAA	19	X04049.1	<i>sense</i> -Primer für <i>Bio-adh512bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, adh1</i>	Bio-adh-512-r	Biotin-AAgCgAgATgAgCCTgTgAg	20	X04049.1	<i>antisense</i> -Primer für <i>Bio-adh512bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, Linie MON810, mail-Konstrukt</i>	mail-70bp-f	ggACTCTAACgTTTAACATC	20	AF434709.1	<i>sense</i> -Primer für <i>Multi-bio-mail70bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, Linie MON810, mail-Konstrukt</i>	mail-70bp-r	CCTTTTCCACTATCTTCA	18	AF434709	<i>antisense</i> -Primer für <i>Multi-bio-mail70bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, Linie MON810, mail-Konstrukt</i>	Bio-mail-483bp-f	ATgTAgAgggCATgggTg	18	AF434709	<i>sense</i> -Primer für <i>Bio-mail483bp</i> -Amplikon
<i>Zea mays, Linie MON810, mail-Konstrukt</i>	Bio-mail-483bp-r	CAgAggCATCTTCAACgA	18	AF434709	<i>antisense</i> -Primer für <i>Bio-mail483bp</i> -Amplikon

Tabelle 4-9 DNA-Längenstandards (Molecular Weight Marker, MWM). Hersteller: Roche Applied Science, Mannheim.

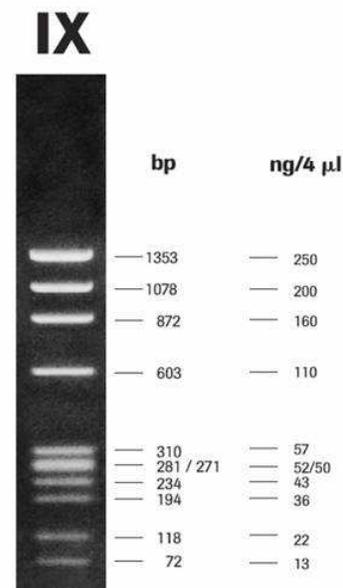
MWM II
(λ -DNA, *Hind* III, 0,12-23,1 kbp)



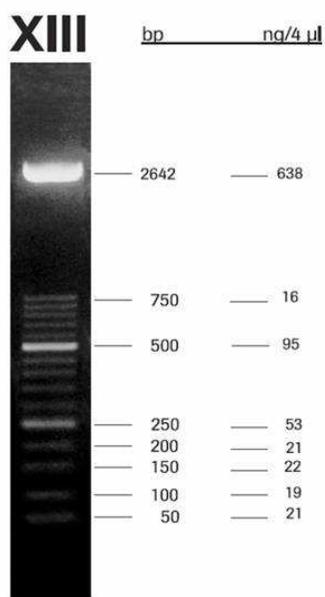
MWM III
(λ -DNA, *Eco* RI + *Hind* III, 0,12-21,2 kbp)



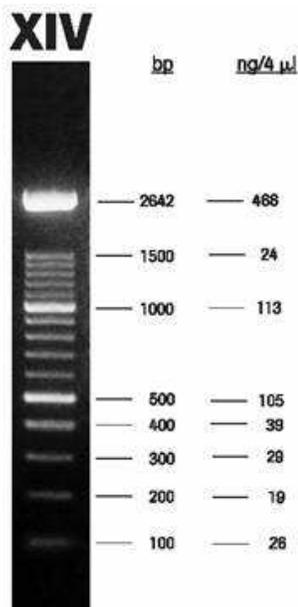
MWM IX
(ϕ X174DNA *Hae* III, 0,072-1,35 kbp)



MWM XIII
(50 bp ladder)



MWM XIV
(100 bp ladder)



Abbildungen aus Roche Applied Science (2009), URL: www.roche-applied-science.com (2009)

Anhang A

Materialien

Tabelle 4-10 Verbrauchsmaterialien.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
Falcon™-Typ Röhren 50 ml	Nerbe-Plus, Winsen an der Luhe
Falcon™ Tubes 15 ml	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
Falcon™-Typ Röhren 50 ml	Nerbe Plus, Winsen a. d. Luhe
Filtertip Pipettenspitzen	Art (Fisher Scientific, Schwerte) und Eppendorf, Hamburg
Laborhandschuhe	Kimberly-Clark, Mainz
MicroAmp® 96-Well Tray/Retainer Set	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikrotiterplatten, 96-Well Optical Reaction Plates	Applied Biosystems, Darmstadt
Nylon Membranes, positively charged	Roche Applied Science, Mannheim
PCR Tubes 0,2 ml	Molecular Bio Products (Fisher Scientific, Schwerte)
PCR Tubes 0,5 ml	Biometra, Göttingen
Reaktionsgefäße (0,5/ 1,5/ 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Robostrip® 0,2 ml-Polykarbonat-Streifen	AJ Roboscreen, Leipzig
Rotilabo® Verschlussfilm für Mikrotiterplatten	Roth, Karlsruhe

Tabelle 4-11 Geräte.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller, Typenbezeichnung</i>
Analysenwaage	Janke & Kunkel IKA® Labortechnik
Analysenwaage	Sartorius
Dot/Slot-System	Schleicher und Schuell, Minifold™ I
Elektrophorese-Station	Pharmacia, EPS 3500 XL
Fluorometer	Hoefer®, DyNA Quant™ 200
Folien-Schweißgerät	Audion Elektro, Sealboy 235
Gel-Dokumentationssystem	GeneGenius Super 12
Gradienten-Thermocycler	Eppendorf, Mastercyclergradient
Heizplatten-Rührgerät	IKA®, RCTB
Labor-Pipetten	Eppendorf, Research® (Einkanal und 8-Kanal)
Mikrowelle	Bosch
PCR-Arbeitshaube	Herolab, Clenecab®
pH-Meter	Schott CG 837
Plattenschüttler	Biometra, Mini Rocking Platform WT 14
Schüttelwasserbad	Grant OLS 200
Schwingmühle	QIAGEN, TissueLyser
Spektrophotometer	Kisker, NanoDrop® ND-1000
Thermoblock	Techne Dri-Block® DB-2A
Thermocycler	Biometra, Trio-Thermoblock
Thermocycler	Applied Biosystems, Geneamp® PCR System 9700
Thermocycler Real-Time PCR	Applied Biosystems, ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System
Thermocycler Real-Time PCR	Applied Biosystems, ABI PRIS® 7900HT Sequence Detection System
Thermomixer	Eppendorf, Thermomixer 5436
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech, Megafuge 1.0
Tischzentrifuge mit Kühlung	Eppendorf, Centrifuge 5417 R
UV-Illuminator und -Crosslinker	Biometra, Fluo-Link FLX-20M
Vakuumzentrifuge	Eppendorf, Concentrator 5301
Vortexer	IKA®, MS1 Minishaker

Anhang A
Materialien

Tabelle 4-12 Software.

<i>Programm</i>	<i>Hersteller</i>
Microsoft® Office (Word, Excel®, Power-Point®)	Microsoft Corporation, Redmont/USA
SPSS®	SPSS® Inc., Chigago/USA
ABI Primer Express®	Applied Biosystems, Foster City, USA
Primer Premier 5	Premier Biosoft International, Palo Alto, USA
ABI Online Software Tool „PNA Probe Designer“	Applied Biosystems, Foster City, USA
NCBI Blast Online Software	NCBI, Bethesda, USA

Anhang B

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Base)
A. bidest	<i>aqua bidestillata</i>
A. purif.	<i>aqua purificata</i>
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
adh1	Alkoholdehydrogenase 1
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BC	Leerkontrolle (blank control)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bio	Biotin
Bio-mdaDNA	Biotin-modifizierte mdaDNA
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin (Base)
c	Konzentration
ca.	circa
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (cauliflower mosaic virus)
cDNA	revers transkribierte DNA (complementary DNA)
Co-Extra	co-existence and traceability (in gm and non-gm supply chains)
IRMM	Institute for Reference Material and Measurements
CRL-GMFF	Community Reference Laboratory for GM Food and Feed
C _T	threshold cycle
ΔC _T	Differenz aus 2 C _T -Werten
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CV	Variationskoeffizient, relative Standardabweichung (coefficient of variation)
d	Schichtdicke
d.h.	das heißt
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
ddUTP	Didesoxy-Uraciltriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOP-PCR	degenerate oligonucleotide primed PCR
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uraciltriphosphat
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENG	englische Sprache

Anhang B

Abkürzungsverzeichnis

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> bzw. <i>et aliae</i> („und andere“)
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
ε	Extinktionskoeffizient
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
G	Guanin (Base)
g	Gramm oder Erbeschleunigung (1 g = 9,81 m/s ²)
gDNA	genomische DNA
GER	deutsche Sprache
ges	gesamt
gv	genetisch verändert
GVO	Genetisch Veränderter Organismus
hmg	high mobility group protein
inv	Invertase
iPCR	Immuno-PCR
J	Joule
K	Kopienzahl
kbp	Kilobasenpaare
Konz.	Konzentration
Lg	dekadischer Logarithmus
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
Ln	natürlicher Logarithmus
LOD	Bestimmungsgrenze (limit of detection)
M	Mol/Liter oder Marker (DNA-Standard)
m	Masse
Maldi-TOF	matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight
MDA	multiple displacement amplification
mdaDNA	mittels MDA amplifizierte DNA
min	Minute
MS	Microsoft®
NaCl	Natriumchlorid
<i>n</i>	Natürliche Zahl
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHC	negative Hybridisierungskontrolle (negative hybridization control)
NTC	Wasserkontrolle ohne DNA (no template control)
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP-PCR	primer extension pre-amplification PCR
PNA	Peptidnukleinsäure (peptide nucleic acid)
®	eingetragene Marke (registered trademark)
RCA	rolling circle amplification
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT-iPCR	Real-Time Immuno-PCR
RT-qPCR	Real-Time quantitative Polymerasekettenreaktion
SD	absolute Standardabweichung (standard deviation)
SDS	sequence detection system
SNP	single nucleotid polymorphism

SPR	surface plasmon resonance
ss	einzelsträngig
h	Stunde
STR	short tandem repeat
T	Thymin (Base)
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl Transferase
TOF-SIMS	time-of-flight-secondary ion mass spectrometry
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
™	Marke, USA (trademark)
U	Enzymeinheit oder Uracil (Base)
URL	uniform resource locator (Internet-Quellenanzeiger)
UV	ultraviolett
V	Verdünnungsstufe
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WGA	whole genome amplification
z.B.	zum Beispiel

Anhang C Eigene Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Roth, L., Zagon, J., Laube, I., Holst-Jensen, A. & Broll, H. (2008) Generation of reference material by the use of multiple displacement amplification (MDA) for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *Food Analytical Methods* 1 (3):181-189

Roth, L., Zagon, J., Ehlers, A., Kroh, L.W. & Broll, H. (2009) A novel approach for the detection of DNA using immobilized peptide nucleic acid (PNA) probes and signal enhancement by real-time immuno-polymerase chain reaction (RT-iPCR). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (2):529-37

Beiträge zu Konferenzen:

Roth, L., Zagon, J. & Broll, H. (2006) Ein alternatives Verfahren zum parallelen Nachweis verschiedener genetisch veränderter Organismen. 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden 2006 (Poster)

Roth, L. & Broll, H. (2007) Alternative GVO-Nachweismethoden (Co-Extra). LGL Bayern Fachtagungsband Gentechnik (2):126-137 (Vortrag)

Roth, L., Zagon, J. & Broll, H. (2008) Generation of Reference Material by the Use of Multiple Displacement Amplification (MDA) for the Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs). 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Kaiserslautern 2008 (Poster)

