

Analytische Chemie

**Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor zur schnellen, zeitaufgelösten
Detektion multipler Hybridisierungsereignisse –
Einsatz zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln
und für die Identifizierung von Mikroorganismen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Carolin Peter

aus Hamburg

- 2003 -

Dekan: Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter: Prof. Dr. K. Cammann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. U. Karst

Tag der mündlichen Prüfungen: 21., 27. und 28. 01. 2004

Tag der Promotion: 28. 01. 2004

Für Dich, Opa.

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Ziel der Arbeit	3
3	Theoretischer Teil	4
3.1	Nukleinsäure-Analytik	4
3.1.1	Grundlagen	5
3.1.1.1	Nukleinsäuren: Struktur und Funktion	5
3.1.1.2	Denaturierung und Schmelzpunkt T_m	6
3.1.1.3	Hybridisierung und Stringenz	7
3.1.1.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	8
3.1.1.5	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	9
3.1.1.6	Polymerase-Kettenreaktion	9
3.1.2	DNA-Biosensoren	13
3.1.2.1	Definition und Überblick.....	13
3.1.2.2	Evaneszent-Feld-DNA-Biosensoren.....	14
3.1.2.3	Kinetische Grundlagen des DNA-Biosensors	16
3.1.3	DNA-Chip-Technologie	19
3.1.4	Immobilisierung von DNA auf Glas	21
3.2	Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln	22
3.2.1	Fragestellungen und Bedeutung.....	22
3.2.2	Proteinanalytische Methoden	23
3.2.3	DNA-analytische Methoden	24
3.2.4	Differenzierung über das <i>cytb</i> -Gen	26
3.3	Detektion von Mikroorganismen	28
3.3.1	Fragestellungen und Grundlagen	28
3.3.2	Anwendung von DNA-Mikroarrays	29
3.3.3	Modellchip zum Nachweis von sulfatreduzierenden Prokaryonten	31
4	Material und Methoden	33
4.1	Geräte, Materialien und Chemikalien	33
4.2	Referenz- und Realproben zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln	36
4.2.1	Probendaten	37
4.2.2	Durchführung der Referenzanalytik	38
4.3	Molekularbiologische Methoden	39
4.3.1	Sequenzdatenverarbeitung.....	39

4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
4.3.2.1	PCR zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln.....	40
4.3.2.2	PCR zur Detektion von Mikroorganismen	40
4.3.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	41
4.3.4	Analyse der PCR-Produkte im ALF-Sequencer.....	42
4.3.5	Sequenzierung der PCR-Produkte	42
4.4	Immobilisierung der DNA-Fangsonden auf Glas	43
4.4.1	Standardmethode auf Basis kovalenter Kopplung nach Silanisierung	43
4.4.2	Test verschiedener voraktivierter Glasobjektträger	45
4.5	Methode der Realzeit-Hybridisierung im DNA-Biosensor.....	46
4.5.1	Grundlagen	46
4.5.2	Aufbau des Messgerätes	48
4.5.3	Aufbau des Sensorchips.....	49
4.5.4	Durchführung der Messungen	50
4.5.5	Auswertung der Messungen	52
4.5.5.1	Maximumsmethode	55
4.5.5.2	Mittelwertmethode	56
4.5.5.3	Bestimmung kinetischer Konstanten	58
4.5.6	Methoden zur Korrektur des Ausleuchtungsprofils	59
4.5.6.1	Verwendung einer Korrekturmatrix.....	59
4.5.6.2	Spotinterne Korrektur	60
4.6	Methode der konventionellen Chiphybridisierung	60
4.6.1	Durchführung der Hybridisierung unter dem Deckgläschen	60
4.6.2	Auslesen der hybridisierten Glasobjektträger	61
4.6.3	Auswertung der Fluoreszenzbilder	62
4.7	Allgemeine Fehlerbetrachtung	63
5	Ergebnisse	65
5.1	Grundlagen der Realzeit-Hybridisierung im DNA-Biosensor	65
5.1.1	Untersuchungen zur Immobilisierung	65
5.1.1.1	Optimierung der Sondenkonzentration.....	65
5.1.1.2	Übertragung der Standardmethode auf verschiedene Glasobjektträger ...	66
5.1.1.3	Optimierung der Standardimmobilisierungsmethode	67
5.1.1.4	Lagerstabilität der nach Standardmethode immobilisierten Objektträger ..	69
5.1.1.5	Lagerstabilität der nach Standardmethode voraktivierten Objektträger	70
5.1.1.6	Einsatz von kommerziellen voraktivierten Glasobjektträgern	71
5.1.2	Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit.....	74
5.1.2.1	Arbeitsstabilität	74

5.1.2.2	Messungen auf mehreren Chips unterschiedlicher Chargen	76
5.1.2.3	Einfluss des Pipettierfehlers	76
5.1.3	Variation verschiedener Parameter der Hybridisierung	77
5.1.3.1	Optimierung der Fließrate.....	77
5.1.3.2	Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung	78
5.1.3.3	Spezifität der Hybridisierung.....	79
5.1.3.4	Einsatz verschiedener Hybridisierungspuffer	80
5.1.3.5	Vergleich der Auswertung mit Maximums- und Mittelwertmethode.....	83
5.1.3.6	Methoden zur Korrektur des Ausleuchtungsprofils	84
5.1.4	Kinetische Untersuchungen	88
5.1.4.1	Differenzierung in der Dissoziationsphase	88
5.1.4.2	Bestimmung kinetischer Konstanten für verschiedene Systeme.....	89
5.1.5	Vom Target-Oligonukleotid zum PCR-Produkt	94
5.1.5.1	Kalibration für ein Target-Oligonukleotid aus dem <i>cytb</i> -Gen.....	94
5.1.5.2	Denaturierungseffekt bei Hybridisierung eines Oligo-Doppelstranges	94
5.1.5.3	Hybridisierung von <i>cytb</i> -PCR-Produkten.....	96
5.1.5.4	Regenerierbarkeit nach Messung von PCR-Produkten.....	97
5.2	Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln	97
5.2.1	Herstellung der <i>cytb</i> -PCR-Produkte	98
5.2.1.1	PCR der Referenz-DNA einzelner Spezies	99
5.2.1.2	Variation der <i>Annealing</i> -Temperatur	100
5.2.1.3	Relative Quantifizierung der PCR-Produkt-Pools.....	101
5.2.1.4	Sequenzierung der PCR-Produkte	103
5.2.1.5	Vergleich der PCR-Effizienzen	104
5.2.1.6	PCR von verschiedenen Mischungen zweier <i>Template</i> -DNAs	106
5.2.1.7	PCR der Validierungs- und Realproben	106
5.2.2	Tierartendifferenzierung durch konventionelle Chiphybridisierung.....	108
5.2.2.1	Spezifität der Sonden	109
5.2.2.2	Variation der Hybridisierungsbedingungen.....	112
5.2.2.3	Test einer alternativen Sonde für Ziege	115
5.2.2.4	Reproduzierbarkeit	116
5.2.2.5	Vergleich der Hybridisierungseffizienzen	118
5.2.2.6	Variation der Inkubationszeit	119
5.2.2.7	Auswirkung des <i>Photobleaching</i> -Effektes	120
5.2.2.8	Analyse verschiedener Mischungen zweier <i>Template</i> -DNAs.....	121
5.2.2.9	Analyse der zur Validierung hergestellten Mischproben	122
5.2.2.10	Analyse der Realproben	124

5.2.3	Tierartendifferenzierung durch Realzeit-Hybridisierung	129
5.2.3.1	Spezifität der Sonden	129
5.2.3.2	Vergleich der Hybridisierungseffizienzen	131
5.2.3.3	Linearität der Kalibration.....	132
5.2.3.4	Hybridisierung von PCR-Produkt-Mischungen	134
5.2.3.5	Verdünnung der <i>Template</i> -DNA	135
5.2.3.6	Vergleich von Cy5-Primer- und Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkten .	136
5.2.3.7	Charakterisierung der asymmetrischen PCR	141
5.2.3.8	Analyse verschiedener Mischungen zweier <i>Template</i> -DNAs	152
5.2.3.9	Analyse der zur Validierung hergestellten Mischproben	153
5.2.3.10	Analyse der Realproben	155
5.3	Detektion von Mikroorganismen durch Realzeit-Hybridisierung	160
5.3.1.1	Charakterisierung von CEL-Glasobjektträgern	161
5.3.1.2	Sondenspezifität bei Standardbedingungen.....	163
5.3.1.3	Variation des Formamidanteils im Hybridisierungspuffer	165
5.3.1.4	Variation des Formamidanteils bei verschiedenen Temperaturen	166
5.3.1.5	Stringentes Waschen zur mismatch-Diskriminierung	168
5.3.1.6	Analyse von PCR-Produkten.....	170
6	Diskussion.....	173
6.1	Grundlagen.....	173
6.2	Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln	186
6.3	Detektion von Mikroorganismen durch Realzeit-Hybridisierung	207
7	Zusammenfassung	215
8	Anhang	219
8.1	Nomenklatur und Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.....	219
8.2	Sequenzvergleich des <i>cytb</i> -Gens verschiedener Spezies	222
8.3	Ergebnisse der Fluoreszenzdetektion am ALFexpress TM Analysesystem	225
8.3.1	Analyse 1	225
8.3.2	Analyse 2	226
9	Literatur	227

Abkürzungen

A	Adenin
AA	Acrylamid
ALF	ALFexpress™ Analysesystem
BA	Bisacrylamid
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (jetzt Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR)
bp	Basenpaar
CCD	<i>charge coupled device</i>
CVUA	Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt
cytb	Cytochrom B
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>Dsh.</i>	<i>Desulfohalobium</i>
<i>Dsm.</i>	<i>Desulfomicrobium</i>
<i>Dsv.</i>	<i>Desulfovibrio</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymimmunoassay (<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>)
EU	Europäische Union
FA	Formamid
GMO	gentechnisch modifizierter Organismus
G	Guanin
H	Huhn
ICB	Institut für Chemo- und Biosensorik
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kb	Kilobasenpaare (= 10 ³ bp)
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LP	Laserleistung (<i>laser power</i>)
MAX	Daten mit Maximumsmethode ausgewertet
M	Mensch
mm	Fehlpaarung (<i>mismatch</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
MW	Mittelwert
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
n.n.	nicht nachgewiesen

nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pf	Pferd
pm	perfekt komplementäre Basenpaarung (<i>perfect-match</i>)
PMT	Lichtdetektor (<i>photomultiplier tube</i>)
PVC	Polyvinylchlorid
P	Pute
PNA	Peptidnukleinsäure (<i>peptide nucleic acid</i>)
R	Rind
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
Sf	Schaf
S	Schwein
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SNP	Punktmutation (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRPs	sulfatreduzierende Prokaryonten
SSC	Citrat gesättigte Kochsalzlösung (<i>saline saturated citrate</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
T	Thymin
UH	Ultrahyb TM
UV	ultraviolett
U	Uracil
VE	vollentsalzt
VK	Variationskoeffizient
Z	Ziege

1 Einleitung

Als Folge der BSE-Krise, häufiger Lebensmittelskandale und einer zunehmenden Verunsicherung der Verbraucher kommt der Lebensmittelanalytik heute eine immer wichtigere Bedeutung zu. Ihre Aufgabe besteht darin, einerseits durch die Bestimmung von Nähr- und Inhaltsstoffen die Lebensmittelqualität und andererseits durch den Nachweis eventueller Schadstoffe und Verunreinigungen die Sicherheit von Verbrauchern und Umwelt zu gewährleisten [1]. In den letzten Jahren wurden in der Lebensmittelanalytik viele traditionelle Analysemethoden durch moderne, zeit- und kostensparende Methoden ersetzt, wobei neben instrumentellen, proteinchemischen und mikrobiologischen Analysemethoden auch verstärkt molekularbiologische Verfahren zum Einsatz gekommen sind, welche die Erbsubstanz Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) in der Probe untersuchen.

Die Lebensmittelanalytik profitiert damit von den enormen Fortschritten, die im Bereich der Nukleinsäure-Analytik in den letzten beiden Jahrzehnten gemacht wurden. Als ein Meilenstein ist die Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) im Jahr 1984 zu nennen [2], weil dadurch sogar der Nachweis einzelner DNA-Moleküle möglich wurde. Zusätzlich zu der PCR kommen zur Analyse einzelner Zielsequenzen oder auch des gesamten DNA-Gehaltes einer Probe noch zahlreiche weitere grundlegende Methoden der Nukleinsäure-Analytik wie z.B. die Gelelektrophorese [3] und der Southern-Blot [4] zum Einsatz. Die Anwendungsbreite der molekularbiologischen Methoden erscheint dabei nahezu unbegrenzt, so spielen sie z.B. auch eine wichtige Rolle in der klinischen Diagnostik, der Veterinärmedizin, der Forensik, der Pharmaforschung, der Umweltanalytik und der Pflanzenzucht. Im Bereich der Lebensmittelanalytik werden die DNA-analytischen Methoden nicht nur zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen (GMOs) und von Mikroorganismen, sondern besonders auch zur Tierartendifferenzierung eingesetzt, weil die dafür traditionell angewendeten proteinchemischen Methoden aufgrund der Verarbeitung der Proben während des Herstellungsprozesses oft sehr fehleranfällig sind. Die bisher in der Routinekontrolle häufig genutzten DNA-analytischen Methoden der tierartspezifischen PCR und des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus [5] können zwar auch auf prozessierte Materialien angewendet werden, in denen der Informationsgehalt der DNA üblicherweise wenigstens zum Teil erhalten bleibt, ermöglichen allerdings nur relativ aufwendig bzw. eingeschränkt den parallelen Nachweis verschiedener Spezies in einer Probe.

Viele moderne Methoden der Nukleinsäure-Analytik kombinieren die Sensitivität der PCR mit der hohen Spezifität der Hybridisierung zwischen zwei komplementären, einzelsträngigen DNA-Sequenzen. Ein besonderes Potential zur simultanen Analyse vieler verschiedener Zielsequenzen bietet die DNA-Chip-Technologie [6], die vor allem durch die Arbeiten der

Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) in den 90er Jahren eine rasante Entwicklung durchlaufen hat. Die Anwendung der DNA-Chip-Methode ist jedoch arbeitsaufwendig und relativ kostenintensiv und empfiehlt sich somit zur Zeit noch eher für die Anwendung in der Forschung aufgrund der sehr hohen Informationsdichte eines einzelnen Experimentes.

Für ausgewählte Fragestellungen der Nukleinsäure-Analytik und den Einsatz in Routineuntersuchungen stellen dagegen DNA-Biosensoren eine sinnvolle Alternative dar, weil sie die Durchführung schneller Hybridisierungsassays ermöglichen. Die Detektion der Wechselwirkung in Realzeit kann dabei einen deutlichen Vorteil gegenüber den zeitaufwendigen konventionellen Methoden zur PCR-Produkt-Analyse, wie z.B. der Polyacrylamidgelelektrophorese, bieten. Für das parallele *Screening* der PCR-Produkte auf mehrere Zielsequenzen empfiehlt sich die Anwendung von kompakten Sensorchipsystemen, die eine simultane Detektion verschiedener Hybridisierungsereignisse ermöglichen und idealerweise aufgrund der Reversibilität der Hybridisierung mehrfach verwendet werden können.

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Anwendung eines Evaneszent-Feld-DNA-Biosensorsystems zur schnellen, zeitaufgelösten Detektion multipler Hybridisierungsereignisse im Hinblick auf verschiedene praktische Fragestellungen zu etablieren. Dazu sollte zunächst in grundlagenorientierten Untersuchungen eine ausführliche Charakterisierung und Optimierung des Sensorsystems durch die Analyse von Wechselwirkungen zwischen Modell-Oligonukleotiden erfolgen und die Tauglichkeit zur Hybridisierung von PCR-Produkten demonstriert werden.

Den Schwerpunkt der Arbeit bildete daraufhin die Entwicklung einer zeitsparenden und sicheren Nachweismethode zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln. Dazu musste im ersten Schritt ein Konsensus-Primerpaar zur Amplifikation eines Teilabschnittes des mitochondrialen *cytb*-Gens der Spezies Rind, Schwein, Huhn, Pute, Schaf und Ziege ausgewählt werden. Bei der Optimierung der PCR-Bedingungen waren besonders eine möglichst ausgeglichene Amplifikationseffizienz für die verschiedenen Spezies und das Verhältnis der amplifizierten Einzelstränge im PCR-Produkt zu berücksichtigen.

Für die simultane Detektion der *cytb*-PCR-Produkte im DNA-Biosensor sollten anschließend speziesspezifische SONDENSEQUENZEN entworfen und auf dem Sensorchip immobilisiert werden, wobei für den Nachweis der verschiedenen Spezies eine vergleichbare Spezifität und Effizienz der Hybridisierung angestrebt wurde. Eine weitere Charakterisierung der Nachweismethode sollte u.a. durch die Demonstration des linearen Messbereiches, die Analyse definierter Mischungen verschiedener Spezies und eine Abschätzung der Nachweisgrenzen erfolgen, bevor die Methode zur Analyse von verschiedenen Fleisch- und Käseproben aus der Routinekontrolle eingesetzt werden sollte. Weil die Detektion im DNA-Biosensor ebenso wie bei der konventionellen Hybridisierung auf DNA-Chips auf einer Fluoreszenzanregung der fluorophormarkierten PCR-Produkte beruht, sollte die Analyse auf konventionellen DNA-Chips mit einem hochauflösenden Mikroarrayscanner hier als Vergleichsmethode angewendet und entsprechend etabliert werden.

In einem weiteren Ansatz sollte der DNA-Biosensor im Bereich der Mikroorganismendetektion zum Nachweis von sulfatreduzierenden Prokaryonten genutzt werden. In grundlegenden Versuchen sollte durch die Hybridisierung von Konsensus-PCR-Produkten des 16S rRNA-Gens einzelner Spezies auf ausgewählten Sonden demonstriert werden, dass das System auch für die Unterscheidung sehr nah verwandter Sequenzen mit nur wenigen Basenfehlpaarungen geeignet ist und aufgrund der integrierten Fluidik eine Feinabstimmung der Stringenz für jede einzelne Sonde erlaubt.

3 Theoretischer Teil

3.1 Nukleinsäure-Analytik

Im Jahr 1944 konnte Avery die Nukleinsäure DNA als Träger der genetischen Erbinformation identifizieren, woraufhin Watson und Crick 1953 die Doppelhelixstruktur der DNA aufklärten. Nachdem damit bereits vor 50 Jahren die Grundsteine zur Entwicklung der Molekularbiologie gelegt worden waren, sind Nukleinsäure-Nachweistechiken zur gezielten Detektion und Analyse spezifischer DNA- oder RNA-Sequenzen hauptsächlich in den letzten 25 Jahren entwickelt und etabliert worden. Für die Medizin und die angrenzenden Biowissenschaften sowie die Lebensmittel- und Umweltanalytik stehen heute eine große Anzahl molekularbiologischer Verfahren zur Verfügung, die von der genetischen Mutationsdiagnostik über die Genexpressionskontrolle z.B. in Tumorgeweben bis hin zu neuartigen gentherapeutischen Ansätzen reichen.

Bei der Analytik von Nukleinsäuren muss grundsätzlich zwischen Untersuchungen auf DNA- und RNA-Ebene differenziert werden. Die DNA-Analytik beschäftigt sich mit dem Nachweis bestimmter Zielsequenzen im Genom eines Organismus, wobei die unterschiedlichsten Fragestellungen behandelt werden können wie etwa die Detektion von Punktmutationen (*single nucleotide polymorphism* (SNP)) [7,8], die Identifizierung und Quantifizierung von GMOs in Lebensmitteln [9] oder der Nachweis bakterieller Infektionen im Blut eines Patienten [10]. Ebenso wichtig ist auch die Sequenzierung von Genen oder ganzen Genomen als Bestandteil der DNA-Analytik [11,12].

Die RNA-Analytik untersucht dagegen in der Regel den Status der Genexpression durch Analyse der gebildeten Boten-RNA (*messenger-RNA* (mRNA)), welche die Information zur Bildung von Proteinen vom Genom zum Ribosom trägt. Neben dieser sog. Transkriptom-Analytik trägt zunehmend auch die Proteom-Analytik zur Bestimmung der durch Translation erhaltenen Proteinverteilung [13] dazu bei, die Regulation von Zellvorgängen in verschiedenen Stadien oder unter Einfluss verschiedener Substanzen zu verstehen [14] und dadurch z.B. neue Wege in der Pharmaforschung zu ermöglichen [15,16].

Im Folgenden werden nach einigen Grundlagen der Nukleinsäure-Analytik als besondere Methoden die DNA-Chip-Technologie und die DNA-Biosensoren erläutert, die in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben. Für den Einsatz beider Methoden spielt die Immobilisierung von DNA-Molekülen auf Glasoberflächen eine entscheidende Rolle, auf die abschließend eingegangen wird. Eine ausführliche Beschreibung der Nukleinsäure-Analytik geben Haberhausen *et al.* [17], Pingoud und Urbanke [18] und Christopoulos [19].

3.1.1 Grundlagen

3.1.1.1 Nukleinsäuren: Struktur und Funktion

Die Nukleinsäuren als Träger der genetischen Information lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen: Desoxyribonukleinsäure (DNA) dient ausschließlich der Informationsspeicherung, während Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, RNA) für die Genexpression und die Proteinbiosynthese von Bedeutung sind. Dementsprechend befindet sich die genomische DNA nahezu ausschließlich in den Chromosomen des Zellkerns von eukaryotischen Zellen, während die RNA sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert ist.

DNA ist ein unverzweigtes, aus Nukleotiden aufgebautes Biopolymer, das eine beträchtliche Länge erreichen kann. Die Grundbausteine der Nukleotide sind phosphorylierte Desoxyribose und eine Nukleinsäure-Base, die in den Desoxyribonukleosid-triphosphaten (dNTPs) über eine N-glykosidische Bindung an das Zuckergerüst gebunden ist. In der DNA kommen die beiden Purin-Basen Adenin (A) und Guanin (G) sowie die Pyrimidin-Basen Cytosin (C) und Thymin (T) vor. Im Unterschied dazu wird in der RNA, die Ribose als Zuckerrest aufweist, der Platz des Thymins von dem strukturell sehr ähnlichen Uracil (U) eingenommen. Die Verknüpfung zum Polymer erfolgt durch Verbrückung der Zuckerreste über die Phosphatgruppen. Die genetische Information eines Organismus ist in der Sequenz der vier Basen gespeichert, wobei der Richtungssinn des gebildeten Einzelstranges entsprechend der ursprünglichen Syntheserichtung vom 5'- zum 3'-Ende vorgegeben ist.

In natürlicher Umgebung liegt DNA in Form einer Doppelhelix vor, in der zwei gegenläufige, komplementäre DNA-Einzelstränge um eine gemeinsame Achse gewunden sind (Abb. 1). Es ergibt sich ein Makromolekül mit polarer und negativ geladener Oberfläche, weil das Zucker-Phosphat-Rückgrat auf der Oberfläche der Helix liegt. Die Wechselwirkung zwischen den komplementären Einzelsträngen beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäure-Basen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin. Aufgrund der verschiedenen Donor- und Akzeptor-Substituenten können sich in A-T-Paaren zwei und in G-C-Paaren drei lineare und damit besonders stabile Wasserstoffbrücken ausbilden.

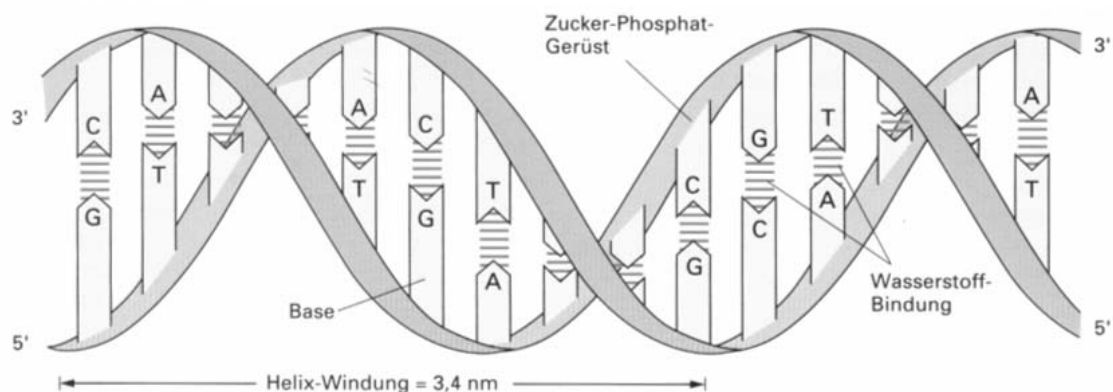


Abb. 1 Schematischer Aufbau einer DNA-Doppelhelix nach Watson-Crick (aus: [20], S. 117)

Als Gene bezeichnet man allgemein funktionelle Abschnitte der DNA, die für vererbare Strukturen oder Funktionen kodieren. Die meisten Gene kodieren für Proteine, unter dem genetischen Code versteht man daher die Beziehung zwischen der Basensequenz der DNA und der Aminosäuresequenz der Proteine. Jedem Aminosäure-Rest entspricht in der DNA ein Codon aus drei aufeinander folgenden Basenpaaren (bp). Um ein Gen zu exprimieren, d.h. das kodierte Protein zu synthetisieren, muss die gespeicherte Information zunächst auf eine Boten-RNA (mRNA) umgeschrieben werden. Diese Transkription erfolgt durch Ablesen des kodierenden DNA-Stranges (auch: *sense*-Strang). Die RNA wird anschließend mehrfach modifiziert und gelangt vom Zellkern zu den Ribosomen, an denen sie während der Translation unter Beteiligung von Transfer-RNA (tRNA) in eine Peptidsequenz übersetzt wird.

Die im Gegensatz zur DNA größtenteils einzelsträngig vorliegende RNA kommt noch in weiteren verschiedenen Typen vor, die in der Zelle variierende Aufgaben übernehmen. Den größten Anteil an der Total-RNA hat die ribosomale RNA (rRNA), die strukturgebender Baustein der Ribosomen ist und selbst auch in verschiedenen Varianten auftritt.

Nicht die gesamte genetische Information einer Eukaryotenzelle wird jedoch von der Chromosomen-DNA des Zellkerns kodiert. Genetische Untersuchungen an Hefe führten 1949 zur Entdeckung eines mitochondrialen Genoms, das sich vom Genom des Zellkerns unterscheidet. Mitochondrien sind bakteriengroße Organellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen in großer Zahl vorkommen. Typisch sind etwa 2000 Mitochondrien pro Zelle. Die menschliche mitochondriale DNA ist eine ringförmige Doppelhelix aus 16569 Basenpaaren, deren Sequenz vollständig aufgeklärt ist [21] (vgl. Anhang Tab. 25). Das Genom kodiert 13 Proteine, 22 tRNAs und zwei rRNAs, die zum großen Teil im Stoffwechsel der Organelle genutzt werden. Die Mitochondrien sind somit auf die Zusammenarbeit zweier unterschiedlicher Genome angewiesen, um ihren Aufbau und ihre Funktion zu gewährleisten [22].

3.1.1.2 Denaturierung und Schmelzpunkt T_m

Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Einzelsträngen der Doppelhelix können durch Erwärmen oder Ionisation der Basen bei Änderung des pH-Wertes ($\text{pH} < 3$ oder $\text{pH} > 10$) leicht reversibel aufgetrennt werden. Man spricht von Denaturieren oder Schmelzen der DNA und bei der entsprechenden Rückreaktion von Renaturierung bzw. *annealing*. Die Schmelztemperatur T_m ist definiert als die Temperatur, bei der die Helixstruktur zur Hälfte verloren gegangen ist. Sie ist für jede doppelsträngige DNA-Sequenz charakteristisch und hängt von verschiedenen Faktoren ab:

- GC-Gehalt: Aufgrund der dreifachen Wasserstoffbrückenbindung einer GC-Paarung ist der T_m -Wert umso größer, je höher der GC-Gehalt ist.

- Länge der Sequenz: Die Stabilität der Doppelhelix und damit der T_m -Wert nehmen im Allgemeinen mit zunehmender Länge der Sequenz aufgrund der steigenden Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zu.
- Salzkonzentration: Monovalente Kationen (wie z.B. Na^+) wirken durch Abschirmung der sich abstoßenden, negativ geladenen Phosphate des Helixrückgrats stabilisierend und erhöhen den T_m -Wert [23].
- Formamidanteil: Formamid destabilisiert die Duplexbildung durch Hemmung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und senkt so den T_m -Wert. Ein zusätzlicher Anteil von 1 % Formamid in der DNA-Lösung erniedrigt T_m um ca. 0.7°C [24].
- pH-Wert: Bei einer deutlichen pH-Wert-Änderung kommt es, wie bereits erwähnt, zu einer Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen durch eine Ionisation der Stickstoffatome in den Nukleinsäurebasen, wodurch der T_m -Wert erniedrigt wird.

Für DNA-Doppelstränge mit einer Länge von weniger als 1000 bp (< 1 kb) lässt sich in einer empirischen Näherung der Schmelzpunkt z.B. abschätzen [23,25,26] nach

$$T_m = [0.41 (\%GC) + 16.6 \log M^+ - 820/n - 0.63 (\%Formamid) + 81.5]^\circ\text{C} \quad (\text{Gl. 1})$$

mit (%GC) als dem prozentualen Anteil von Guanin und Cytosin in der Basensequenz, M^+ als der Konzentration monovalenter Kationen in der DNA-Lösung, n als der Anzahl der hybridisierenden Basenpaare und (%Formamid) als der Formamidkonzentration in Volumenprozent. Für noch längere Doppelstränge entfällt der Term $-820/n$. (Gl. 1) gibt nur ein Beispiel für die zahlreichen ähnlichen in der Literatur beschriebenen Formeln zur Bestimmung des T_m -wertes.

3.1.1.3 Hybridisierung und Stringenz

Das *Annealing* eines DNA-Einzelstranges mit einem komplementären exogenen Oligo- oder Polynukleotid wird Hybridisierung genannt. Die Hybridisierung als sehr spezifische biomolekulare Erkennungsreaktion bildet die Grundlage zahlreicher molekularbiologischer Techniken zur gezielten Detektion, Sequenzierung, Quantifizierung und auch Amplifizierung von Gensequenzen.

Allen Hybridisierungsformaten gemeinsam ist die Detektion der nachzuweisenden DNA-Sequenzen, der DNA-Targets, über die sequenzspezifische Anlagerung von definierten, komplementären DNA-Abschnitten, den DNA-Sonden. Als Sonden kommen käufliche Oligonukleotide, DNA-Fragmente oder PCR-Produkte (vgl. 3.1.1.6) in Betracht. Die Identifizierung erfolgt über die Detektion des markierten Hybrids. Eine klassische Anwendungsmethode dieses Prinzips stellen die Blot-Techniken dar, bei denen das zu analysierende Nukleinsäuregemisch auf eine Membran aufgebracht und mit einer spezifischen, markierten Sonde

inkubiert wird, woraufhin die Detektion des Hybrids autoradiographisch oder heutzutage meist nicht-radioaktiv erfolgt [4]. Auch viele weitere grundlegende Verfahren der Nukleinsäure-Analytik wie die Polymerase-Kettenreaktion (3.1.1.6), die DNA-Chip-Technologie (3.1.3) und DNA-Biosensoren (3.1.2) beruhen auf der Hybridisierungsreaktion.

Die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen beeinflusst die Spezifität der Wechselwirkung zwischen DNA-Sonde und -Target, welche ihrerseits abhängt von der durch den Schmelzpunkt T_m charakterisierten Hybridstabilität (vgl. 3.1.1.2). Dementsprechend hängt die Stringenz der Reaktion u.a. von der Salzkonzentration des Mediums sowie der Konzentration helixdestabilisierender Zusätze wie Formamid ab. Während eine steigende Konzentration monovalenter Kationen den Schmelzpunkt und die Hybridisierungsgeschwindigkeit erhöht und dadurch die Stringenz erniedrigt [23,27], werden durch die Anwesenheit von Formamid der Schmelzpunkt und damit auch die optimale Hybridisierungstemperatur herabgesetzt [24]. Bei definierter Formamidkonzentration und Ionenstärke der Lösung ist die Temperatur für die Stringenz ausschlaggebend. Je höher die Temperatur gewählt und damit dem T_m -Wert angenähert wird, desto stringenter werden die Reaktionsbedingungen und umso geringer wird die Zahl der tolerierten Basenfehlpaarungen (*mismatches*), während zunehmend nur noch perfekt komplementäre (*perfect-match*) Sequenzen hybridisieren. Eine einzelne Basenfehlpaarung innerhalb eines Hybrids kann eine Erniedrigung der Schmelztemperatur von bis zu 5°C zur Folge haben. Durch Hybridisierung bei hoher Stringenz kann sogar die Differenzierung einzelner Basenfehlpaarungen (SNPs) realisiert werden [28,29].

Die Hybridisierung kann aber nicht nur über die Ionenstärke, die Temperatur und die Zugabe helixdestabilisierender Agenzien beeinflusst werden. Es hat sich außerdem gezeigt, dass die Geschwindigkeit der Wechselwirkung durch eine Zugabe von Polymeren wie z.B. Polyethylenglykol [30] beschleunigt werden kann, da diese dem Medium Wasser entziehen und dadurch die effektive Nukleinsäure-Konzentration erhöhen.

3.1.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Eine Standardmethode zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren oberhalb von ca. 0.5 µg/ml ist die photometrische Analyse bei 260 nm, wo aufgrund der aromatischen Ringsysteme der Nukleinsäure-Basen ein charakteristisches Absorptionsmaximum auftritt. Dabei sorgt der hyperchrome Effekt dafür, dass die Absorption nicht-basengepaarter Nukleinsäuren größer ist als die von dsDNA. Als Faustregel gilt daher, dass bei 260 nm eine optische Dichte (OD) von OD = 1 einer Konzentration an dsDNA von 50 µg/ml entspricht, während derselbe Wert von einzelsträngiger DNA (ssDNA) bereits bei einer Konzentration von 40 µg/ml und von RNA sogar schon bei 33 µg/ml erreicht wird [18]. Für Oligonukleotide mit bekannter Sequenz können die Konzentrationen genauer mit Hilfe der jeweiligen

Extinktionskoeffizienten ermittelt werden, die sich z.B. mit Hilfe des *Oligonucleotide Properties Calculators* (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) bestimmen lassen.

3.1.1.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Eine wichtige Methode zur Analyse von Nukleinsäuregemischen und zur Größenabschätzung von DNA-Molekülen ist die Elektrophorese. Diese Trennmethode beruht auf der Wanderung der negativ geladenen DNA-Stränge zur Anode eines elektrischen Feldes, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren maßgeblich von der Länge der Moleküle abhängt. Das Verfahren wird innerhalb eines festen Trägermaterials durchgeführt, normalerweise in Gelen aus Agarose oder Polyacrylamid.

Die Entscheidung für eines der Trägermaterialien fällt hauptsächlich aufgrund von Art und Größe der zu analysierenden Nukleinsäure. Agarosegele verfügen im Vergleich zu den Polyacrylamidgelen über ein tendenziell weitmaschigeres Polymernetz. Dadurch sind Polyacrylamidgele die bessere Alternative für die Auftrennung von DNA-Molekülen mit einer Länge von unter 1000 bp, wobei die Monomerkonzentration und der Vernetzungsgrad zur Anpassung des Auftrennungsbereiches variiert werden können. Soll gezielt ssDNA analysiert werden, verwendet man denaturierende Gele, denen z.B. Harnstoff zugesetzt ist, um partiell doppelsträngige Strukturen aufzulösen.

Als wichtiges Hilfsmittel zur Charakterisierung der Molekülgrößen werden neben der zu untersuchenden Probe auch Längenstandards auf dem Gel mit aufgetrennt. Diese enthalten DNA-Fragmente mit genau definierten Größen und können so zur Größenbestimmung der DNA-Stränge in der Probe herangezogen werden. Der Nachweis der DNA in Agarose- bzw. Polyacrylamidgelen erfolgt üblicherweise durch Ethidiumbromid, einer planaren, aromatischen Verbindung, die zwischen die Basenpaare der dsDNA interkaliert und erst in diesem Zustand im nahen ultra-violetten Bereich des Lichtes sehr stark fluoresziert. Mit Ethidiumbromid kann dsDNA in Mengen von wenigen ng nachgewiesen werden, für einzelsträngige DNA oder RNA ist die Empfindlichkeit dagegen deutlich geringer. Auf der Fähigkeit des Ethidiumbromids zur Interkalation in die Doppelhelix der DNA beruht auch seine stark kanzerogene Wirkung. Einen Überblick über die Gelelektrophorese von Nukleinsäuren geben Ogden und Adams [3].

3.1.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

i) Allgemeines Prinzip

Die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kary Mullis im Jahr 1984 hat die Molekularbiologie revolutioniert und ermöglicht seitdem die spezifische Vermehrung auch geringster Mengen einer nachzuweisenden DNA-Sequenz [2]. Die Reaktion beruht auf dem

Prinzip der DNA-Replikation in der Zelle und nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, entlang einer einzelsträngigen DNA-Matrize den komplementären Gegenstrang zu synthetisieren. Ausgangspunkt der PCR ist das DNA-*Template*, von dem eine bestimmte Teilsequenz amplifiziert werden soll. Diese wird begrenzt durch zwei kurze Oligonukleotide bekannter Sequenz, die Primer, von denen nach Denaturierung der *Template*-DNA der *forward*-Primer am *sense*- und der *reverse*-Primer am *antisense*-Strang des *Templates* hybridisieren. Die Polymerase synthetisiert dann durch sequenzspezifischen Einbau der vier Nukleotidbausteine entlang der *Template*-Einzelstränge die komplementären DNA-Stränge neu.

Wie in Abb. 2 skizziert, läuft die Reaktion zyklisch ab, wobei in jedem Zyklus ein Temperaturprofil aus drei Teilschritten durchlaufen wird. Zur Denaturierung der DNA-Doppelhelix wird der Reaktionsansatz zunächst auf 94°C erhitzt. Während des zweiten Schrittes, dem *annealing*, erfolgt bei Temperaturen zwischen 50-65°C die Anlagerung der Primer an die beiden Einzelstränge. Damit beide Hybridisierungen mit ähnlicher Geschwindigkeit ablaufen, wählt man die Primersequenzen so aus, dass die gebildeten Hybride einen möglichst ähnlichen T_m -Wert haben. Je stärker die *Annealing*-Temperatur dem T_m -Wert angenähert wird, desto geringer wird die Effizienz der PCR, wobei das *Annealing* üblicherweise bei einer Temperatur von etwa 2-5°C unterhalb des T_m -wertes erfolgt, um eine ausreichende Spezifität der Primerbindung zu gewährleisten. Im dritten Schritt ergeben sich dann während der Elongation bei einer Temperatur von 72°C optimale Bedingungen für die Polymerisation durch die häufig verwendete thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Die gebildeten Amplifikate können dann im nächsten Zyklus selbst als Matrize dienen.

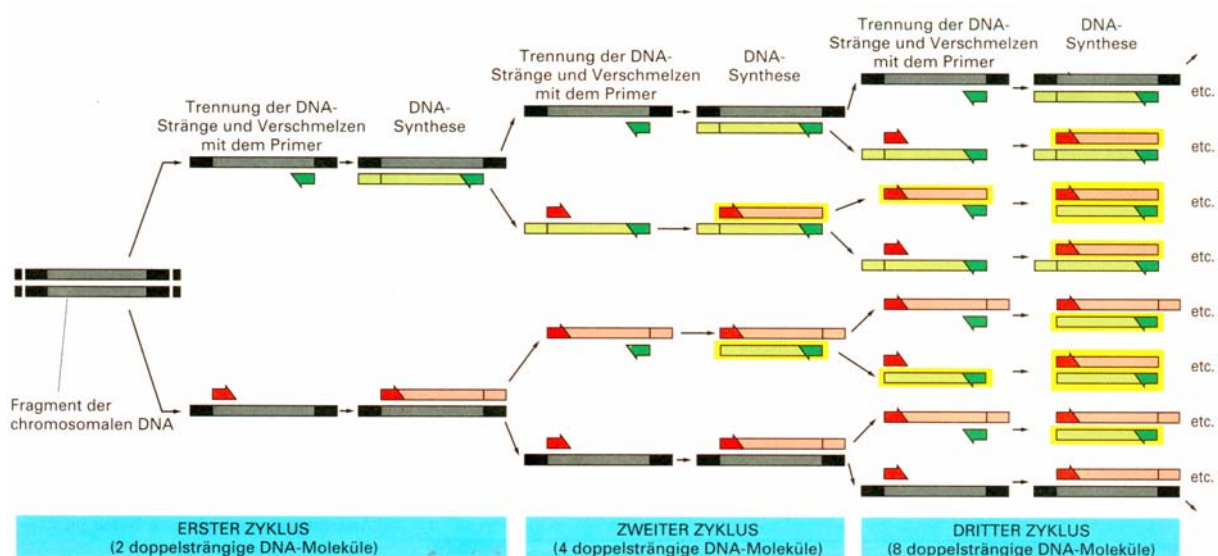


Abb. 2 Schematischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (aus: [20], S. 372)

Nach diesem Reaktionsschema wird eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht, wobei im Idealfall, ausgehend von einem einzigen *Template*-Molekül, nach n Zyklen 2^n Amplifikate vorliegen. In der Realität wird eine hundertprozentige Ausbeute jedoch durch verschiedene Faktoren verhindert. Einerseits nimmt die Aktivität des Enzyms trotz der Thermostabilität mit zunehmender Reaktionsdauer ab, andererseits akkumulieren während der Reaktion Nebenprodukte wie z.B. Pyrophosphat, die die Reaktion hemmen, und schließlich konkurriert das *Re-Annealing* der denaturierten Einzelstränge aus den doppelsträngigen Reaktionsprodukten mit der Bindung der Primer. Außerdem nimmt die Konzentration der Primer sowie der dNTPs ab [31]. Als Summe dieser Effekte sinkt die Amplifikationseffizienz, bis in der Plateauphase die PCR langsam zum Erliegen kommt (Abb. 3). Aufgrund des exponentiellen Charakters der Reaktion können sich bereits leicht unterschiedliche Zusammensetzungen verschiedener Proben zu deutlichen Abweichungen in der Amplifikationseffizienz auswirken, weshalb die PCR in erster Linie ein qualitatives Verfahren zum spezifischen Nachweis von DNA ist [18].

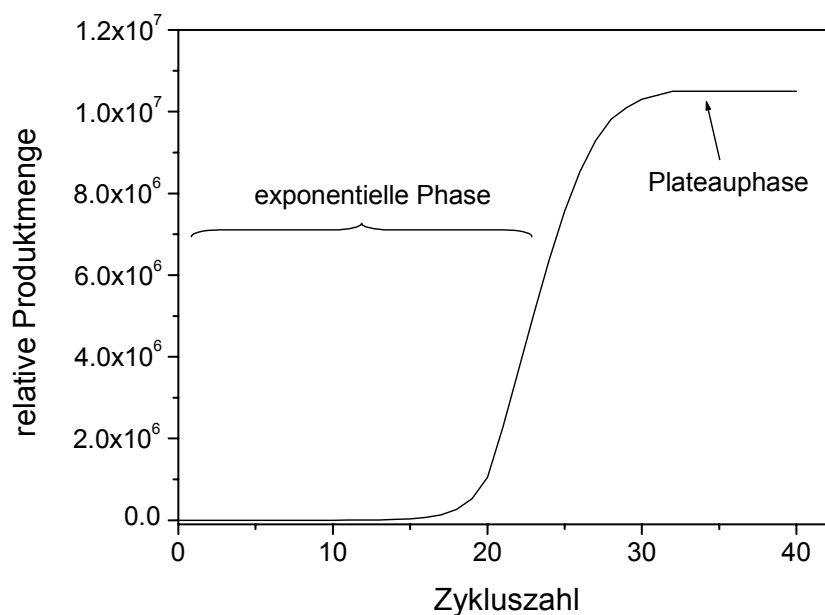


Abb. 3 Zusammenhang zwischen Zykluszahl und relativer Produktmenge bei der Polymerase-Kettenreaktion

Bei der PCR bieten sich grundsätzlich zwei verschiedene Methoden für die Synthese markierter DNA-Amplifikate, und zwar können z.B. fluoreszierende oder radioaktive Markermoleküle entweder durch den Einsatz eines markierten Primers oder durch den Einbau markierter dNTPs erhalten werden. Häufig werden auch biotinylierte Primer zur Herstellung von DNA-Sonden oder Primer mit einer Fremdsequenz am 5'-Ende als Ausgangspunkt für eine spätere Klonierung der amplifizierten DNA verwendet.

ii) Spezielle PCR-Techniken

Im Folgenden werden die Grundzüge verschiedener Varianten der PCR erläutert, die mit dieser Arbeit in Zusammenhang stehen. Sollen in einer Probe simultan mehrere verschiedene Zielsequenzen amplifiziert werden, stehen dazu grundsätzlich zwei verschiedene Methoden zur Verfügung. Bei bestimmten Fragestellungen ist es möglich, die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte bewusst so zu wählen, dass sie im Bereich der Primerbindungsstellen identische Sequenzen aufweisen, so dass die Amplifikation aller Zielsequenzen mit Hilfe eines einzelnen, universellen Primerpaares erfolgen kann. Dadurch ergibt sich der Vorteil, dass die verschiedenen PCR-Produkte mit derselben Amplifikationseffizienz gebildet werden. In diesem Fall spricht man von einer Konsensus-PCR. Eine größere Flexibilität hinsichtlich der Auswahl der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte bietet die Multiplex-PCR, bei der mit Hilfe von mehreren spezifischen Primerpaaren ebenso viele verschiedene Amplikons generiert werden können. Eine einheitliche Amplifikationseffizienz für alle Zielsequenzen lässt sich dabei allerdings auch bei einem gezielten Primerdesign und möglichst ähnlichen Primereigenschaften meist nur mit großem Aufwand erzielen. Außerdem führt die hohe Komplexität der Gesamtreaktion häufig umso mehr zu unspezifischen Amplifikationen oder gegenseitiger Beeinflussung, je größer die Zahl der eingesetzten Primerpaare ist. Sowohl die Multiplex- als auch die Konsensus-PCR sind aufgrund der relativ hohen Informationsdichte bei vergleichsweise niedrigem Arbeitsaufwand besonders geeignet für routinediagnostische Fragestellungen. Sie finden daher z.B. Anwendung beim Nachweis von Mikroorganismen in klinischen Proben, so konnten von Minjolle *et al.* [32] in der zerebrospinalen Flüssigkeit von Patienten mit Hilfe von Konsensus-Primern sehr sensitiv sechs verschiedene Typen des Herpesvirus nachgewiesen werden, während Meng *et al.* [33] eine Multiplex-PCR zur simultanen Detektion von HIV-1- (*human immunodeficiency type 1*), Hepatitis B- und Hepatitis C-Virus in Serum entwickelt haben.

Von einer asymmetrischen PCR spricht man, wenn einer der beiden Primer im Überschuss vorliegt. Je nach dem gewählten Konzentrationsverhältnis der Primer erfolgt dabei üblicherweise während der ersten Zyklen noch eine Synthese von dsDNA bei exponentieller Vermehrung. Wenn der Primer mit geringerer Ausgangskonzentration verbraucht ist, synthetisiert die Polymerase mit Hilfe des überschüssigen Primers im weiteren Verlauf der Reaktion einen Überschuss des korrespondierenden Einzelstranges. Die Anreicherung erfolgt dann allerdings nur noch linear. Die Zahl der PCR-Zyklen und das Ausmaß des Unterschiedes der Primerkonzentrationen zu Beginn der Reaktion haben dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute an einzelsträngigem PCR-Produkt, das dann ohne zusätzliche Denaturierung in einer anschließenden Hybridisierungsreaktion mit einer markierten Sonde (vgl. 3.1.1.3) detektiert werden kann. Eine asymmetrische Produktverteilung von *sense*- und *antisense*-Strang kann auch dadurch erreicht werden, dass die Bindungs-

eigenschaften beider Primer über den GC-Gehalt und den T_m -Wert bewusst unterschiedlich gewählt werden, so dass z.B. bei entsprechend angepasster *Annealing*-Temperatur die Hybridisierung des *reverse*-Primers bevorzugt erfolgt und dadurch der *antisense*-Strang im Überschuss gebildet wird.

Eine spezielle Anwendung findet die Methode der asymmetrischen PCR bei der Didesoxysequenzierung von DNA nach Gyllensten und Erlich [34]. Nachdem die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte mit Hilfe der PCR amplifiziert und überschüssige Primer und dNTPs abgetrennt worden sind, werden dabei während des *Cycle Sequencings* mit Hilfe der *Taq*-Polymerase und einem einzigen Primer, der die Startstelle für die Sequenzierung definiert, parallel vier verschiedene Polymerisationsreaktionen durchgeführt, bei denen neben den dNTPs die Abbruchnukleotide Didesoxy-GTP (ddGTP), ddATP, ddTTP bzw. ddCTP zugegeben werden. Durch statistischen Einbau der ddNTPs werden basenspezifisch terminierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge synthetisiert, die in einer anschließenden Gelelektrophorese ein spezifisches Bandenmuster erzeugen, das zur Rekonstruktion der Basenfolge dient. Die DNA-Fragmente können mittels Radioaktivitäts-, Fluoreszenz- oder Lumineszenzdetektion im Gel nachgewiesen werden und die Markierung kann über den Primer oder die ddNTPs eingeführt werden.

3.1.2 DNA-Biosensoren

3.1.2.1 Definition und Überblick

Biosensoren beruhen auf der direkten räumlichen Kopplung einer selektiven biologischen Komponente mit einem physikalischen Transducer [35,36]. Während auf der biologischen Komponente die spezifische Stofferkennung basiert, wandelt der Transducer die bei der Erkennung des Analyten entstehenden chemischen oder physikalischen Veränderungen in ein elektrisches Signal um und bestimmt dadurch maßgeblich die Sensitivität des Biosensors. Als biologische Komponente können Enzyme, Antikörper, Nukleinsäuren, Rezeptoren, Mikroorganismen und sogar ganze Zellen eingesetzt werden, wobei Enzymsensoren in der Vergangenheit sowohl in der Forschung als auch im Bereich der Produktentwicklung den Schwerpunkt gebildet haben. Als wichtigste Transducer stehen optische, elektrochemische, piezoelektrische und akustische Erfassungssysteme zur Verfügung. Der besondere Vorteil von Biosensoren liegt darin, dass die Wechselwirkung mit dem Analyten reversibel ist und der Sensor dadurch regenerierbar und mehrfach verwendbar ist. Gegenüber klassischen Analysemethoden zeichnen sich Biosensoren in vielen Fällen auch durch die einfache Handhabung, deutlich kürzere Messzeiten, geringere Anschaffungs- und Betriebskosten sowie einen minimalen Platzbedarf aus.

DNA-Biosensoren beruhen auf der spezifischen Hybridisierung zwischen komplementären DNA-Einzelsträngen und ermöglichen den Nachweis der Bindungsreaktion. Einzelsträngige Sondenoligonukleotide werden dazu auf der Transduceroberfläche immobilisiert und hybridisieren mit den komplementären Targetsequenzen in der Probenlösung. Erst in den letzten zehn Jahren sind die Anstrengungen zur Entwicklung von DNA-Biosensoren verstärkt worden, weshalb die bestehenden Systeme bisher nur zu Forschungszwecken eingesetzt werden.

Besonders bevorzugt werden in DNA-Biosensoren optische Transducer eingesetzt, von denen viele auf der Nutzung des Phänomens der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) und des evaneszenten Feldes beruhen (vgl. 3.1.2.2). Neben den optischen spielen in der Nukleinsäureanalytik auch die elektrochemischen Transducer eine wichtige Rolle, mit denen potentiometrische [37], voltametrische [38] und auch amperometrische [39] Nachweismethoden entwickelt worden sind. Die Sondenoligonukleotide können dabei auf unterschiedlichen Elektrodenmaterialien immobilisiert werden und für die Generierung des elektrischen Signals zur Detektion des Hybridisierungsereignisses stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung. Als Markierung dienen entweder elektroaktive Liganden, die zwischen die gebildete Duplex-DNA interkalieren, [38] oder Enzyme (z.B. Peroxidasen), die Reaktionen elektroaktiver Substrate (z.B. H_2O_2) katalysieren [39]. Bei Immobilisierung Inosin-substituierter Sondenoligonukleotide kann dagegen aufgrund der Detektion des Guanin-Signals nach Hybridisierung mit dem Target auf eine Markierung verzichtet werden [37,40]. Markierungsfreie Messungen ermöglichen neben verschiedenen optischen DNA-Biosensorsystemen auch die aufgrund von Sensitivitätsdefiziten im Vergleich zu den anderen Transducertypen seltener verwendeten piezoelektrischen Methoden wie die Quarzmikrowaage (*quartz crystal microbalance*, QCM), welche die Masseänderung nach Hybridisierung auf der Sensoroberfläche durch Frequenzänderungen nachweisen [41,42]. Einen Überblick über die bisherigen Arbeiten im Bereich der DNA-Biosensoren geben Bier und Fürste [43] sowie Vercootere und Akeson [44].

3.1.2.2 Evaneszent-Feld-DNA-Biosensoren

Evaneszent-Feld-Biosensoren gehören zur Gruppe der optischen Biosensoren, die auf dem Phänomen der evaneszierenden Welle basieren. Evaneszierende Wellen treten bei der totalen internen Lichtreflexion an Grenzflächen von Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes auf (vgl. 4.5.1). Evaneszent-Feld-Biosensoren ermöglichen die Detektion einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung in Realzeit. Dabei unterscheidet man zwischen direkt-optischen Biosensorsystemen, welche die Wechselwirkung ohne Einführung einer Mar-

kierung detektieren, und Systemen, die das evaneszente Feld zur Anregung gebundener fluoreszenzmarkierter Liganden nutzen.

Das gemeinsame Detektionsprinzip aller direktoptischen Sensoren ist die sensitive Bestimmung von Änderungen des Brechungsindex auf der sensitiven Oberfläche, die durch Bindung der Analytmoleküle an die immobilisierten Detektormoleküle hervorgerufen werden. Häufige Anwendung findet in diesem Bereich das SPR-System von BIACore (Uppsala, Schweden), mit dem bereits zahlreiche DNA-analytische Fragestellungen bearbeitet worden sind [45-53]. Erste Veröffentlichungen beschrieben dabei vor allem Wechselwirkungen von Modell-Oligonukleotiden [45-48], so zeigten z.B. Persson *et al.* [47] Ergebnisse zum Nachweis von Punktmutationen in kurzen Oligonukleotidsequenzen, um den Nutzen des Sensorsystems für die medizinische Diagnostik zu demonstrieren. Eine größere praktische Relevanz zeigen dagegen Untersuchungen an PCR-Produkten, die mittlerweile von verschiedenen Gruppen durchgeführt worden sind [49-53]. Feriotta *et al.* [53] konnten z.B. durch Detektion asymmetrischer PCR-Produkte aus Roundup-Ready-Soja die Tauglichkeit des Sensors zum Nachweis von GMOs verdeutlichen. Während im Bereich der SPR-Sensoren das Ziel der technischen Entwicklung eine simultane Detektion verschiedener Hybridisierungsereignisse ist [54], stehen mit dem *Resonant Mirror* [55-57] und dem Gitterkoppler [58-60] zwei weitere kommerzialisierte Evaneszent-Feld-Biosensoren zur markierungsfreien Detektion im Bereich der DNA-Analytik zur Verfügung.

Der Nachweis der biomolekularen Erkennungsreaktion durch Anregung von Fluoreszenzmarkern im evaneszenten Feld erlaubt grundsätzlich im Vergleich zu den direktoptischen Methoden eine höhere Sensitivität. Üblicherweise wird dabei die nachzuweisende Target-DNA fluorophormarkiert und erst nach Hybridisierung mit der immobilisierten komplementären SONDENSEQUENZ auf der Transduceroberfläche zur Fluoreszenz angeregt, die dann ein Maß für die Menge der gebundenen Targetmoleküle ist. Möglich ist aber auch der Nachweis der gebildeten Hybride durch Interkalation von Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. Ethidiumbromid [61,62] oder durch Einsatz fluorophormarkierter Sonden, sog. *Molecular Beacons*, die aufgrund von Sekundärstrukturen erst nach der Hybridisierung ein Fluoreszenzsignal erzeugen [63,64]. Unabhängig von der Markierungsmethode werden dabei bevorzugt Fluorophore mit Fluoreszenzmaximum im nahen Infrarotbereich (*near infrared (NIR) fluorophors*) eingesetzt, da in diesem Bereich im Allgemeinen wenig Eigenfluoreszenz der Probenmatrix beobachtet wird.

Für die Fluoreszenzdetektion im evaneszenten Feld werden in DNA-Biosensoren entweder planare Wellenleiter im Chipformat [65-70] oder faseroptische Transducer [61-63,71-73] in Kombination mit CCD(*charge coupled device*)-Kameras oder Photomultipliern eingesetzt. Mit den bisher in der Literatur beschriebenen faseroptischen DNA-Biosensoren wurden allerdings überwiegend nur grundlegende Untersuchungen zur Methodencharakterisierung an-

hand einzelner Modellhybridisierungen durchgeführt, während sich für die meisten praktischen Anwendungen eher planare Systeme anbieten, welche die simultane Detektion verschiedener Targetsequenzen ermöglichen. Die Detektion der Fluoreszenz in einem planaren System mit einem Durchflusssensorchip aus Kunststoff wurde am Institut für Chemo- und Biosensorik (ICB, Münster) entwickelt und ist sowohl für immun- [74,75] als auch für DNA-analytische [76-78] Fragestellungen angewendet worden. In dem als Einwegartikel konzipierten, kostengünstigen Sensorchip können verschiedene Hybridisierungsereignisse mittels eines Photomultipliers simultan detektiert werden und im Rahmen von Modellversuchen zum Nachweis von GMOs [76] sowie zur Identifizierung von Mikroorganismen [77] konnten PCR-Produkte erfolgreich detektiert werden. Auf Basis desselben Messprinzips wurde am ICB ein weiterer Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor entwickelt [79], der die Fluoreszenz auf einer sensitiven Glasoberfläche mittels einer CCD-Kamera detektiert und bei den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen eingesetzt wurde.

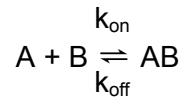
Weil in Evaneszent-Feld-DNA-Biosensoren grundsätzlich eine Analyse der Hybridisierung auf Oberflächen in Realzeit erfolgt, erlauben sie Untersuchungen zur Charakterisierung der Reaktionskinetik während Assoziationsphase, Gleichgewicht und Dissoziationsphase der Bindungsreaktion. Sowohl mit direktoptischen [45,59,80] als auch mit fluoreszenzbasierten Systemen [68-70] sind deshalb schon für verschiedene Oligonukleotid-Wechselwirkungen die kinetischen Parameter bestimmt worden, wobei demonstriert werden konnte, dass sich bereits einzelne Basenfehlpaarungen auf die verschiedenen Phasen der Bindungsreaktion auswirken. Ein umfassendes theoretisches Modell heterogener Hybridisierungskinetiken zur Vorhersage der kinetischen Parameter unter bestimmten Voraussetzungen und als Unterstützung bei der Entwicklung optimierter Sensorchips wurde von Erickson *et al.* [81] entwickelt und durch experimentelle Daten bestätigt.

3.1.2.3 Kinetische Grundlagen des DNA-Biosensors

Durch die folgenden Betrachtungen werden die grundlegenden Zusammenhänge zur Bestimmung der kinetischen Parameter mit dem in dieser Arbeit verwendeten DNA-Biosensorsystem beschrieben, wobei die hier dargestellten kinetischen Zusammenhänge allgemein für ein beliebiges Rezeptor-/Ligand-System gelten. Eine ausführliche Darstellung der kinetischen und mathematischen Grundlagen findet sich bei O'Shannessy [82].

In einem Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor wird die Wechselwirkung zwischen einer immobilisierten Fangsonde und einem komplementären, markierten Targetmolekül in Lösung beobachtet. Bei einem kontinuierlichen Fluss der Targetlösung über die sensitive Fläche bleibt die Konzentration an freiem Analyten über die Zeit konstant. Das Detektionssignal R (response) wird dabei hervorgerufen durch die Anbindung der Targetmoleküle auf der

sensitiven Oberfläche des Sensors und dokumentiert die Wechselwirkung in Realzeit. Die reversible Wechselwirkung zwischen den immobilisierten Fangsondemolekülen B und den gelösten Targetmolekülen A lässt sich mit den Geschwindigkeitskonstanten k_{on} für die Assoziation und k_{off} für die Dissoziation beschreiben:



Für die Geschwindigkeit der Bildung des Produktes AB gilt generell:

$$d[AB]/dt = k_{on}[A][B] - k_{off}[AB] \quad (\text{Gl. 2})$$

Nach einer Reaktionszeit t ist bereits eine bestimmte Anzahl der Rezeptorpositionen auf der Oberfläche belegt und es gilt: $[B] = [B]_0 - [AB]$. Aus (Gl. 2) ergibt sich:

$$d[AB]/dt = k_{on}[A]([B]_0 - [AB]) - k_{off}[AB], \quad (\text{Gl. 3})$$

wobei $[B]_0$ die anfängliche Konzentration der Sondenmoleküle B ist.

Das detektierte Signal R ist proportional zu der Anzahl der gebildeten AB-Komplexe auf der Oberfläche. Dieselbe Proportionalität besteht auch zwischen dem maximal erreichbaren Signal R_{max} und der Anfangskonzentration der freien Fangsondemoleküle $[B]_0$.

Damit ergibt sich aus (Gl. 3):

$$dR/dt = k_{on}c(R_{max} - R) - k_{off}R \quad (\text{Gl. 4})$$

Hier ist dR/dt die zeitliche Änderung des gemessenen Signals, c die aufgrund der Durchflussmessung konstante Konzentration des Targetmoleküls und $(R_{max}-R)$ äquivalent zur Anzahl der freien Oberflächenbindungsstellen zum Zeitpunkt t .

Betrachtet man nun lediglich die Anfangsphase der Hybridisierungsreaktion, kann der Dissoziationsschritt vernachlässigt werden, womit der Term $-k_{off}R$ aus (Gl. 4) entfällt. Besteht weiterhin ein großer Überschuss an immobilisierten Rezeptormolekülen, gilt außerdem: $R_{max} \gg R$ und dementsprechend $R_{max} - R \approx R_{max}$. (Gl. 4) vereinfacht sich daher zu:

$$dR/dt = k_{on}cR_{max} \quad (\text{Gl. 5})$$

Durch Intergration von $t = 0$ bis t erhält man mit R_0 als Hintergrundsignal:

$$R(t) = k_{on}cR_{max} \cdot t + R_0 \quad (\text{Gl. 6})$$

Da innerhalb einer Messung k_{on} , R_{max} und c konstant sind, besteht im Anfangsbereich der Messung (Abb. 4) ein linearer Zusammenhang zwischen dem aufgenommenen Meßsignal und der Zeit t .

Wird die Wechselwirkung zwischen den Sonden- und Targetmolekülen über die Anfangsphase hinaus beobachtet, erreicht das Detektionssignal nach einer Weile ein Sättigungsniveau R_{eq} (Abb. 4), bei dem sich auf der Oberfläche ein Gleichgewicht eingestellt hat zwischen gelösten und gebundenen Targetmolekülen. Dieser Gleichgewichtszustand wird beschrieben durch die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation K_D :

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (\text{Gl. 7})$$

Nach Erreichen des Sättigungsniveaus ändert sich das Signal nicht mehr, aus (Gl. 4) erhält man mit $R = R_{eq}$:

$$dR/dt = 0 = k_{on}c(R_{max} - R_{eq}) - k_{off}R_{eq}$$

Durch Auflösen nach R_{eq} erhält man:

$$R_{eq} = \frac{R_{max} * c}{K_D + c} \quad (\text{Gl. 8})$$

Das Signal im Gleichgewicht R_{eq} ist dabei umso höher, je größer die Targetkonzentration gewählt wird und nähert sich für $c \rightarrow \infty$ dem Wert von R_{max} an. Die Größe des R_{eq} -Wertes verhält sich nach (Gl. 8) umgekehrt proportional zur Größe von K_D , d.h. dass schwache Wechselwirkungen mit einer entsprechend großen Dissoziationskonstante nur ein relativ niedriges Sättigungsniveau erreichen und umgekehrt.

Die Dissoziationsphase der Hybridisierung kann bei Durchfluss von reinem Puffer beobachtet werden. Wenn die Rückbindung bereits abgelöster Targetmoleküle wie z.B. bei Gotoh *et al.* [45] vernachlässigt werden kann, ergibt sich eine Reaktion 1. Ordnung mit:

$$dR/dt = -k_{off}R \quad (\text{Gl. 9})$$

Durch Integration erhält man

$$\ln \left[\frac{R(t_D)}{R(t)} \right] = k_{off}(t - t_D) \quad (\text{Gl. 10})$$

mit t_D dem Zeitpunkt des Beginns der Dissoziation und $R(t_D)$ dem relativen Detektionssignal zum Zeitpunkt t_D . Unter Berücksichtigung des Basissignals R_0' , das sich für $t \rightarrow \infty$ in reinem Hybridisierungspuffer ergibt mit $R_0' = R_0$ unter idealen Bedingungen, lässt sich der exponentiell abnehmende Signalverlauf $R_D(t)$ (Abb. 4) während der Dissoziation folgendermaßen beschreiben:

$$R_D(t) = R_0' + R(t_D) \exp(-k_{off}(t-t_D)) \quad (\text{Gl. 11})$$

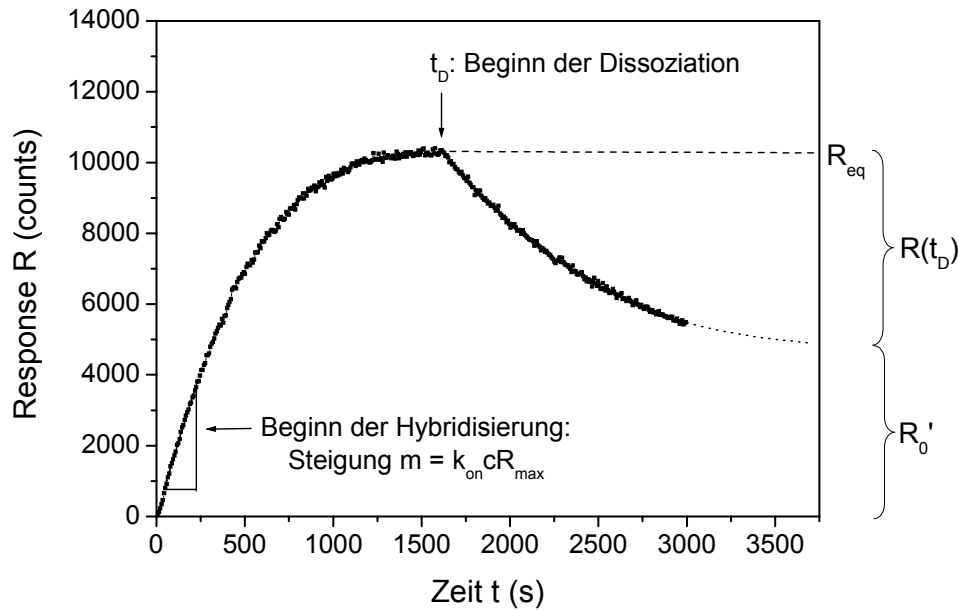


Abb. 4 Bindungskinetik mit Assoziation, Gleichgewicht und Dissoziation für die Hybridisierung einer Targetsequenz mit der immobilisierten Fangsonde im DNA-Biosensor

3.1.3 DNA-Chip-Technologie

Eine besonders starke Entwicklung hat in den letzten zehn Jahren im Bereich der DNA-Chip-Technologie stattgefunden, die heute neben der PCR einen wesentlichen Baustein der modernen Nukleinsäureanalytik darstellt. Unter DNA-Chips oder DNA-Mikroarrays versteht man miniaturisierte Träger, auf deren Oberfläche DNA-Moleküle bekannter Sequenz als Fangsonden in einem geordneten Raster (*array*) in hoher Dichte immobilisiert werden. Die Sonden werden während einer längeren Inkubationsphase mit komplementärer, fluorophormarkierter Target-DNA aus der Probenlösung hybridisiert und nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Targetmoleküle wird die angebundene Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzscanner detektiert. Das resultierende Signalmuster erlaubt Aussagen bezüglich der in der Probe vorhandenen DNA-Sequenzen. In dieser Arbeit wird die DNA-Chip-Methode auch als „konventionelle Chip hybridisierung“ bezeichnet, bei der man im Unterschied zu DNA-Biosensoren die Hybridisierung nur über eine Endpunktsbestimmung charakterisieren kann.

Einzelne DNA-Chip-Experimente liefern meist eine sehr hohe Informationsdichte, weil üblicherweise *high-density*-Mikroarrays verwendet werden, bei denen zwischen mehreren hundert und bis zu vielen tausend verschiedene SONDENSEQUENZEN immobilisiert werden. *Low-density*-Arrays mit bis zu wenigen hundert immobilisierten Sonden werden dagegen dann eingesetzt, wenn bei gezielten Fragestellungen nur besonders aussagekräftige Sequenzen nachgewiesen werden sollen.

Bei der Anwendung von DNA-Chips in den unterschiedlichsten Aufgabenbereichen werden mit der Genexpressionsanalyse einerseits und dem Nachweis von SNPs andererseits grundsätzlich zwei verschiedene Arten der Analyse durchgeführt. Für die Genexpressionsanalyse sind DNA-Chips ganz besonders geeignet, weil sie eine quantitative Aussage über das Expressionsniveau der Gene eines gesamten Genoms in einem Arbeitsgang ermöglichen [83]. Durch Markierung der DNA aus zwei verschiedenen Gewebeproben mit unterschiedlichen Fluorophoren wird dabei eine differentielle Expressionsanalyse möglich, die einen Vergleich der Transkriptionsaktivität individueller Gene erlaubt und auch Rückschlüsse zulässt auf die Wirkung von externen Parametern auf die zelluläre Genexpression. So gelingt z.B. in der Krebsforschung durch einen systematischen Vergleich von zahlreichen gesunden und kranken Gewebeproben eine Tumorklassifizierung [84,85] und ein Teilbereich der Pharmakogenomik versucht, durch die Untersuchung der Genexpressionslevel bestimmter Enzyme (*drug metabolizing enzyme*, DME) in den verschiedenen Stadien einer Chemotherapie die Medikamentierung für jeden Patienten individuell zu optimieren [86,87]. Genexpressionsanalyse auf DNA-Chips ermöglicht außerdem ein Hochdurchsatz-Screening von potentiellen pharmazeutischen Wirkstoffen auf Toxizität [88], eine ausführliche Charakterisierung komplexer Krankheitsverläufe [89] sowie ein besseres Verständnis zellulärer Mechanismen [90]. Ebenso bedeutsam für medizinische Fragestellungen ist die Anwendung von DNA-Chips zur Detektion von Punktmutationen, wobei die hohe Spezifität der Hybridisierung mit kurzen Oligonukleotidsonden ausgenutzt wird [91,92]. Aufgrund der simultanen Analyse einer sehr großen Zahl unterschiedlicher Hybridisierungssequenzen werden DNA-Chips häufig für die Genotypisierung einzelner Patienten [93] im Rahmen pharmakogenomischer Untersuchungen sowie zur schnellen Identifizierung von Viren und Bakterien eingesetzt (vgl. 3.3.2).

Obwohl die DNA-Chip-Technologie grundsätzlich z.B. auch für den Einsatz im Bereich der Lebensmittel- und Umweltanalytik geeignet ist, liegt der Schwerpunkt zur Zeit noch bei den medizinischen Fragestellungen. Der Übergang von der Forschungsanwendung in die Routineanalytik erfolgt dabei nur langsam, was hauptsächlich auf die relativ hohen Gesamtkosten der Methode zurückzuführen ist, die sich durch die aufwendige Arrayherstellung und die Anschaffungskosten der Fluoreszenzscanner ergeben.

Als Trägermaterial der DNA-Chips wird in den meisten Fällen Glas gewählt, weil es kostengünstig und chemisch inert gegenüber den Probenlösungen ist. Es zeigt eine geringe Eigenfluoreszenz im Bereich der üblicherweise verwendeten Laserwellenlängen und ist geeignet für die kovalente und dauerhafte Immobilisierung der DNA-Sonden (vgl. 3.1.4). Eine alternative und sehr innovative Form der DNA-Mikroarrays wurde allerdings in der Arbeitsgruppe von Walt [94,95] entwickelt. Die sog. BeadArrayTM-Technologie ermöglicht eine kostengünstige und zeitsparende Produktion eines faseroptischen *high-density-*

Mikroarrays durch eine zufällige Anordnung der auf kodierten Mikropartikeln immobilisierten Sondenoligonukleotide in geätzten Mikrokavitäten auf der sensitiven Endfläche eines faser-optischen Lichtleiterbündels, das aus vielen Einzelfasern aufgebaut ist. Verschiedene BeadArray™-Produkte werden heute bereits von der Firma Illumina (San Diego, USA) angeboten.

Eine Übersicht über verschiedene Aspekte der DNA-Chip-Technologie wie Methoden zur Arrayherstellung, Art der Sondenmoleküle und Anwendungsprotokolle geben Hegde *et al.* [96], Holloway *et al.* [97] und Heller [98].

3.1.4 Immobilisierung von DNA auf Glas

Sowohl bei der Realzeit-Hybridisierung von Targetmolekülen in DNA-Biosensoren als auch im Rahmen der konventionellen Hybridisierung auf DNA-Chips spielt die Immobilisierung einzelsträngiger Oligonukleotid-Fangsonden auf Oberflächen eine entscheidende Rolle. Von der Qualität der Immobilisierung hängen dabei nicht nur Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der eingesetzten Methode ab, sondern auch die Möglichkeit zur Miniaturisierung des Verfahrens. Um die erfolgreiche Durchführung eines Hybridisierungsassays auf einer sensitiven Oberfläche zu gewährleisten, sollten daher grundsätzlich folgende Kriterien erfüllt sein:

- Zur Signalmaximierung muss für eine ausreichende und konstante Menge an Fangsonden auf der sensitiven Oberfläche gesorgt werden.
- Die Belegung muss von Dauer sein und darf nicht durch Waschschriffe oder harsche Reaktionsbedingungen gelöst werden.
- Die Fangsonde muss sich möglichst zugänglich über der sensitiven Fläche befinden, um eine ungehinderte Bewegung der Targetmoleküle zur Sonde zu gewährleisten.
- Eine unspezifische Anbindung der Targetmoleküle an die sensitive Oberfläche muss verhindert werden.

Für die Immobilisierung von einzelsträngigen Oligonukleotidsonden oder PCR-Produkten auf Glasoberflächen stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Unterschieden werden kann dabei zwischen kovalenter und nicht-kovalenter Bindung der DNA auf der Oberfläche. Im Bereich der nicht-kovalenten Immobilisierungstechniken beruhen verschiedene Methoden z.B. auf der Poly-L-Lysin-Beschichtung [83], hydrophoben Wechselwirkungen [99] oder der ionischen Wechselwirkung zwischen DNA-Molekülen und aminosilanisierten Glasoberflächen [100]. Diese kann jedoch durch UV-Bestrahlung in eine kovalente Bindung zwischen den Thyminbasen der DNA und den positiv geladenen Aminogruppen der Oberfläche umgewandelt werden, wodurch man allerdings eine ungerichtete Bindung der DNA-Moleküle erhält. Die meisten kovalenten Immobilisierungsmethoden nutzen deshalb den Vorteil, der sich durch eine gerichtete Bindung der DNA-Moleküle über das normalerweise modifizierte 5'-Ende an die aktivierte Oberfläche ergibt. So können z.B. aminoterminal Oligonukleotide

an epoxy- [101] oder isothiocyanat-aktivierte [102] Oberflächen gebunden werden. Verschiedene Methoden wie die Carbodiimid-vermittelte Kopplung von amino-, carboxy- und phosphoryl-modifizierter DNA an carboxy- bzw. amino-aktivierte Oberflächen und die Bindung amino-terminaler Oligonukleotide an aldehyd-aktiviertes Glas wurden von Zammatteo *et al.* [103] untersucht. Für die vereinfachte Herstellung von DNA-Mikroarrays steht dem Anwender heute bereits ein breites Angebot voraktivierter Glasobjektträger auf Basis der verschiedenen Immobilisierungsmethoden zur Verfügung (vgl. 4.1 Tab. 5). Einen ausführlichen Überblick über die Immobilisierung von DNA auf Glas und anderen Trägermaterialien zur Herstellung von Mikroarrays gibt Beaucage [104].

3.2 Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln

3.2.1 Fragestellungen und Bedeutung

Im Rahmen der weltweit steigenden Produktion von Lebensmitteln im industriellen Maßstab sowie aufgrund der zunehmenden Unübersichtlichkeit des Marktes etwa durch die Liberalisierung des Handelsverkehrs in der Europäischen Union (EU) und den Anstieg der Wildimporte aus aller Welt hat die Notwendigkeit von Lebensmittelkontrollen zur eindeutigen Identifizierung der verarbeiteten Bestandteile in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Neben der Qualitätssicherung ist das vorrangige Ziel dabei, sowohl den Verbraucher als auch den Handel und die einschlägige Wirtschaft vor Falschdeklarationen und Verfälschungen zu schützen. Nicht nur im Bereich von Fleisch- und Fischerzeugnissen, sondern auch bei Milch- und Käse-Produkten werden nämlich häufig unter falscher Deklaration bewusst Materialien von minderwertigeren Tierarten zugesetzt, um durch überhöhte Preise einen wirtschaftlichen Vorteil zu erlangen. So werden z.B. Käseprodukte aus Ziegen-, Schafs- oder Büffelmilch durch die viel billigere Kuhmilch verfälscht und Fisch wird nach Entfernung der äußerlichen Charakteristika (Filetierung) oder einer weiteren Verarbeitung – etwa in der Räucherammer oder zur Konserve – oft als teure, nachgefragte Spezies verkauft, da eine Identifizierung nicht mehr auf den ersten Blick möglich ist.

Bei Fleischerzeugnissen spielen hinsichtlich einer eindeutigen Bestimmung der einzelnen Bestandteile auch die Problematik der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) in Rindfleisch sowie religiöse Gesichtspunkte eine entscheidende Rolle. Auch wenn die Zahl der BSE-Fälle europaweit rückläufig ist und Testverfahren vor der Verarbeitung erkrankter Tiere schützen sollen, wollen zahlreiche Verbraucher den Verzehr von Rindfleisch vermeiden. Dieser ist den Anhängern des Hinduismus aufgrund der Glaubenslehre untersagt ebenso wie im Islam und im Judentum der Verzehr von Schweinefleisch. Zur Kontrolle der Tierart bei Fleischimporten müssen außerdem geeignete Methoden zur Bestimmung exoti-

scher Spezies, wie z.B. Känguru-, Antilopen- oder Straußenfleisch, zur Verfügung stehen, die auch aus seuchenpolizeilicher Sicht von Bedeutung sind, da die Möglichkeit der Einschleppung neuartiger Tierseuchen besteht. Ein zusätzlicher Grund für die Notwendigkeit einer ausführlichen Kennzeichnung der in Lebensmitteln verarbeiteten Spezies liegt in der zunehmenden Zahl von Allergien gegen das Eiweiß bestimmter Tierarten. In der EU wird deshalb seit März 2000 die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung dafür durch die Richtlinie 2000/13/EG geregelt, die zum 1. Januar 2003 hinsichtlich einer neuen und strengeren Etikettierungspflicht für Fleischerzeugnisse durch die zusätzliche Richtlinie 2001/101/EG abgeändert worden ist. In Planung ist aktuell außerdem eine Verbesserung der Kennzeichnung von Geflügelfleischerzeugnissen [105].

Leistungsfähige Methoden zur Tierartenidentifizierung finden aber nicht nur im Bereich der Kennzeichnung von Lebensmitteln Anwendung, sondern z.B. auch bei der Herstellung und Überwachung von Futtermitteln, bei der forensischen Analyse im Rahmen gerichtsmedizinischer Untersuchungen, bei Durchführung und Kontrolle des Artenschutzes sowie zur eindeutigen biologischen Klassifizierung verschiedener Spezies.

Vom Gesetzgeber anerkannte Verfahren zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln finden sich in der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG)“. Diese Sammlung von Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen, Tabakerzeugnissen und kosmetischen Mitteln wird seit 1980 herausgegeben und umfasst überwiegend im Ringversuch überprüfte Methoden, die in Arbeitsgruppen des früheren Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin, jetzt Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR) bzw. des Deutschen Instituts für Normung (DIN, Berlin) unter Mitwirkung von Fachleuten aus den Bereichen der Überwachung, Wissenschaft und beteiligten Wirtschaft entwickelt bzw. ausgewählt wurden. Einen Überblick über unterschiedliche Methoden zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln geben Momcilovic und Rasooly [106] sowie Hofmann [107,108].

3.2.2 Proteinanalytische Methoden

Bis vor wenigen Jahren basierten die meisten Methoden zur Überprüfung der in Lebensmitteln verarbeiteten Tierarten auf dem Nachweis speziesspezifischer Proteine. Einschränkungen ergeben sich dabei besonders bei stark verarbeiteten und hochoverhitzten Produkten, in denen die Proteine denaturiert vorliegen und dadurch ihre charakteristischen Eigenschaften verlieren.

Verschiedene elektrophoretische Methoden nutzen die Trennung der Proteine im elektrischen Feld zur Erzeugung artspezifischer Bandenmuster. Man kann grundsätzlich unterscheiden zwischen der nativen Elektrophorese in Polyacrylamidgelen, bei der die Trennung

sowohl von der Ladung als auch von der Größe der Proteinmoleküle abhängt, der denaturierenden SDS-PAGE, bei der sich nur das Molekulargewicht auf die Trennungsleistung auswirkt, und der isoelektrischen Fokussierung (IEF). Dabei erfolgt die Trennung in einem pH-Gradienten-Gel und die Proteine wandern bis zum Erreichen ihres isoelektrischen Punktes. Die erhaltenen Proteinmuster werden mit einem Proteinfarbstoff oder durch spezielle Enzymfärbungen sichtbar gemacht. Elektrophoretische Methoden sind erfolgreich für die Identifizierung roher Fleischmaterialien eingesetzt worden [109,110], scheitern aber z.B. bei der Analyse mariner Proben [111]. In erhitzten Produkten konnte eine Tierartbestimmung mittels IEF nur noch eingeschränkt erfolgen [112,113]. Amtlich anerkannt nach §35 LMBG ist die Methode aber zur Artenbestimmung in Fisch- sowie in Milch- und Käseprodukten.

In der Routineanalytik verbreitet sind heute außerdem immunchemische Methoden, die auf der Reaktion von charakteristischen Tier-Proteinen mit spezifischen Antikörpern beruhen. Ein Problem ergibt sich dabei häufig durch Kreuzreaktivitäten nah verwandter Spezies, weshalb ein hoher Anspruch an die Herstellung der Antikörper gestellt werden muss. Angewendet werden zum einen verschiedene Varianten des Immunodiffusions-Tests nach Ouchterlony [114], von denen zwei als amtliche §35-Methoden anerkannt worden sind. Noch häufiger eingesetzt hauptsächlich zur Tierartbestimmung in Fleischerzeugnissen werden heutzutage aber Enzymimmunoassays, die sog. ELISA-Tests (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [115,116], welche die Basis von drei §35-Methoden bilden und mittlerweile in verschiedenen kommerziellen Test-Kits zur Verfügung stehen. Der Cooked Meat Species Identification Kit der Firma Cortecs Diagnostics (Clwyd, England, Vertrieb in Deutschland: Transia, Obermörlen) beschränkt sich zwar auf den Nachweis von Rind, Schwein, Schaf und Geflügel, ermöglicht aber auch den empfindlichen und spezifischen Nachweis in Materialien, die bis zu einem gewissen Grad erhitzt worden sind. Er ist außerdem geeignet, vor dem Hintergrund der BSE-Problematik die Effektivität der Erhitzung von Tiermehlen zu kontrollieren, in denen nach der gesetzlich vorgeschriebenen thermischen Behandlung der Test auf alle Spezies negativ ausfallen muss [117,118]. Weitere Anbieter von ELISA-Tests zur Tierartbestimmung sind u.a. Coring (Gernsheim), ELISA Technologies und ABC Research (beide Gainesville, USA).

3.2.3 DNA-analytische Methoden

Deutliche Vorteile hinsichtlich einer größeren Sensitivität und Spezifität bieten Methoden zur Tierartenidentifizierung, die auf dem Nachweis speziesspezifischer DNA-Sequenzen beruhen. Die DNA ist, im Gegenteil zu den Proteinen, weitgehend hitzestabil und verändert sich allenfalls in ihrer Länge, nicht aber in ihrem Informationsgehalt, d.h. der Basenabfolge. Für einen spezifischen Nachweis werden zudem nur geringe DNA-Mengen benötigt. Einen

ausführlichen Überblick über DNA-analytische Methoden zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln geben Meyer und Candrian [119].

Nachdem die DNA aus der Lebensmittelprobe isoliert worden ist, kann sie grundsätzlich durch Hybridisierung mit tierartsspezifischen DNA-Sonden in einem Southern-Blot oder mit PCR-Technik analysiert werden. Die Eignung der Sonden-Hybridisierung auch für die Analyse hitzebehandelter Fleischproben konnte demonstriert werden [120-122], allerdings trat dabei teilweise Kreuzhybridisierung zwischen nah verwandten Spezies auf [120,123]. Die Methode zeigt außerdem tendenziell eine geringere Sensitivität als die PCR und ist relativ zeitaufwendig. Ein methodischer Vergleich der DNA-Sonden-Technik mit der PCR-Analyse und der isoelektrischen Fokussierung für gekochte Fleischproben wurde von Rüggeberg *et al.* [124] durchgeführt.

Bei PCR-basierten Methoden zur Tierartendifferenzierung werden im ersten Schritt spezies-spezifische DNA-Sequenzen in der Probe amplifiziert, woraufhin der eigentliche Nachweis der verschiedenen Spezies dann durch eine weitere Analyse der PCR-Produkte erfolgt. Die vorausgegangene Sequenzanalyse in verschiedenen Bereichen der genomischen DNA von zahlreichen Spezies sowie der Zugang zu den gesammelten Informationen in Datenbanken bilden dabei die Voraussetzung für die Auswahl der Zielsequenzen und die Abstimmung der verwendeten Primersequenzen. Die PCR-Verfahren unterscheiden sich grundlegend durch die Art der eingesetzten Primer.

Bei der tierartsspezifischen PCR werden Primer verwendet, die ausschließlich an die DNA einer bestimmten Tierart binden können [125,126]. Das Design entsprechender Primer orientiert sich an DNA-Regionen, die zu anderen lebensmittelrelevanten Tierarten eine hohe Diversität aufweisen. Der parallele Nachweis verschiedener Spezies wird dadurch vereinfacht, dass die artspezifischen PCR-Amplifikate charakteristische Fragmentlängen aufweisen, die leicht bei einer anschließenden gelelektrophoretischen Analyse der PCR-Produkte unterschieden werden können. Die tierartsspezifischen PCR-Nachweise können entweder in separaten Ansätzen mit jeweils einem Primerpaar durchgeführt werden [127], was allerdings mit einem größeren Versuchsaufwand verbunden ist, oder sie werden in einer Multiplex-Reaktion durchgeführt [128-130]. Um die Komplexität der Gesamtreaktion dabei zu minimieren, wird häufig ein *forward*-Primer eingesetzt, der komplementär an die *Template*-DNA aller nachzuweisenden Spezies bindet, während durch speziesspezifische *reverse*-Primer mit möglichst ähnlichen T_m -Werten die charakteristischen Fragmente gebildet werden. Nach diesem Prinzip haben z.B. Matsunaga *et al.* [128] Rind, Schwein, Huhn, Schaf, Ziege und Pferd auch in erhitzten Fleischproben nachgewiesen, während Rea *et al.* [129] Zusätze von Kuhmilch in Mozzarella-Käse nachgewiesen haben, der im Original nur aus Büffelmilch hergestellt werden darf. Der Vorteil der tierartsspezifischen PCR besteht darin, dass auch hochoerhitzte Proben, die nur noch stark degradierte DNA enthalten,

untersucht werden können, da durch die geeignete Wahl der Primer auch sehr kurze spezifische PCR-Amplifikate erzeugt werden können. Mittlerweile sind verschiedene kommerzielle Kits für den tierartspezifischen PCR-Nachweis in Lebensmitteln erhältlich, wie z.B. die Animal-Kits von Alcum (Rietberg), die PCR-Kits von Coring und die CIB-A-Kits von Cibus Biotech (Gütersloh).

Vereinfacht wird die PCR zum simultanen Nachweis verschiedener Spezies durch den Einsatz universeller Konsensus-Primer. Die Primersequenzen liegen dabei in Bereichen, die tierartübergreifend stark konserviert sind, wodurch speziesunabhängig gleich große PCR-Amplifikate entstehen, die intern jedoch an verschiedenen Positionen Sequenzvariationen aufweisen. Eine wichtige Voraussetzung für vergleichbare Sensitivitäten beim parallelen Nachweis verschiedener Spezies ist, dass die Primer tatsächlich mit einer vergleichbaren Effizienz an die verschiedenen DNA-Vorlagen binden. Die weitere Analyse der PCR-Produkte erfolgt üblicherweise durch die Methode des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Dabei spalten Restriktionsenzyme die PCR-Amplifikate an definierten Sequenzstellen, wodurch infolge der artspezifischen Sequenzunterschiede verschiedene Spaltprodukte entstehen, die bei einer gelelektrophoretischen Auftrennung der verdauten Amplifikate für jede Spezies charakteristische Bandenmuster ergeben. Mit PCR-RFLP haben z.B. Quinteiro *et al.* [131] durch Amplifikation eines 197bp großen Fragmentes aus der Kontrollregion der mtDNA 11 verschiedene Seehecht-Spezies identifiziert und auch noch in sterilisierten Proben nachgewiesen. Die Mehrzahl der PCR-RFLP-Methoden im Bereich der Tierartendifferenzierung nutzt jedoch die Amplifikation von Teilsequenzen des Cytochrom B (*cytb*)-Gens der mtDNA (vgl. 3.2.4). Die mtDNA ist deshalb besonders geeignet für die Tierartenidentifizierung mittels Konsensus-PCR, weil sie in der Evolution eine viel höhere Mutationsrate gezeigt hat als nukleare DNA und dadurch zwischen verschiedenen Spezies eine größere Sequenzvariabilität aufweist, die auch die Differenzierung zwischen nah verwandten Spezies ermöglicht [132,133]. Ein Vorteil für die Analyse stark prozessierter Proben ist außerdem, dass die mtDNA in viel größerer Kopienzahl in der Zelle vorliegt als nukleare DNA, so dass auch geringe Probenmengen für die Analyse ausreichend sind.

3.2.4 Differenzierung über das *cytb*-Gen

Bei Anwendung einer Konsensus-PCR zur Tierartenidentifizierung werden heute üblicherweise Teilsequenzen aus dem mitochondrialen *cytb*-Gen amplifiziert, weil das Gen vollständig (ca. 1140 bp) oder zumindest teilweise bereits für zahlreiche Spezies im Rahmen von taxonomischen Untersuchungen sequenziert worden ist [134,135]. Sequenzinformationen stehen sowohl für viele Fisch- und Wildarten als auch für alle weiteren wichtigen Fleischarten, den Menschen und sogar Insekten zur Verfügung.

Wegweisend war die Arbeit von Meyer *et al.* [136], in der 1995 eine PCR-RFLP-Methode zum parallelen Nachweis von bis zu drei verschiedenen Spezies auch in erhitzten Fleischproben beschrieben wurde, bei der durch ein universelles Primerpaar ein 359bp-Fragment des *cytb*-Gens für 22 verschiedene Spezies erzeugt und durch RFLP mit verschiedenen Restriktionsenzymen differenziert wurde. Bezogen auf die Numerierung des humanen *cytb*-Gens wurde dabei der Bereich zwischen den Positionen 70 und 427 amplifiziert (Abb. 5, vgl. 8.2, Abb. 108). Mit demselben Primerpaar wurden weitere Untersuchungen an verschiedenen Fleischerzeugnissen durchgeführt [5,137], wobei für Rind, Schwein, Huhn und Pute Nachweisgrenzen von 1 bis 2 % erhalten wurden [5]. Durch PCR-RFLP des 359bp-Fragmentes konnte außerdem die Herkunft von Milch in Mozzarella und griechischem Feta bestimmt werden [138]. Weil bei der Methode nach Meyer *et al.* [136] jedoch in einzelnen Fällen zweideutige Ergebnisse aufgrund einer zusätzlichen Amplifikation von Pseudo-*cytb*-Genen der nuklearen DNA auftraten, haben Burgener und Hübner [139] unter Beibehaltung des *reverse*-Primers und durch 5'-Verschiebung des *forward*-Primers in den Bereich des angrenzenden *tRNA^{Glu}*-Gens, das für die tRNA von Glutamin kodiert, ein 464bp-Fragment amplifiziert, welches spezifisch für das mitochondriale *cytb*-Gen ist (Abb. 5). Durch RFLP der erhaltenen PCR-Produkte konnten in Fleischproben zahlreiche Spezies eindeutig auch in Mischproben mit bis zu drei Komponenten identifiziert und auch nah verwandte Spezies nach Verdau mit ein oder zwei Restriktionsenzymen differenziert werden [140]. Die Tauglichkeit der Methode zur Bestimmung der Fischart in Lebensmitteln wurde außerdem durch die Analyse zahlreicher Realproben bewiesen [141-144], weshalb sie für diesen Anwendungsbereich bereits als §35-Methode anerkannt wurde.

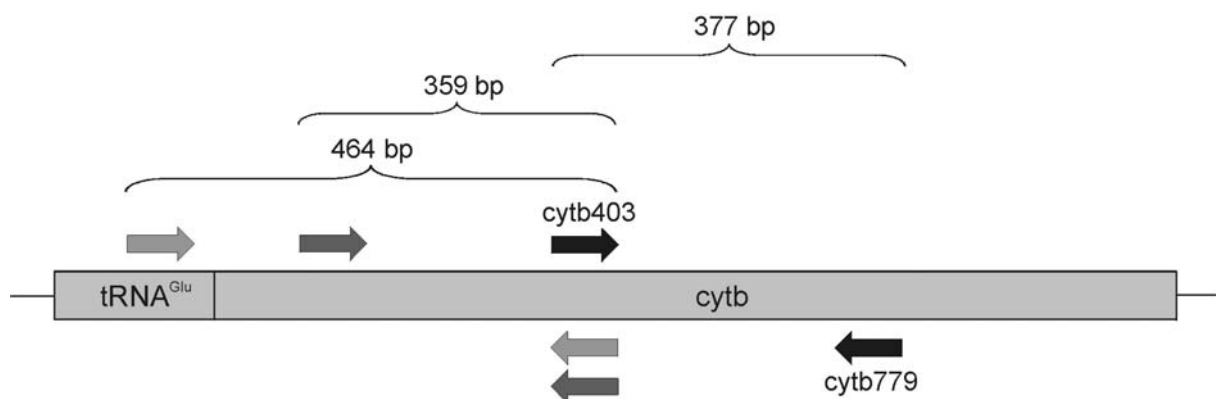


Abb. 5 Lage der universellen Primer im Bereich des mitochondrialen *cytb*-Gens bei verschiedenen Ansätzen zur Tierartendifferenzierung durch Konsensus-PCR

Skizziert sind die Positionen des jeweiligen *forward*(→)- und *reverse*(←)-Primers. Dabei ergeben sich PCR-Produkte von 359 bp bei Meyer *et al.* [136], 464 bp bei Burgener und Hübner [139] und 377 bp in dieser Arbeit.

Ein Nachteil ergibt sich bei der PCR-RFLP-Methode dadurch, dass besonders bei Mischproben die Interpretation der Bandenmuster kompliziert und nicht immer eindeutig möglich ist [141,143]. Die Analyse der PCR-Produkte durch Restriktion und elektrophoretische Auftrennung ist zudem relativ zeitaufwendig. Eine sinnvolle Alternative stellt deshalb die Hybridisierungsanalyse auf DNA-Chips oder im DNA-Biosensor dar, wobei durch Immobilisierung von speziesspezifischen SONDENSEQUENZEN aus dem variablen Bereich der Konsensus-PCR-Produkte innerhalb kurzer Zeit eine eindeutige Identifikation der Tierart erfolgen kann.

In dieser Arbeit sind daher zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln PCR-Amplifikate des *cytb*-Gens sowohl konventionell auf DNA-Chips als auch in einem Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor hybridisiert worden. Gegenüber der RFLP-Methode ergibt sich dabei der Vorteil, dass bei der Konzeptionierung des universellen Primerpaares die relativ seltenen Positionen geeigneter Restriktionsschnittstellen in dem amplifizierten DNA-Fragment nicht berücksichtigt werden müssen. Für den Nachweis der Spezies Rind, Schwein, Huhn, Pute, Schaf und Ziege wurden deshalb die Primersequenzen in interspezifisch maximal homologen Bereichen des *cytb*-Gens ausgewählt, und zwar als *forward*-Primer *cytb403* ab Position 403, entsprechend der Position des *reverse*-Primers bei Meyer *et al.* [136] sowie Burgener und Hübner [139], und als *reverse*-Primer *cytb779* ab Position 779 im *cytb*-Gen (Abb. 5, vgl. Anhang Abb. 108). Dadurch ergab sich ein 377bp-PCR-Produkt mit verschiedenen internen Bereichen von großer interspezifischer Sequenzvariabilität, das durch Hybridisierung mit tierartspezifischen SONDENSEQUENZEN charakterisiert werden sollte.

3.3 Detektion von Mikroorganismen

3.3.1 Fragestellungen und Grundlagen

Der Nachweis von Mikroorganismen spielt in ganz unterschiedlichen Bereichen wie der Human- und Veterinärmedizin [145], der Hygiene, der Umwelt [146] oder auch der Lebensmittelkontrolle [147] eine bedeutende Rolle. Nachgewiesen werden müssen dabei pathogene, umweltbelastende oder aber auch nutzbringende Bakterien. Typische Aufgaben der medizinischen Mikrobiologie sind z.B. der Erregernachweis bei Infektionskrankheiten in verschiedenen Probenmaterialien, die Differenzierung phylogenetisch verwandter Mikroorganismen und epidemiologische Untersuchungen zur Aufklärung von Infektionsquellen. Die Umwelt-Mikrobiologie beschäftigt sich dagegen neben der Kontrolle der Wasserqualität besonders damit, komplexe Strukturen und Wirkungsweisen natürlicher Mikroorganismen-Populationen aufzuklären und die Effizienz bestimmter Bakterien beim Abbau von Schadstoffen in der Umwelt zu verbessern. In den letzten Jahren sind neben den klassischen Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen aufgrund ihrer phänotypischen Eigen-

schaften, wie z.B. der kulturellen Anzucht in speziellen Medien oder der Analyse der Enzymausstattung, zunehmend molekularbiologische Methoden angewendet worden, weil dadurch zum einen die Diagnose für klinische Proben schneller gestellt und ineffektive Therapieansätze sowie gehäufte Antibiotika-Resistenzen verhindert werden können [148]. Zum anderen sind neben Viren und verschiedenen klinischen Erregern auch die meisten Mikroorganismen aus Umweltproben aufgrund ihrer speziellen Lebensbedingungen mit den üblichen Methoden gar nicht kultivierbar [149] und in ihrer Diversität bisher noch zu wenig charakterisiert, um ausschließlich mit den klassischen Methoden erfasst werden zu können [150,151]. Neben verschiedenen DNA-analytischen Verfahren wie DNA-Sondenhybridisierung [152,153] oder Nutzung von spezifischen RFLPs [154] spielen besonders PCR-basierte Nachweismethoden eine entscheidende Rolle für die spezifische und schnelle Charakterisierung von Mikroorganismen [155]. Während zahlreiche PCR-Tests zur gezielten Detektion einzelner Erreger in der Routinediagnostik entwickelt worden sind [156-158], bietet sich für die Analyse komplexer Populationen die Hybridisierung der Amplifikate auf DNA-Mikroarrays an.

3.3.2 Anwendung von DNA-Mikroarrays

Durch Hybridisierungsanalyse auf DNA-Mikroarrays können in einem einzigen Experiment viele verschiedene Mikroorganismen parallel nachgewiesen werden, wenn die entsprechenden Sequenzdaten zur Verfügung stehen, aus denen speziesspezifische Sondensequenzen generiert werden können. Der Nachweis richtet sich dabei gezielt auf Abschnitte solcher Gene, welche die phylogenetische Entwicklung der verschiedenen Spezies und entsprechend ihre Diversität besonders deutlich widerspiegeln. Am ausführlichsten wurde bisher das 16S rRNA-Gen (ca. 1550 bp), welches für eines der drei RNA-Moleküle im Ribosom kodiert, für die phylogenetische Analyse und Detektion von Bakterien untersucht [159]. Das Gen bietet ähnlich dem mitochondrialen *cytb*-Gen (vgl. 3.2.4) den Vorteil, dass es beim Vergleich aller lebenden Organismen zum einen relativ stark sequenzkonservierte Bereiche zeigt, die das Design eines universellen Primerpaares zur Amplifikation des 16S rRNA-Gens für eine große Mehrheit verschiedener Spezies in einer Konsensus-PCR ermöglichen. Andererseits weist das Gen verschiedene Bereiche mit einer deutlichen interspezifischen Sequenzvariabilität auf, die es ermöglichen, Sonden spezifisch für höhere oder niedrigere Taxa, d.h. Rangstufen im System genotypisch verwandter Organismen, zu konzipieren. Die Entwicklung taxonspezifischer Sonden liegt auch dem Mehrfachsondenkonzept zugrunde, welches bei der Differenzierung komplexer Bakterienpopulationen auf Mikroarrays häufig Anwendung findet. Dabei erfolgt der zuverlässige Nachweis einer Spezies nach einem hierarchischen Prinzip über mehrere Sonden, die speziess-, gruppen- oder gattungsspezifisch an verschiedenen Positionen des Zielgens positioniert sind. Die Notwendigkeit des Mehrfachsonden-

konzeptes ergibt sich aus der Tatsache, dass häufig ein nicht zu vernachlässigendes Risiko von Fehlidentifizierungen besteht, da in Folge von Mehrfachmutationen im Laufe der Evolution identische Zielsequenzen in phylogenetisch nicht verwandten bzw. nicht demselben Taxon zugehörigen Organismen entstanden sein können. Dieses Risiko ist bei der gleichzeitigen Einbeziehung mehrerer unabhängiger Zielstellen oder Moleküle deutlich reduziert.

Besonders für die Detektion klinisch relevanter Bakterien bietet sich neben dem 16S rRNA-Gen außerdem das 23S rRNA-Gen an, weil es eine größere interspezifische Sequenzvariabilität aufweist und dadurch für eine Differenzierung noch besser geeignet ist [10]. Grundsätzlich besteht aber auch die Möglichkeit, zumindest innerhalb bestimmter Untergruppen, die Differenzierung über ganz andere Zielgene vorzunehmen, die häufig als funktionelle Gene bezeichnet werden, da sie für charakteristische Enzyme der jeweiligen Gruppe von Mikroorganismen kodieren. Durch einen Konsensus-PCR-Ansatz zur Amplifikation des partikulären Methan-Monooxygenase (pMMO)-Gens und Analyse der PCR-Produkte auf einem DNA-Mikroarray mit 59 verschiedenen SONDENSEQUENZEN konnten z.B. alle bekannten Spezies methanotropher Bakterien nachgewiesen werden, die Methangas zu Kohlendioxid abbauen und in der Atmosphäre eine wichtige Rolle zur Vermeidung des Treibhauseffektes spielen [160]. Der Prototyp eines Mikroarrays zur Differenzierung verschiedener funktioneller Gene, die für charakteristische Enzyme des Stickstoffkreislaufs kodieren, wurde von Wu *et al.* [161] zur Analyse von verschiedenen Bodenproben nach dem Konsensus-Prinzip entwickelt. Für die Untersuchung von mikrobiellen Populationen in Umweltproben, die sich durch eine hohe Diversität auszeichnen, sind DNA-Mikroarrays grundsätzlich besonders geeignet.

Während in den meisten Untersuchungen zur parallelen Analyse zahlreicher Spezies eine Amplifikation mit universellen Primern erfolgt, werden bestimmte Toxizitäts- oder Pathogenitätsfaktoren häufig auch durch eine spezies-spezifische PCR in einem Multiplex-Ansatz amplifiziert. Keramas *et al.* [162] entwickelten z.B. eine Methode, um verschiedene *Campylobacter*-Spezies in Fäkalproben nachzuweisen, wobei ihnen sogar eine Unterscheidung der nah verwandten Spezies *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* gelang. Wilson *et al.* [163] wiesen nach Multiplex-Amplifikation 18 pathogene Mikroorganismen auf einem GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach.

Bei der Mikroorganismendetektion auf DNA-Mikroarrays bieten sich aber nicht nur für die Durchführung des Amplifikationsschrittes verschiedene Möglichkeiten, auch die Hybridisierung kann auf unterschiedlichen Substraten durchgeführt werden. Durch Immobilisierung von SONDENSETS auf Nylon- oder Nitrozellulosemembranen (sog. Makroarrays) wurden z.B. Bakterien in Blutproben [10] oder in Fertigsalaten [164] nachgewiesen. Auf Glasmikroarrays konnten dagegen jeweils fünf klinisch relevante Spezies der Gattung *Staphylococcus* [165] und des menschlichen Rotavirus [166] identifiziert werden. Einen ausführlichen Überblick

über alle wichtigen Aspekte der Anwendung von DNA-Mikroarrays zur Detektion von Mikroorganismen gibt Bodrossy [167].

3.3.3 Modellchip zum Nachweis von sulfatreduzierenden Prokaryonten

Im globalen Schwefelkreislauf spielen die sulfatreduzierenden Prokaryonten (SRPs) eine zentrale Rolle, da sie zur anaeroben Atmung mit Sulfat als terminalem Elektronenakzeptor befähigt sind. Neben ihrer zahlenmäßigen und funktionellen Bedeutung in zahlreichen Ökosystemen, wie z.B. marinen Sedimenten [168] und cyanobakteriellen hypersalinen Matten [169], wurden einige SRPs auch mit humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Sie konnten u.a. bei Parodontitis [170], Abszessen der Leber [171] und Blutvergiftung [172] nachgewiesen werden. Die hohe phylogenetische und physiologische Diversität innerhalb dieser Mikroorganismengruppe macht die SRPs zu einer idealen Modellgruppe, um methodische Fragen bezüglich Sensitivität und Spezifität eines DNA-Mikroarray-basierten Nachweises aufklären zu können. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen eines Förderprojektes der Bayerischen Forschungstiftung (Projekt 368/99) in der Arbeitsgruppe von Prof. Schleifer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München) ein DNA-Mikroarray, der SRP-PhyloChip, zum Nachweis aller bekannten sulfatreduzierenden Mikroorganismen in Umwelt- und klinischen Proben entwickelt [173]. Der Chip umfasst 132 Sondensequenzen aus dem Bereich des 16S rRNA-Gens, die nach dem Mehrfachsondenkonzept entworfen wurden und durch charakteristische Hybridisierungsmuster für die mit universellen Primern erhaltenen 16S rRNA-Genamplifikate eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen Spezies ermöglichen sollen.

Erste Evaluierungsversuche mit Cy5-markierten PCR-Produkten aus Reinkulturen der Spezies *Desulfovibrio (Dsv.) halophilus*, *Desulfomicrobium (Dsm.) aspheronum* und *Desulfohalobium (Dsh.) retbaense* verdeutlichten, dass eine klare Diskriminierung zwischen perfekt und fehlpaarenden Sonde-Target-Hybriden nicht für alle Sonden gleichermaßen erreicht werden konnte, da bei jeder Sequenz die Stringenzbedingungen für eine maximale Spezifität unterschiedlich sind. Um die unspezifischen Wechselwirkungen einzelner Spezies abschätzen zu können, wurden deshalb im nächsten Schritt der Evaluierung bei definierter Stringenz 41 SRP-Referenzorganismen einzeln mit dem SONDENSATZ hybridisiert. Dabei hybridisierten 59 % der immobilisierten Sonden ausschließlich mit den perfekt komplementären Zielorganismen, während an den restlichen Sonden teilweise auch Anbindung von nicht perfekt komplementären Sequenzen mit bis zu sechs Fehlpaarungen beobachtet wurde.

Unter Berücksichtigung dieser unspezifischen Hybridisierungsereignisse konnte anschließend dennoch die Tauglichkeit des entwickelten SRP-PhyloChips für den Nachweis von SRPs in komplexen Proben aus Medizin und Umwelt demonstriert werden. Die Analyse des Zahntaschenmaterials von mehreren Patienten mit adulter Parodontitis sowie der Chemo-

kline einer cyanobakteriellen hypersalinen Matte aus dem Solar Lake (Sinai, Ägypten) zeigte, dass auf Basis des hierarchisch gegliederten Sondensatzes im Rahmen der Nachweisgrenze keine falsch-negativen Ergebnisse auftraten. Allerdings konnten falsch-positive Ergebnisse einzelner Sonden aufgrund unspezifischer Hybridisierung unter den monostringenten Bedingungen nicht ausgeschlossen werden, da durch die vorangegangene Hybridisierung der 41 Referenzorganismen nur ein Bruchteil aller SRP-Spezies in seinem Bindungsverhalten charakterisiert worden war. Obwohl das angewandte Mehrfachsondenkonzept die Unspezifität einzelner Sonden zwar teilweise ausgeglichen hat, war dennoch eine Überprüfung der Ergebnisse des SRP-PhyloChips durch unabhängige Verfahren wie speziesspezifische PCR, Klonierung und Sequenzierung notwendig [173].

Um den Nachweis der SRPs auf dem DNA-Mikroarray weiter zu optimieren, müsste daher die Spezifität jeder einzelnen Sonde und dadurch auch die Diskriminierung einzelner Basenfehlpaarungen gewährleistet sein. Einen Ansatz dazu liefert eine dynamische Betrachtung des Systems, bei der die Hybridisierungssignale nicht im Gleichgewicht, sondern bei wechselnden Stringenzbedingungen, z.B. durch Temperatur- oder Formamidgradienten, detektiert werden. Die Bindungscharakteristik an einzelnen SONDENSEQUENZEN könnte dadurch in Realzeit während eines einzelnen Hybridisierungsexperimentes aufgenommen werden. Weil die Detektion von DNA-DNA-Wechselwirkungen in Realzeit grundsätzlich von optischen DNA-Biosensoren ermöglicht wird und die Nachweismethode auf Fluoreszenzdetektion beruht, besteht das Ziel darin, den Nachweis der SRPs mit dem entwickelten Sondensatz vom konventionellen DNA-Chip auf das am ICB entwickelte Evaneszent-Feld-DNA-Biosensorsystem zu übertragen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die Ergebnisse der monostringenten Hybridisierung auf dem SRP-PhyloChip für den Nachweis der drei Spezies *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* mit einem selektierten Sondensatz bei Hybridisierung im DNA-Biosensor reproduziert werden. Diese ausgewählten Hybridisierungssequenzen reflektierten dabei deutlich die unterschiedlichen Ansprüche, welche an die Fähigkeit des Systems zur Diskriminierung von Basenfehlpaarungen bis hin zu einzelnen mismatches gestellt werden. Daraufhin sollte demonstriert werden, dass durch Ausführung von Waschschritten mit zunehmender Stringenz tatsächlich eine Differenzierung zwischen einzelnen Basenfehlpaarungen in allen Fällen möglich wird und der Ausbau des bestehenden DNA-Biosensorsystems zu einer Geräteplattform für die schnelle und spezifische Identifizierung von Mikroorganismen dementsprechend sinnvoll ist.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

i) Geräte

ALFexpress™ Analysesystem	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Analysenwaage AT 261 Deltarange	Mettler über Fleischhacker (Schwerte)
Blockthermostat BT200	Kleinfeld (Gehrden)
Dispenser Nano-Plotter	GeSiM (Großerkmannsdorf)
Elektrophoresis-Power Supply-EPS 600	Pharmacia Biotech (Freiburg)
GMS418 Mikroarray-Scanner	MWG-Biotech (Ebersberg)
Mikrozentrifuge	Carl Roth (Karlsruhe)
Minigel Twin-Kammer	Biometra (Göttingen)
PAGE Einzelkammer	Werkstatt des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Münster
pH-Elektrode Inlab 423	Mettler (Toledo, USA)
pH-Meter 763 Multi Calamatic	Knick (Berlin)
Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN	Seral (Ransbach-Baumbach)
Schneidplotter Cutting Pro FC3100-60	Graphtec Europe (Solingen)
Schüttler Vortex Genie 2	Bender & Holbein (Zürich, CH)
Standard Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Sterilgard Sicherheitswerkbank	Baker Company (Sanford, ME, USA)
Thermocycler Hybaid OmniGene	MWG-Biotech (Ebersberg)
Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallbad Sonorex Super RK103H	Bandelin (Berlin)
UV-VIS-Spektrometer Lambda11	Perkin Elmer (Weiterstadt)

ii) Materialien

Acrylglas GS 3 mm farblos	Carl Nolte Technik (Münster)
Deckgläschen 20 mm x 20 mm	VWR (Darmstadt)
Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten (PP)	Nunc (Wiesbaden)
PVC 3 mm grau	Carl Nolte Technik (Münster)
Transferklebefilm 3M aus Reinstacrylat (50 und 130 µm)	Witte Plusprint (Münster)
BK7-Glaschips 28 mm x 22 mm x 1 mm	Schott (Mainz)
Objektträger, 26 mm x 76 mm x 1 mm, blank	Menzel-Gläser (Braunschweig)

Objektträger, 26 mm x 76 mm x 1 mm, superior (blank)	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Objektträger, 25 mm x 75 mm x 1 mm, blank	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Zentrifugen-Filtereinheiten Ultrafree [®] -MC	Millipore (Schwalbach)

Tab. 1 Liste der getesteten voraktivierten Glasobjektträger im Standardformat

Produktname	Hersteller	Modifizierung / Art der Bindung
ALDEHYDE	Greiner Bio-one (Solingen)	Aldehydgruppen / kovalent
ArrayLINK hyphob [®]	Genescan Europe (Freiburg)	Epoxyasilan / kovalent
CMT-GAPS [™]	Corning (Wiesbaden)	γ -Aminopropylsilan / ionisch
CreativeChip [®]	Eppendorf (Hamburg)	3D-Struktur / kovalent
CSS-Silylated [™]	CEL Associates (Pearland, USA)	Aldehydgruppen / kovalent
DNA-Ready [™] Type II	Clontech (Heidelberg)	Aminogruppen / ionisch
Easyspot [®]	Biocat (Heidelberg)	Epoxygruppen / kovalent
PicoSlides [™]	PicoRapid (Bremen)	Isothiocyanat [102] / kovalent
QMT MicroSpotSlide [®]	Quantifoil (Jena)	Epoxygruppen / kovalent
SigmaScreen [™]	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	Aminopropyltriethoxysilan/ ionisch

iii) Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Folgenden nicht besonders aufgeführt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Fluka (Taufkirchen) bezogen und waren von höchstem Reinheitsgrad.

Elektrophorese

Rotiphorese [®] Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37.5:1 (30% AA)) für PAGE	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese [®] NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% (19:1) für das ALFexpress [™] Analysesystem	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat	Serva (Heidelberg)
pUC19-DNA-Marker, <i>Msp</i> I geschnitten	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
ALFexpress [™] Sizer 300 und 100	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Loading Dye	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

PCR

Biotherm™ DNA-Polymerase	Genecraft (Münster)
dNTPs	Genecraft (Münster)
10x-PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	Genecraft (Münster)
50mM MgCl ₂ -Lösung	Genecraft (Münster)
1 mM Cy5-dUTP-Lösung	Amersham Biosciences (Freiburg)

Hybridisierungspuffer

Ultrahyb™	Ambion (Austin, USA)
MWG-Hybridisierungspuffer	MWG-Biotech (Ebersberg)
2x Hybridisierungspuffer PicoRapid	PicoRapid (Bremen)
Perfect Hyb™ Plus	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ArrayHyb™ LowTemp	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
SlideHyb™ #1-#4	Ambion (Austin, USA)

Sonstige Reagenzien

Natriumdodecylsulfat	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
Rotiblock® 10x Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotisol®	Carl Roth (Karlsruhe)
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
MinElute™ PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

Formamid (FA) wurde ausschließlich in deionisierter Form eingesetzt. Die Deionisation wurde mittels des Ionenaustauschers AG 501-X8 Resin von Bio-Rad (München) durchgeführt.

Die folgenden Puffer bildeten die Grundlage zahlreicher Arbeitsschritte:

0.5xUH/50%FA (Standardhybridisierungspuffer)	50 % (v/v) Ultrahyb™ ¹⁾ 25 % (v/v) Formamid 25 % (v/v) H ₂ O
10x TBE (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer, pH 8.5)	890 mM TRIS Base 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
20x SSC (Citrat gesättigte Kochsalzlösung, pH 7.0)	3 M NaCl 0.3 M NaCitrat

¹⁾ Der Ultrahyb™-Puffer (Ambion, Austin, USA) enthält bereits 50 % Formamid.

Deaktivierungspuffer (Immobilisierung, pH 8.5)	0.1 M NaHCO ₃ 1 % (m/v) 6-Aminohexansäure 0.1 % (m/v) SDS
Regenerierungslösung für Sensorchip	0.125 N NaOH 0.05 % Tween 20
Waschpuffer für Sensorchip (pH 7.5)	0.5x SSC 0.1 % (m/v) SDS
PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, pH 7.4)	8.04 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1.47 mM KH ₂ PO ₄ 145 mM NaCl

Sämtliche Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Konzentration der wässrigen Lösungen wurde durch spektralphotometrische Messung bei 260 nm überprüft. Alle Sonden-Oligonukleotide wurden 5'-Amino-modifiziert eingesetzt mit einem C12-T8- bzw. einem C12-T15-Spacer zwischen Aminogruppe und Sondensequenz. Die Target-Oligonukleotide trugen jeweils am 5'-Ende eine Cy5-Markierung. Im Anhang finden sich Übersichten über die Oligonukleotide, welche bei den Untersuchungen zur Optimierung und Charakterisierung des DNA-Biosensors (Tab. 22), zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln (Tab. 23) und zur Detektion von Mikroorganismen (Tab. 24) eingesetzt wurden.

4.2 Referenz- und Realproben zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln

Vom Chemischen Landes- und Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Münster wurden sowohl DNA-Extrakte von Referenzmaterialien (Tab. 2) bestehend aus einer reinen Spezies als auch von zahlreichen Realproben (Tab. 4) aus den laufenden Überprüfungen zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden speziell für die Validierung der chipbasierten Nachweismethoden verschiedene Probenmischungen in definierten Verhältnissen hergestellt und anschließend die DNA daraus extrahiert (Tab. 3). Für die Extraktion wurden entweder der Wizard-Kit (Promega, Mannheim) oder der Cibus-Kit (Cibus Biotech, Gütersloh) angewendet. Als Referenz-DNA zur Etablierung der Nachweismethode zur Tierartendifferenzierung stand außerdem genomische Kontroll-DNA von Huhn, Pute, Rind und Schwein aus einem früheren Ringversuch des damaligen BgVV [174] zur Verfügung.

Zwei Extrakte humaner DNA aus Blut, erhalten mit dem NucleoSpin Blood-Kit (Macherey-Nagel, Düren), wurden vom Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster bereitgestellt.

4.2.1 Probendaten

Angaben zu den DNA-Extrakten der verschiedenen Proben finden sich in Tab. 2 bis Tab. 4. Die DNA-Konzentrationen wurden durch Absorption bei 260 nm bestimmt und die DNA-Extrakte wurden bei -20°C gelagert.

Tab. 2 Genomische Referenz-DNA der einzelnen Spezies

Probennummer	Quelle	Spezies	DNA-Konzentration (µg/ml)
R-1	CVUA	Huhn	10
R-2	CVUA	Pferd	16
R-3	CVUA	Pute	27
R-4	CVUA	Rind	9
R-5	CVUA	Schaf	57
R-6	CVUA	Schwein	13
R-7	CVUA	Ziege	106
R-8	BgVV	Huhn	100 ¹⁾
R-9	BgVV	Pute	100
R-10	BgVV	Rind	100
R-11	BgVV	Schwein	100
R-12	Rechtsmedizin	Mensch	100
R-13	Rechtsmedizin	Mensch	100

¹⁾ Die Extrakte der Proben R-8 bis R-13 wurden auf 100 µg/ml eingestellt.

Tab. 3 DNA-Extrakte der Proben zur Validierung

Die Angaben zur Probenzusammensetzung wurden durch die in 4.2.2 beschriebenen Referenzmethoden am CVUA Münster erhalten (n.n.: nicht nachgewiesen).

Probennummer	Bezeichnung	R ²⁾	S	H	P	Sf	Z	DNA-Konz. (µg/ml)
V-1	Ziegenfeta (zertifiziert)						+	39
V-2	Ziegenfeta (zertifiziert) + 5% Kuhmilch	n.n.					+	37
V-3	Rind + 1 % Huhn	+		+				51
V-4	Rind + 1 % Huhn	+		+				37
V-5	Rind + 0.1 % Huhn	+		+				46
V-6	Rind + 0.1 % Huhn	+		+				37
V-7	Schwein + 1 % Rind	+	+					19
V-8	Schwein + 1 % Rind	+	+					31
V-9	Schwein + 0.1 % Rind	+	+					27
V-10	Schwein + 0.1 % Rind	+	+					25

²⁾ Abkürzungen: R: Rind, S: Schwein, H: Huhn, P: Pute, Sf: Schaf, Z: Ziege.

Tab. 4 Zusammensetzung der Realproben-DNA-Extrakte

Die Angaben zur Probenzusammensetzung wurden durch die in 4.2.2 beschriebenen Referenzmethoden am CVUA Münster erhalten (n.n.: nicht nachgewiesen).

Probennummer	Bezeichnung	R	S	H	P	Sf	Z	DNA-Konz. (µg/ml)
P-1	Hähnchen-Döner			+	-			37
P-2	Hähnchen-Döner			+	-			40
P-3	Hähnchenfleisch-Döner			+	-			50
P-4	Döner-Kebap			+	-			39
P-5	Putenmedaillons			-	+			16
P-6	Mettwurst		+					39
P-7	Fleischwurst		+					41
P-8	Rostbratwurst		+					36
P-9	Würstchen		+					53
P-10	Döner Kebap	+						32
P-11	Lammbratwurst	+				+		95
P-12	Truthahnbrust gefüllt			-	+			80
P-13	Thüringer Mett v. Schwein	+	+	-	-			46
P-14	Hot Dog	-	+	+	-			149
P-15	Fleischwurst	+	+	+	+			53
P-16	Rostbratwurst	-	+	-	+			92
P-17	Putenbratwurst	+	+	-	+			78
P-18	Schafskäse	+				-	+	14
P-19	Schafskäse	+				-	-	13
P-20	Picodon (Ziegenkäse)	+				-	+	22
P-21	Schafskäse (Extrakt a) ¹⁾	+				+	+? ²⁾	20
P-22	Schafskäse (Extrakt b)	+				+	+?	22
P-23	Brühwurst A		+					12
P-24	Brühwurst B	+	+	+	+			7
P-25	Leberwurst A	+	+	-	+			124
P-26	Leberwurst B		+					46

¹⁾ Bei den Proben P-21 und P-22 handelte es sich um zwei verschiedene DNA-Extrakte derselben Schafskäse-Probe. ²⁾ ?: Die Referenzanalytik hat kein eindeutiges Ergebnis geliefert.

4.2.2 Durchführung der Referenzanalytik

Beim CVUA Münster erfolgte die Tierartendifferenzierung in den zu testenden Lebensmittelproben nach unterschiedlichen Methoden. Die DNA-Extrakte von Fleischproben wurden zunächst mit Hilfe eines ELISA-Tests zum Nachweis von Tierarten in erhitzten Fleischwaren (Transia, Ober-Mörlen) immunchemisch analysiert. Nur für Spezies, welche im ELISA auffällig erschienen, wurde anschließend eine tierartspezifische PCR mit dem CIB-A-Kit (Cibus Biotech, Gütersloh) durchgeführt. Zum Nachweis von Schaf und Ziege z.B. in Käseproben wurde eine PCR-RFLP-Methode angewendet, bei der nach Wolf *et al.* [140] aus dem *cytb*-Gen ein 464bp-PCR-Produkt erhalten und anschließend verdaut wird. Im Falle der

Proben P-21 und P-22 war der Nachweis von Ziege bei Auswertung der Restriktionsfragmente jedoch nicht eindeutig möglich. Der Test auf Rind in Käseproben erfolgte in der Routineanalytik mit dem Casein-ELISA „Ridascreen Cis“ (R-Biopharm, Darmstadt). Ergaben sich dabei Auffälligkeiten, wurde das Ergebnis durch eine tierartspezifische PCR für Rind bestätigt.

Die Ergebnisse (+/–) in Tab. 3 und Tab. 4 beruhen dementsprechend auf den Analysen mit CIB-A-Kit bzw. PCR-RFLP. Lediglich bei Probe V-2 wurde auf den eindeutigen Rindnachweis verzichtet, nachdem es mit PCR-RFLP nicht nachgewiesen (n.n.) werden konnte, weil die Probe eigens am CVUA angesetzt worden war und definitiv Rind-DNA enthielt.

Bei den Proben P-23 bis P-26 handelte es sich um deklariertes Probenmaterial aus verschiedenen Laborvergleichsuntersuchungen der Jahre 2000 und 2001 von der Anstalt für Laborvergleichsuntersuchungen (LVU, Herbolzheim).

4.3 Molekularbiologische Methoden

Die hier dargestellten Methoden kamen in dieser Arbeit nahezu ausschließlich im Rahmen der Fragestellung zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln zur Anwendung.

4.3.1 Sequenzdatenverarbeitung

Die Sequenzen des *cytb*-Gens der verschiedenen analysierten Spezies wurden mit dem Programm *ClustalX Multiple Sequence Alignment Program* (Version 1.8, The National Center for Biotechnology Information (NCBI), erhältlich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) abgeglichen. Der daraus resultierende Sequenzvergleich findet sich im Anhang (vgl. 8.2 Abb. 108) und war Vorlage bei der Konzeption der verwendeten Primer und Sonden. Zum Abgleich zwischen einzelnen Sequenzen kam dabei außerdem der *BLAST*-Algorithmus (NCBI, ebenda online verfügbar) zum Einsatz. Die Sondensequenzen wurden mit Hilfe des *Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) auf Sekundärstrukturen und Selbstkomplementarität untersucht. Die Daten aus der Sequenzierung der PCR-Produkte wurden mit dem Programm *Chromas* (Version 1.5, Technelysium, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) bearbeitet.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.3.2.1 PCR zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln

Bei der Standard-Konsensus-PCR zur Amplifikation des mitochondrialen *cytb*-Gens der Spezies Huhn, Pute, Rind, Schwein, Schaf, Ziege, Mensch und Pferd wurden die universellen Primer *cytb403* und *Cy5cytb779* (vgl. Anhang Tab. 23) eingesetzt. Ein PCR-Ansatz enthielt dabei 1x-PCR-Puffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 400 nM Primer *cytb403*, 400 nM Primer *Cy5cytb779*, 0.02 U/µl Polymerase und 1 µl *Template*-DNA. Das Reaktionsvolumen von 25 µl wurde mit vollentsalztem (VE) Wasser aufgefüllt. Als preiswerte DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wurde Biotherm™ *Taq* verwendet. Die Reaktionen wurden in dünnwandigen 600µl-Reaktionsgefäßen (Genecraft, Münster) in Thermoblöcken mit Deckelheizung durchgeführt. Dabei wurde das folgende Temperaturprogramm durchlaufen:

- Initiale Denaturierung: 94°C / 3 min
- 35 Zyklen, jeweils: 94°C / 30 s, 62°C / 30 s, 72°C / 60 s
- Finale Elongation: 72°C / 3 min
- Abkühlphase: 30°C / 15 min, dann RT

Sofern nicht anders bei den Ergebnissen angemerkt, wurden die Amplifikationen unabhängig von der Art der eingesetzten *Template*-DNA unter den genannten Bedingungen durchgeführt. Die *Template*-DNA-Lösungen wurden dabei normalerweise unverdünnt eingesetzt und nicht auf eine bestimmte Konzentration eingestellt.

Zur Herstellung von PCR-Produkt-Pools einzelner Spezies wurde ein mindestens 10facher Reaktionsansatz („Mastermix“) einschließlich der jeweiligen Referenz-*Template*-DNA angesetzt und in 25µl-Aliquots zur Reaktion gebracht. Nach Analyse durch Polyacrylamid-gelelektrophorese (vgl. 4.3.3) wurden die Ansätze mit guter Ausbeute vereint („gepoolt“).

Alternativ zum Einsatz des *Cy5cytb779*-Primers konnte die *Cy5*-Markierung auch durch Zugabe von *Cy5*-dUTP zum Reaktionsansatz erreicht werden. Wenn nicht anders angemerkt, enthielt ein 25 µl-Ansatz dann 1x-PCR-Puffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 100 µM dTTP, 25 µM *Cy5*-dUTP, 400 nM Primer *cytb403*, 400 nM Primer *cytb779*, 0.02 U/µl Polymerase und 1 µl *Template*-DNA.

4.3.2.2 PCR zur Detektion von Mikroorganismen

Die PCR-Produkte zum SRP-Nachweis wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Schleifer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München) zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist von Loy *et al.* [173] beschrieben worden. Für die in dieser Arbeit verwendeten Produkte wurde ausgehend von Reinkulturen der Spezies *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* zunächst mit universellen Primern ein Teil des 16S rRNA-Gens amplifiziert. Die

dabei erhaltenen ca. 1.5 kb großen PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick™ PCR purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und photometrisch bei 260 nm quantifiziert. Die Cy5-Markierung der PCR-Produkte erfolgte daraufhin mit dem DecaLabel DNA labeling Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), wobei jeweils 200 ng der aufgereinigten PCR-Produkte eingesetzt und im ersten Schritt denaturiert wurden, so dass Decanukleotid-*Random-Primer* an zufälligen Positionen an die Einzelstränge binden konnten. Im zweiten Schritt wurde der Ansatz dann nach Zugabe von dATP, dGTP, dTTP, Cy5-dCTP und Klenow-Polymerase bei 37°C inkubiert. Für eine effizientere Markierung wurden Additionsschritt und Inkubation im Anschluss noch einmal wiederholt. Dadurch wurde schließlich eine statistische Produktverteilung mit unterschiedlichen Markierungsgraden und Größen der DNA-Fragmente erhalten. Um ungebundene dNTPs und Decanukleotide zu entfernen, wurden die PCR-Produkte abschließend mit dem QIAquick™ nucleotide removal Kit (Qiagen) aufgereinigt und in VE- Wasser eluiert.

4.3.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die PCR-Produkte wurden geleelektrophoretisch unter Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe mittels vertikaler PAGE analysiert. Für die Differenzierung zwischen Fragmentgrößen von ca. 30-500 bp wurde standardmäßig die folgende Zusammensetzung des Gels gewählt: 10 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch (37.5:1), 0.2 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin, 0.08 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat, 1x TBE. Die Gele wurden in Glaskassetten der Größe 8.5 cm x 7.5 cm x 0.1 cm hergestellt mit 10 Taschen pro Gel. Üblicherweise wurden 2 oder 3 µl PCR-Produkt mit 1 µl Probenpuffer (0.125 % (w/v) Bromphenolblau, 0.125 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin in 25 mM EDTA) sowie der pUC19-DNA-Marker als Referenz im Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese in 1x TBE wurde das Gel ca. 2 min in einer Färbelösung (0.5 µg/ml Ethidiumbromid) und im Anschluss 10 min in einem Wasserbad inkubiert, bevor die DNA-Banden dann im UV-Licht (Transilluminator) sichtbar gemacht wurden. Photographien der Gele werden in dieser Arbeit farbinvertiert dargestellt.

In einzelnen Fällen wurde eine quantitative Auswertung der Banden im Gel mit Hilfe der Visualisierungs-Software *Osiris* (Version 3.6, entwickelt am Universitäts-Hospital Genf, <http://www.expasy.ch/UIN>) durchgeführt. Den digitalen Bildern kann damit die Farbintensität und Lage jedes einzelnen Punktes entnommen werden, woraufhin die erhaltenen Datensätze in Programme wie *Origin*® (OriginLab, Northampton, USA) exportiert werden können.

4.3.4 Analyse der PCR-Produkte im ALF-Sequencer

Als eine weitere gelelektrophoretische Methode zur Charakterisierung der PCR-Produkte wurde in dieser Arbeit das ALFexpressTM DNA Analysesystem (*allelic fragment*, Pharmacia Biotech) genutzt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgt dabei nicht über einen externen, interkalierenden Marker, sondern über die gekoppelten Cy5-Fluorophore. Das System wurde mit einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 7 M Harnstoff, 6x TBE, 0.09 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin, 0.04 % Ammoniumperoxodisulfat) in 1x TBE als Laufpuffer betrieben. Das 0.5 mm dicke und 31 cm x 15 cm große Gel enthielt 40 Taschen, die zur vertikalen Elektrophorese bei 50°C beschickt wurden. Dafür wurden je nach der in der PAGE beobachteten Bandenintensität Vorverdünnungen (1:10 bis 1:100) der Cy5-markierten PCR-Produkte angesetzt, um eine Signalsättigung zu verhindern. Jeweils 3 µl des in VE-Wasser verdünnten PCR-Produktes wurden dann mit 3 µl des Probenpuffers (Formamid, 0.5 % Dextranblau) versetzt, hitzedenaturiert (100°C, 5 min) und bis zur Aufgabe auf Eis gelagert. In einzelnen Taschen wurde eine Mischung aus 3 µl Probenpuffer und je 1.5 µl einer 1:5-Verdünnung der 100bp- und 300bp-Größenmarker zwecks einer externen Basenpaarskalierung aufgetragen. Unter Einhaltung der vom Hersteller empfohlenen Parameter ließ sich bei einer Laufzeit von 200 min eine Auftrennung von 0 bis ca. 450 nt großen DNA-Einzelsträngen erreichen. Nach etwa 20 cm Laufstrecke durchdrang dabei ein Helium-Neon-Laser (633 nm) das Gel und regte über dessen gesamte Breite die Fluoreszenz der an den DNA-Einzelsträngen befindlichen Cy5-Farbstoffmoleküle an, deren Emission in jeder Spur von separaten Photodioden registriert wurde. Die Daten wurden an einen Steuerungsrechner weitergeleitet und mit dem Programm *Allelink* (Pharmacia Biotech, Freiburg) ausgewertet. In den erhaltenen Elektropherogrammen der Cy5-Fluoreszenz wurden automatisch Peaks detektiert und die darunter liegenden Flächen integriert. Diese Signalintegrale waren proportional zur Stoffmenge und, anders als bei der Interkalation mit Ethidiumbromid, unabhängig von der Größe der PCR-Produkte. Die Rohdaten wurden in Abbildungen prozentual zum Sättigungssignal dargestellt.

4.3.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die durch PCR mit den unmarkierten Primern cytb403 und cytb779 sowie ohne Zusatz von Cy5-dUTP erhaltenen PCR-Produkte der Referenz-DNAs R-8 (Huhn), R-9 (Pute), R-10 (Rind) und R-11 (Schwein) wurden durch Sequenzanalyse näher charakterisiert. Dazu wurden jeweils zwei gepoolte PCR-Produkt-Ansätze zunächst mit dem QiaquickTM PCR Purification Kit (Qiagen) von den dNTPs, den Primern und der Polymerase aufgereinigt und in 50 µl Puffer (10 mM TRIS-hydrochlorid, pH 8.5) eluiert. Die Sequenzierung wurde am Institut für Rechtsmedizin in Münster (Arbeitskreis von Prof. Brinkmann) durchgeführt. Bei Verwendung des DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kits (Amersham Pharmacia

Biotech, Freiburg) wurden jeweils 4 µl PCR-Produkt, 10 pmol Sequenzierprimer cytb403 und 4 µl der Komponenten-Mischung des Kits in einer 10 µl-Reaktion bei folgendem Temperaturprofil eingesetzt: 30 Zyklen; Denaturierung: 95°C / 20 s; Hybridisierung: 54°C / 15 s; Elongation: 60°C / 60 s. Über den statistischen Einbau von Didesoxynukleotiden, die je nach Base mit vier verschiedenen Fluorophoren markiert waren, wurden ssDNA-Fragmente erhalten, die sich durch Kapillarelektrophorese mit dem ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, USA) auftrennen ließen. Vor der Elektrophorese wurden zunächst die ungebundenen Abbruchnukleotide durch Gelfiltration entfernt sowie der Reaktionsansatz lyophilisiert und in Formamid aufgenommen. Aus dem kapillarelektrophoretisch erhaltenen Peakmuster der vier verschiedenen Fluoreszenzpeaks ließ sich die Sequenz ableiten. Mit dieser Methode lässt sich grundsätzlich nur ein beschränkter Bereich einer Zielsequenz bestimmen, da die Information am 5'-Ende des *sense*-Stranges zumindest durch den unmarkierten Primer und am 3'-Ende meist durch ein Abflachen der Sequenzierreaktion eingegrenzt ist.

4.4 Immobilisierung der DNA-Fangsonden auf Glas

4.4.1 Standardmethode auf Basis kovalenter Kopplung nach Silanisierung

Die einzelsträngigen DNA-Fangsonden wurden in dieser Arbeit sowohl auf 28 mm x 22 mm x 1 mm großen BK7-Glaschips (Schott, Mainz) als auch auf Glasobjektträgern im Standardformat von 25 mm x 75 mm x 1 mm (u.a. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) immobilisiert. Für die Anbindung der DNA-Moleküle auf den unmodifizierten Glasoberflächen wurde eine in der Literatur beschriebene Standardmethode zur Herstellung von Oligonukleotid-Arrays für DNA-Chips [102,175] in variiert Form angewendet. Die Vorgehensweise wurde bereits von Schult [79] genauer beschrieben, ist für diese Arbeit allerdings in wenigen Punkten angepasst worden. Die einzelnen Schritte der Oberflächenmodifikation bis hin zur Anbindung der DNA-Fangsonden sind in Abb. 6 skizziert.

Die Glasobjektträger wurden zunächst chemisch gereinigt, indem in einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und konz. Salzsäure und anschließend in konz. Schwefelsäure inkubiert wurde. Nach Waschen mit VE-Wasser und Methanol (MeOH) wurde die Oberfläche mit einem aminofunktionalisierten Silan (3 % (v/v) 3-[2-(2-Aminoethylamino)-ethylamino]-propyl-trimethoxysilan in MeOH) silanisiert. Die dadurch eingeführten Aminogruppen wurden nach Waschen der Objektträger in MeOH und Tempern bei 110°C mit dem bifunktionalen Crosslinker Phenyl-Diisothiocyanat (10 mg/ml in einer Lösung von 10 % (v/v) Pyridin in Dimethylformamid (DMF)) aktiviert. Die Glasobjektträger wurden daraufhin sowohl mit DMF als auch mit Dichlormethan gewaschen, im Stickstoffstrom trocken geblasen und entweder unter Trockenmittel bei -20°C zwischengelagert oder sofort weiter verwendet.

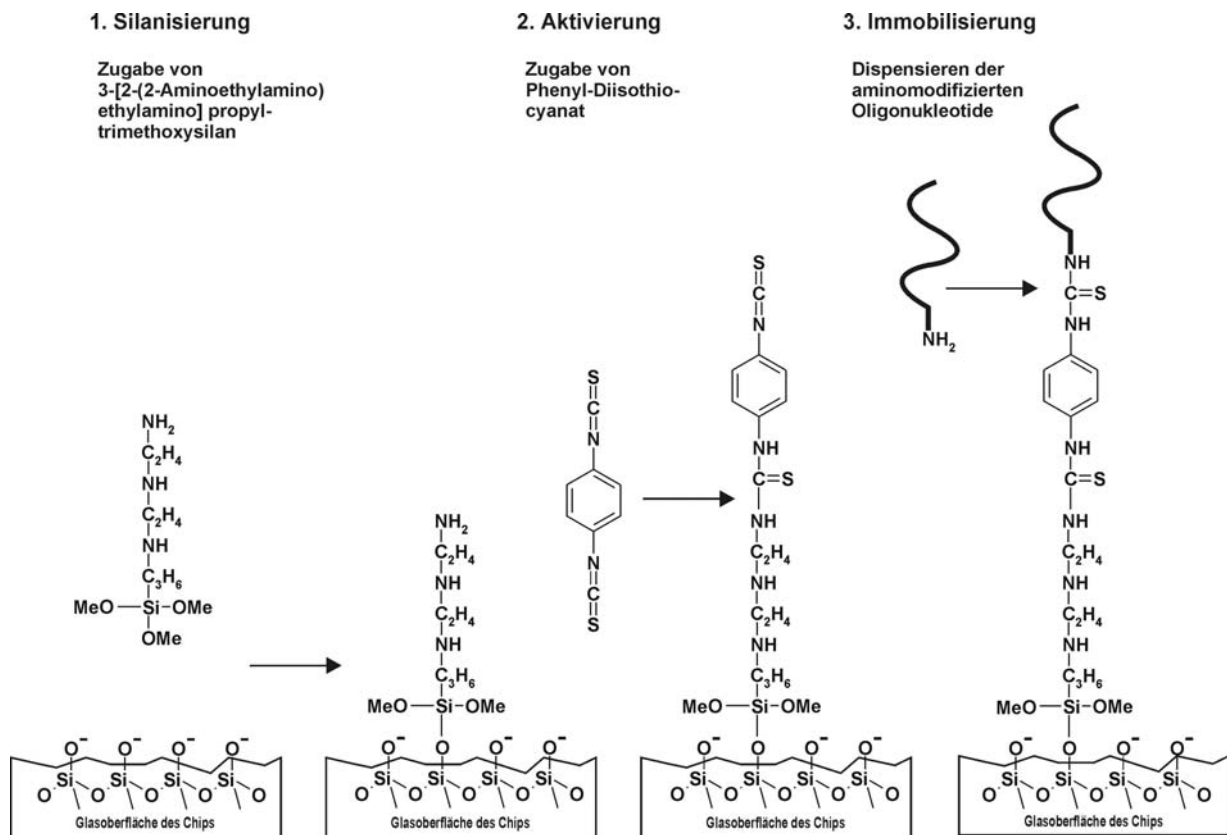


Abb. 6 Immobilisierung von aminomodifizierten Oligonukleotid-Fangsonden auf blanken Glasoberflächen: Ablauf der chemischen Modifikation der Glaschips

Die Anbindung der DNA-Fangsondemoleküle erfolgte im nächsten Schritt durch Reaktion der Aminogruppe am 5'-Ende der Oligonukleotide mit der freien funktionellen Gruppe des Crosslinkers unter Ausbildung einer kovalenten Bindung. Die DNA-Fangsonden lagen in der Regel in einer Konzentration von 5 μM in wässriger Lösung vor und wurden mittels eines Dispensers (Nano-Plotter, GeSiM, Großerkmannsdorf) ortsaufgelöst in definierten Arrays auf der Glasoberfläche abgelegt. Ein Sondenspot entstand dabei üblicherweise aus einem Volumen von ca. 2 nl Sondenlösung, und der Abstand zwischen verschiedenen Sondenspots des Arrays betrug 0.7 mm. Nur in den Fällen, wo eine einzige Sondensequenz in einem 10x10-Array immobilisiert wurden, war der Abstand 1 mm groß. Weiterhin wurde bei der Herstellung aller Sondenarrays ein 5'-Cy5- und 3'-NH₂-markiertes Oligonukleotid als Positionsmarker an verschiedenen, definierten Positionen neben dem Array mit einem Mindestabstand von 1.4 mm zu den Fangsondenspots immobilisiert, wobei nur ca. 0.6 nl der 2 μM Positionsmarkerlösung pro Spot aufgetragen wurden. Nach der Belegung erfolgte eine Inkubation der Glasobjektträger über Nacht bei 37°C in einer Feuchtbox. Im Anschluss daran wurden die überschüssigen reaktiven Gruppen bei 37°C durch Reaktion mit 6-Aminohexansäure (1 % (w/v) in 100 mM Natriumcarbonat, pH 8.5) deaktiviert, bevor die Oberfläche zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen bei RT durch Inkubation in 1x Rotiblock geblockt wurde. Nach Waschen mit VE-Wasser und Trocknen im Stickstoffstrom wurden die

Glasobjektträger bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Genauere Angaben bezüglich der einzelnen Verfahrensschritte finden sich in [79].

Die gesamte Behandlung der Glasobjektträger erfolgte in 15 cm x 6.5 cm x 4 cm großen Glasschalen, die zwar bis zu 13 der kleineren BK7-Glaschips, aber nur vier der Glasobjektträger im Standardformat aufnehmen konnten, weshalb bei der Immobilisierung auf den großen Glasobjektträgern zumeist zwei Schalen im parallelen Ansatz prozessiert wurden.

4.4.2 Test verschiedener voraktivierter Glasobjektträger

Während die DNA-Fangsonden üblicherweise nach der beschriebenen Standardmethode zur kovalenten Anbindung auf unmodifizierten Glasobjektträgern nach Silanisierung immobilisiert worden sind, wurden auch die in Tab. 1 aufgeführten voraktivierten Objektträger im Standardformat getestet. Sie wurden nicht im Bereich der Versuche zur konventionellen Chip-hybridisierung eingesetzt, für die sie von den verschiedenen Herstellern entwickelt worden sind, sondern ausschließlich für die Anwendung im DNA-Biosensor. Es wurden nur solche modifizierten Objektträger verwendet, auf denen entsprechend der Produktbeschreibung auch die bei der Standardmethode eingesetzten amino-modifizierten Oligonukleotide ange-bunden werden konnten. Um einen idealen Vergleich zwischen den unterschiedlich immo-bilisierten Sondenarrays zu gewährleisten, wurde mit Hilfe des Dispensers auf allen Objektträgern ein 10x10-Array der Actin-45-0mm-Sonde mit einem Spotabstand von 1 mm sowie außerhalb des Arrays der Positionsmarker an verschiedenen Positionen aufgetragen. Die Oligonukleotide wurden dabei in einer Konzentration von 5 µM in dem vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Dispensierpuffer immobilisiert, lediglich auf den Easyspot®-Objektträgern (Biocat, Heidelberg) und den CSS-Silylated™-Objektträgern (CEL Associates, Pearland, USA) musste an Stelle von 50 % Dimethylsulfoxid (DMSO) reines Wasser verwendet werden, da mit 50 % DMSO beim Dispensieren keine konstante Tropfenform erhalten werden konnte. Während der Prozessierung der verschiedenen modifizierten Objektträger wurden sonst in allen Phasen die Anweisungen der Hersteller befolgt. Wenn diese zur Behandlung der Oberflächen mehrere Verfahren zur Wahl gestellt haben, wurden alle vorgegebenen Varianten jeweils an einzelnen Objektträgern getestet. Die Immo-bilisierung auf den voraktivierten Objektträgern erwies sich in allen Fällen als deutlich weniger zeitaufwendig als die Standardmethode mit unmodifizierten Glasobjektträgern. Um die Effizienz der verschiedenen Immobilisierungsverfahren zu untersuchen, wurden die Objekt-träger jeweils im DNA-Biosensor mit 0.5 nM Actin-51-Cy5-Target hybridisiert. In einzelnen Fällen wurden die Objektträger nach der Hybridisierung auch am GMS418 Mikroarray-Scanner ausgelesen, um genauere Informationen z.B. bezüglich der Spotform zu gewinnen.

4.5 Methode der Realzeit-Hybridisierung im DNA-Biosensor

4.5.1 Grundlagen

Der am ICB in Münster entwickelte Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor ermöglicht die simultane Detektion multipler Hybridisierungsereignisse in Realzeit. Er ist konzipiert als Durchflusssystem bestehend aus einem Sensorchip und einer optischen Ausleseeinheit. Auf der sensitiven Glasoberfläche im Fließkanal des Sensorchips werden zunächst die einzelsträngigen DNA-Fangsonden immobilisiert. Während der Messung wird dann die Anbindung der Cy5-markierten Targetmoleküle aus der Probenlösung an die Fangsonden durch Anregung im evaneszenten Feld verfolgt. Dieses wird durch Totalreflexion eines Laserstrahls an der Grenzfläche zwischen Glas und Probenlösung im Fließkanalhalbraum erzeugt (Abb. 7). Zur Totalreflexion kommt es, wenn der Sinus des Einfallswinkels α größer ist als der Quotient aus Brechungsindex n_1 des optisch dünneren Mediums (Probenlösung) und Brechungsindex n_2 des optisch dichteren Mediums (Glasmaterial des Sensorchips). Die Intensität des evaneszenten Feldes nimmt exponentiell mit zunehmender Entfernung d von der Chipoberfläche ab:

$$E = E_0 \cdot \exp(-d/d_P) \quad (\text{Gl. 12})$$

Daher befinden sich nur die Fluorophore in einem Bereich mit ausreichender Anregungsenergie, die sich innerhalb der charakteristischen Eindringtiefe d_P befinden, innerhalb derer die Amplitude des evaneszenten Feldes auf maximal E_0/e abgenommen hat. Dabei gilt:

$$d_P = \lambda / 2\pi n_1 [\sin^2 \alpha - (n_2/n_1)^2]^{0.5} \quad (\text{Gl. 13})$$

Durch gezielte Veränderung der Brechungsindexe, des Einfallswinkels und der Wellenlänge können die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes variiert und dadurch die Anregung von Fluorophoren in der umgebenden Lösung minimiert werden [176]. Grundsätzlich erreicht die Wirkung des evaneszenten Feldes im optisch dünneren Medium (Probenlösung) ausgehend von der Reflexionsebene eine Tiefe, die etwa in der Größenordnung der Wellenlänge der eingestrahltten Lichtwelle liegt [177]. Unter den vorliegenden Bedingungen für die Brechungsindexe und den Einstrahlwinkel beträgt die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ca. 200 nm. Dadurch werden nur die Fluorophore der Targetmoleküle angeregt, die sich in unmittelbarer Nähe der sensitiven Oberfläche befinden und bereits mit den komplementären Fangsonden hybridisiert sind. Ein Waschschrift zur Entfernung der ungebundenen Targets wird dadurch überflüssig und die Hybridisierung kann in Realzeit verfolgt werden.

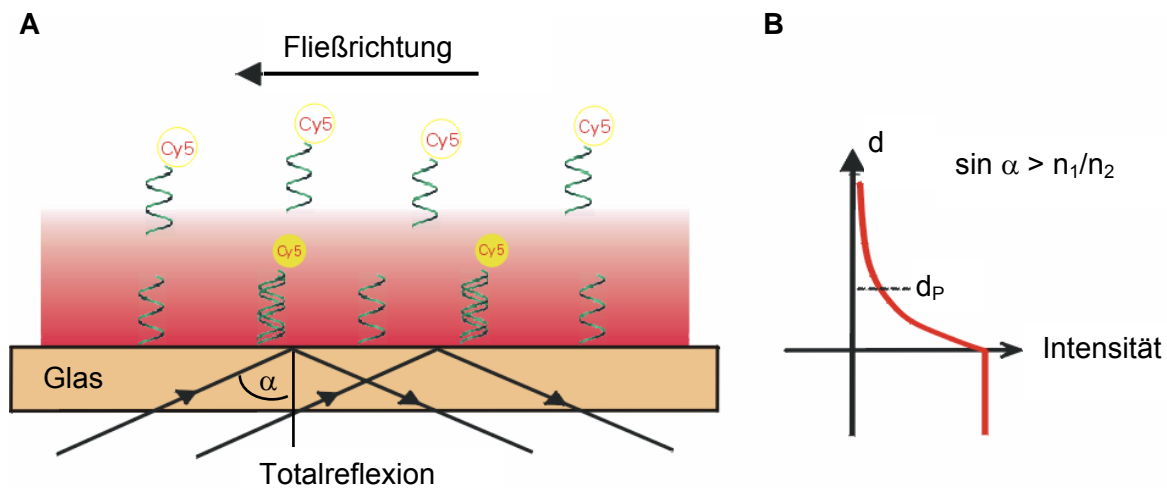


Abb. 7 A: Ausbildung des evaneszenten Feldes durch Totalreflexion an der Grenzfläche Glaschip/Probenlösung; B: Intensitätsprofil des evaneszenten Feldes

Die Detektion der Fluoreszenzstrahlung erfolgt mittels einer CCD-Kamera orts aufgelöst. Durch Immobilisierung von Sondenarrays auf der Fließkanaloberfläche mittels eines Nano-Dispensers kann die Anbindung vieler verschiedener Targetsequenzen simultan detektiert werden.

Die geometrische Konzeption der Durchflusszelle zeichnet sich dadurch aus, dass sie einen nahezu nicht diffusionslimitierten Stofftransport ermöglicht, der maßgeblich nur durch Konvektion erfolgt. Durch eine Minimierung der Fließkanalhöhe auf 50 μm bei gleichzeitig optimierten Werten für die Fließkanalfläche und die Fließrate ist es gelungen, die diffusive Grenzschicht des laminaren Strömungsprofils möglichst klein zu halten, so dass letztlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Wechselwirkung zwischen den Biomolekülen ist. Dementsprechend ergibt sich für das detektierte Fluoreszenzsignal der bereits in 3.1.2.3 hergeleitete lineare Zusammenhang zwischen der zeitlichen Signaländerung und der Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation k_{on} sowie der Targetkonzentration c :

$$dR/dt = k_{\text{on}}cR_{\text{max}} \quad (\text{Gl. 5})$$

Folgende Voraussetzungen müssen bei der Hybridisierungsmessung im Sensorchip für die Gültigkeit der Gleichung und Beobachtung tatsächlich linearer Signalanstiege stets erfüllt sein:

- Messung im Anfangsbereich der Hybridisierung, d.h. kurze Messzeiten
- Konstante Targetkonzentration durch Messung im Durchfluss
- Überschuss der Fangsondemoleküle

Durch Auswertung der Anfangssignalsteigungen dR/dt ermöglicht das Sensorsystem somit unabhängig vom Fluoreszenzhintergrund sowohl eine Quantifizierung der Target-DNA-Moleküle in der Probenlösung als auch eine Differenzierung zwischen Hybridisierungssequenzen mit unterschiedlich starken Wechselwirkungen in der Assoziationsphase.

4.5.2 Aufbau des Messgerätes

Das DNA-Biosensorsystem ist bereits ausführlich beschrieben worden [79]. Bei der in dieser Arbeit verwendeten ersten Version des Auslesegerätes handelt es sich um einen Laboraufbau, der in Abb. 8 dargestellt ist. Die einzelnen Komponenten, welche auf einem optischen Labortisch angeordnet sind, lassen sich einteilen in das zentrale Glasprisma, auf das der Sensorchip mittels einer Mechanik herabgelassen werden kann, die Anregungsoptik mit dem Lasermodul, die Detektionsoptik mit der CCD-Kamera, das Fluidiksystem mit Pumpe und Ventil, einen Thermostaten sowie die elektronische Steuereinheit.

Das Glasprisma, in das der Laserstrahl eingekoppelt wird, ist während der Messungen mit dem Glasträger des Sensorchips über ein Silikonöl kontaktiert. Sowohl das Prisma als auch das Silikonöl haben den gleichen Brechungsindex wie das Glas des Sensorchips ($n = 1.571$), so dass der Laserstrahl erst an der Glasoberfläche im Sensorchip Totalreflexion erfährt.

Für die Fluoreszenzanregung wurde eine Laserdiode der Wellenlänge 635 nm gewählt, obwohl das Absorptionsmaximum des in allen Messungen verwendeten Cy5-Farbstoffes bei 650 nm liegt. Ursächlich dafür ist die Notwendigkeit, Anregungslicht (635 nm) und Fluoreszenzlicht (Maximum 670 nm) möglichst wirkungsvoll zu trennen. Da sich Laser als streng monochromatische Lichtquellen durch ihre besonders hohe Intensität auszeichnen, kann auch eine 30 % geringere Extinktion des Fluorophors toleriert werden, die sich hier durch die Differenz von 15 nm zwischen der Anregungswellenlänge der Laserdiode und dem Anregungsmaximum des Cy5-Farbstoffes ergibt.

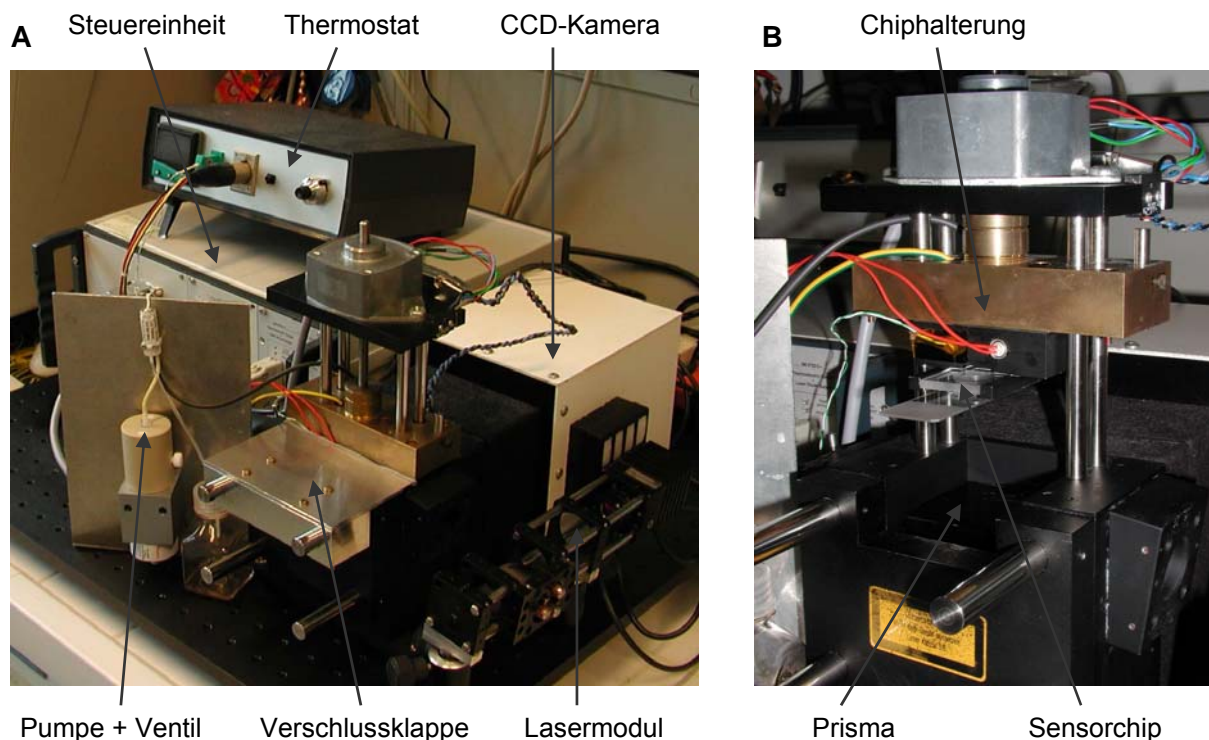


Abb. 8 **A: Aufbau der Ausleseeinheit des DNA-Biosensorsystems; B: zentrales optisches Bauteil im geöffneten Zustand**

Der parallel von der Diode (Kirchhoff & Schäfer, Hamburg) emittierte Laserstrahl weist ein typisches Strahlprofil von ca. 7.3 mm x 1.6 mm auf, wobei an den Rändern die Laserleistung auf 50 % der Maximalleistung abfällt. Diese Inhomogenität der Strahlintensität lässt sich auch durch eine anschließende einachsige Strahlaufweitung sowie einen Teilausschnitt des Strahlprofils mittels einer Rechteckblende nicht vollständig relativieren, wodurch sich eine nicht absolut homogene Intensitätsverteilung des evaneszenten Feldes auf der ca. 10 mm x 10 mm großen sensitiven Fläche im Sensorchip ergibt.

Das emittierte Fluoreszenzlicht wird auf der Unterseite des Glasprismas über ein System aus Spiegeln, optischen Linsen und einem Filter zur Unterdrückung von Laserstreulicht auf die lichtempfindliche Fläche der CCD-Kamera (Serie 300, Photometrics, München) abgebildet.

Ein in der Ausleseeinheit integrierter Thermostat ermöglicht durch ein indirektes Aufheizen des Sensorchips über die Chiphalterung das Einstellen von verschiedenen, konstanten Temperaturen bei den Messungen im Bereich von etwa 20-50°C. Die Temperaturangaben sind jedoch aufgrund der indirekten Methode mit einem relativ großen Fehler behaftet.

Mit Hilfe der eigens am ICB entwickelten Software *DNA-Chip* wird das Auslesegerät gesteuert. Dabei handelt es sich um ein *Testpoint Programm*TM, das für den Benutzer eine Oberfläche unter *Windows*TM schafft. Es ermöglicht grundsätzlich die Durchführung von Messungen in zwei verschiedenen Modi, nämlich die Messung bei kontinuierlichem Fluss sowie im „Hin&Her-Pump“-Modus, in dem ein Volumenelement der Probenlösung abwechselnd von der Einlass- zur Auslassseite des Fließkanals und zurück gepumpt wird. In dieser Arbeit wurde ausschließlich bei kontinuierlichem Fluss gemessen. Die einfach strukturierte Benutzeroberfläche ermöglicht dabei neben der Steuerung der mechanischen Chiphalterung und des Fluidiksystems mit Pumpe und Ventil auch die Programmierung der CCD-Kamera bei Auswahl variabler Einstellungen für die verschiedenen Parameter wie z.B. Fließrate, Belichtungszeit und Probenvolumen.

4.5.3 Aufbau des Sensorchips

Der DNA-Sensorchip ist aus fünf Komponenten aufgebaut, die in Abb. 9 dargestellt sind. Die Basis des Chips bildete im ersten Teil der hier durchgeführten Arbeiten noch ein 28 mm x 22 mm x 1 mm großer BK7-Glaschip der Firma Schott (Mainz). Schließlich wurden jedoch Glasobjektträger im Standardformat, wie in Abb. 9 gezeigt, verwendet. Zur Ausbildung des Fließkanals wurde der Glasobjektträger mit einem grauen PVC-Zwischenstück (28 mm x 22 mm x 3 mm) über einen zugeschnittenen Klebefilm von 50 µm Höhe mit einer mittigen Öffnung von 14 mm x 22 mm verbunden. In das Zwischenstück sind schlitzförmig (14 mm x 1 mm) Zu- und Abfluss zum Fließkanal integriert. Über einen zweiten zugeschnittenen Klebefilm von 130 µm Dicke wurde die Oberseite des Zwischenstückes mit dem Chipoberteil aus Polymethacrylsäuremethylester (PMMA) verbunden, wodurch sich das

optimierte Fließsystem des Sensorchips ausgebildet hat. In das Chipoberteil sind ein Auslass (\varnothing 2 mm) und eine Kavität zur Aufnahme von maximal 200 μ l Probenvolumen integriert. Für eine detaillierte Zeichnung des Sensorchipsaufbaus siehe auch Ref. [79].

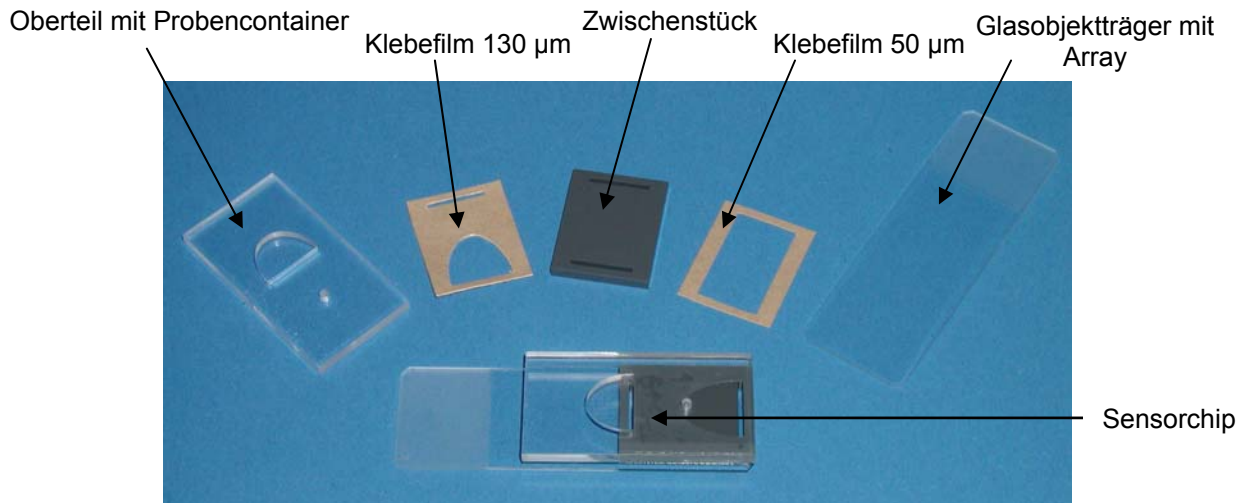


Abb. 9 Einzelkomponenten des DNA-Sensorchips

In Abb. 10 ist die Position des immobilisierten Sondenarrays auf den Glasobjektträgern im Standardformat skizziert. Die relativen Koordinaten von $x = 14$ mm und $y = 12.5$ mm beschreiben dabei die Lage des zentralen Bezugspunktes der verschiedenen Arrayformate ausgehend von der linken, unteren Ecke des Objektträgers. Auf den kleineren BK7-Glaschips lag dieser Punkt dementsprechend genau in der Mitte. Bei der Konzeption der Arrays für die DNA-Sensorchips wurden die verschiedenen Sondenspots immer so angeordnet, dass sie mindestens zwei- oder dreifach in unterschiedlichen Bereichen des Arrays, jedoch mindestens einmal im zentralen, relativ stark angeregten Bereich lagen.

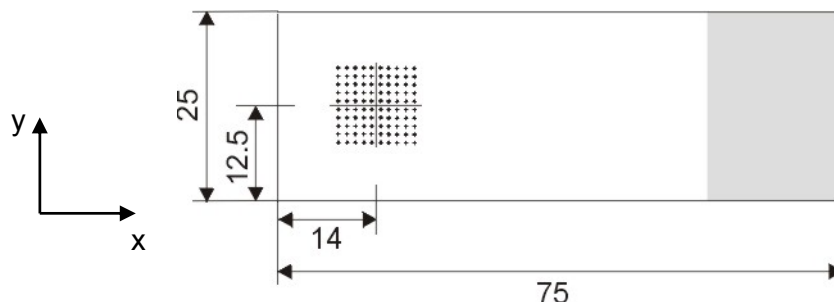


Abb. 10 Positionierung des Sondenarrays auf den Glasobjektträgern der DNA-Sensorchips

Bsp.: 10x10-Array mit Spotabstand von 1 mm; Angaben in mm

4.5.4 Durchführung der Messungen

Nach der Immobilisierung der DNA-Fangsonden auf den Glasobjektträgern wurde zunächst der Sensorchip aus den Einzelkomponenten mit Hilfe einer Montagevorrichtung zusammen-

gebaut (vgl. 4.5.3 und [79]). Anschließend wurde auf die Unterseite des Objektträgers ein Tropfen Silikonöl aufgebracht, bevor der Sensorchip in die Chiphalterung des Auslesegerätes gelegt und auf das Glasprisma abgesenkt wurde. Nach ca. 5 min hatte sich ein gleichmäßiger Ölfilm zwischen Chip und Prisma ausgebildet und das System war messbereit. Es wurden normalerweise 120 µl der in Standardhybridisierungspuffer angesetzten Verdünnung der jeweiligen Targetoligonukleotide in den Probencontainer des Sensorchips pipettiert, die Verschlussklappe zum Ausschluss von Umgebungslicht aufgesetzt und die Messung mit einer Fließrate von 1 µl/s sowie einer Belichtungszeit von 5 s gestartet. Während der Messung wurde alle 7 s ein neues Bild aufgenommen. Die Aufnahmen der CCD-Kamera wurden dabei im Modus des 2x2-Binnings gespeichert. Dabei wurden je 2x2 der insgesamt 1024x1024 Pixel zu einem Wert zusammengefasst, wodurch der Speicherplatzbedarf der Messdaten verringert wurde bei gleichzeitig noch ausreichend großer Auflösung der Bildinformation. Da mit einem Sensorchip mehrere Messungen durchgeführt werden können, wurde der Sensorchip nach erfolgter Hybridisierung durch Spülen mit 1x 200 µl Regenerierungslösung und anschließend 2x 200 µl Waschpuffer bei einer Fließrate von jeweils 25 µl/s regeneriert. Danach konnte eine neue Messung gestartet werden.

Die Einzelkomponenten des Sensorchips konnten teilweise mehrfach verwendet werden. So wurden die Chips nach Gebrauch für einige Stunden in Rotisol™ (Carl Roth, Karlsruhe) eingelegt, woraufhin die Klebefilme entfernt und die Kunststoffkomponenten nach weiterer Reinigung mit Ethanol erneut benutzt werden konnten.

Messungen zu kinetischen Untersuchungen

Neben der Assoziationsphase konnten mit dem DNA-Biosensorsystem auch das Gleichgewicht sowie die Dissoziationsphase der Hybridisierungsreaktion verfolgt werden. Dazu wurde zunächst bewusst eine verringerte Konzentration der immobilisierten Fangsonde gewählt, da sonst das Sättigungsniveau der Anbindung des entsprechenden Target-Oligonukleotids erst sehr spät oder gar nicht in realistischen Zeiträumen erreicht worden wäre. Bei den hier beschriebenen Messungen wurde zumeist eine Sondenkonzentration von 0.14 µM verwendet. Dann wurde die Anbindung des in Standardhybridisierungspuffer verdünnten Targets bei einer Fließrate von 0.5 µl/s zunächst bis zum Erreichen des Sättigungsniveaus verfolgt. Dabei war zu berücksichtigen, dass je nach eingesetzter Targetkonzentration der Zeitpunkt, zu dem das Sättigungsniveau erreicht wurde, variierte, während das Probenvolumen für eine Messung auf 200 µl limitiert war. Dementsprechend wurden teilweise mehrere Messungen mit jeweils 200 µl Targetlösung in direkter Folge ohne zwischengeschaltete Waschschriffe durchgeführt. Nach Verlauf des Messsignals in Sättigung wurde direkt im Anschluss - ebenfalls ohne Regenerierung des Sensorchips - bei gleicher Fließrate unter Durchfluss von reinem Hybridisierungspuffer wiederum mehrfach in 400s-Intervallen

gemessen und die Dissoziationsphase beobachtet. Die nötige Anzahl der aufeinander folgenden Messungen zur Beobachtung der Assoziationsphase bis zum tatsächlichen Erreichen des Sättigungsniveaus konnte dabei nur aus Erfahrungswerten für die verschiedenen Targetkonzentrationen abgeschätzt werden, da zwischen den Einzelmessungen nur möglichst schnell der Probencontainer nachgefüllt werden musste und die Auswertung der Messungen erst nach deren Abschluss erfolgen konnte. Solche Sensorchips, auf denen mit relativ hohen Targetkonzentrationen einmal das Gleichgewicht der Hybridisierungsreaktion eingestellt worden war, wurden im Anschluss an die Messungen zum kinetischen Verlauf nicht mehr regeneriert und wieder verwendet, da die vollständige Ablösung der Target-Oligonukleotide und die einwandfreie Funktionsweise der Sensorchips nicht mehr gewährleistet werden konnten.

Messung von PCR-Produkten

Die Messungen mit Cy5-markierten PCR-Produkten unterschieden sich von denen mit Target-Oligonukleotiden nur bezüglich des Ansatzens der Probenlösung, da die PCR-Produkte üblicherweise vor der Hybridisierung alkalisch denaturiert wurden. Das Endvolumen der Probenlösung betrug auch bei allen Messungen mit PCR-Produkten 120 µl. Bei der Herstellung der Probenlösung war entscheidend, dass diese letztlich als Basis die gleiche Zusammensetzung wie der Standardhybridisierungspuffer 0.5xUH/50%FA (1 Teil H₂O + 1 Teil FA + 2 Teile UH) aufweisen sollte. Für eine Messung wurden jeweils wenige µl PCR-Produkt eingesetzt. Bei der Vermessung der PCR-Produkte von den Realproben wurden z.B., wenn nicht anders vermerkt, immer 4 µl PCR-Produkt verwendet. Die Probenlösung wurde daraus jeweils nach folgendem Schema erhalten:

- Mischung A: 1 Teil PCR-Produkt + 1 Teil 0.2 N NaOH, jedoch maximal 15 µl NaOH; mischen und zentrifugieren
- Mischung B: (30 µl – Volumen Mischung A) H₂O + 30 µl FA + 60 µl UH, mischen und zentrifugieren
- Mischungen A und B vereinen, schnell mischen, zentrifugieren und sofort vermessen

In einzelnen Fällen, u.a. bei Messungen mit mehr als 15 µl PCR-Produkt, wurde thermisch denaturiert. Dazu wurde beim Ansetzen der Probenlösung der NaOH-Anteil durch reines H₂O ersetzt und die Probenlösung vor der Messung 5 min bei 100°C inkubiert und 1 min auf Eis abgeschreckt.

4.5.5 Auswertung der Messungen

Dass das Fluoreszenzsignal bei der Hybridisierung im DNA-Sensorchip tatsächlich linear mit der Zeit ansteigt, zeigt Abb. 11 C. Dargestellt ist der Verlauf des Fluoreszenzsignals auf einem Pixel innerhalb eines Sondenspots, erhalten aus den Bildern der CCD-Kamera,

welche die Fluoreszenz auf der Fließkanaloberfläche während einer Messung in regelmäßigen Abständen aufgenommen hat. Abb. 11 A zeigt die Chipoberfläche zu Beginn der Messung, wo noch keine Hybridisierung stattgefunden hat und lediglich drei immobilisierte Cy5-Oligonukleotide als Positionsmarker zu erkennen sind. Die Signalintensitäten sind hier in einer Falschfarbenskalierung dargestellt. Dadurch wird das eigentlich im Graustufenformat aufgenommene Bild der CCD-Kamera für das menschliche Auge leichter zu interpretieren. In Abb. 11 B ist die Fluoreszenz auf der Fließkanaloberfläche am Ende der Messung nach 120 s zu erkennen, nachdem in diesem Fall das Modelltarget Actin-51-Cy5 mit dem 10x10-Array der komplementären Actin-45-0mm-Sonde hybridisiert ist. Zu sehen sind daher zum einen nach wie vor die drei Referenzspots sowie zum anderen die 100 Spots, an denen die Hybridisierung stattgefunden hat. Erkennbar ist hier auch die inhomogene Ausleuchtung der sensitiven Oberfläche, die sich durch das Intensitätsprofil des Laserstrahls ergibt (vgl. 4.5.2). Bei der Auswertung der CCD-Bilder wurden nun aufgrund der linearen Bindungskinetiken nicht die absoluten Fluoreszenzsignale am Ende der Messung betrachtet, sondern stets Signalsteigungen in definierten Zeiträumen. Ein entsprechendes 2D-Steigungsbild für die hier betrachtete Messung zeigt Abb. 11 D. Darin wurden die Steigungswerte im Zeitraum 60-120 s für jeden einzelnen Pixel in der Einheit [counts/s] gebildet und ebenfalls in Falschfarben dargestellt. Die Positionsmarker sind hier nicht mehr zu erkennen, da sich bei ihnen das Signal über die Zeit entweder nicht änderte oder teilweise sogar etwas verringerte, so dass negative Steigungswerte beobachtet wurden.

Das Steigungsbild verdeutlicht den Vorteil der Methode, dass durch die lineare Regression nämlich eine Auswertung unabhängig vom inhomogenen Fluoreszenzhintergrund auf der sensitiven Fläche (Abb. 11 B) möglich ist. Dennoch zeigt sich im Steigungsbild die inhomogene Anregung der Sondensspots aber noch dadurch, dass die Steigungswerte für die verschiedenen Spots ein Intensitätsprofil mit einem Maximum im Zentrum des Arrays bilden, obwohl hier eigentlich an allen Spots die gleiche Anbindung stattgefunden hat. Zum einen wurden jedoch verschiedene Methoden zur Korrektur dieser Abweichungen entwickelt (vgl. 4.5.6), zum anderen ist der in Abb. 11 betrachtete sensitive Bereich mit einem Modell-Array von 9 mm x 9 mm deutlich größer als die sonst in dieser Arbeit immobilisierten und quantitativ ausgewerteten Arrays. Üblicherweise lagen die Spots dann bei engerem Abstand in einem kleineren und relativ homogen ausgeleuchteten Bereich von maximal 3.5 mm x 3.5 mm.

Die in Abb. 11 dargestellten Falschfarbenbilder wurden mit dem eigens am ICB entwickelten Programm *Exprimage* erhalten. Dabei handelt es sich um ein *Matlab Programm*TM, das eine Benutzeroberfläche unter *Windows*TM schafft und die gesamte Auswertung der aufgenommenen CCD-Bilder ermöglicht. Die Verarbeitung der Daten erfolgt dabei schrittweise durch Einzelbefehle wie etwa zum Festlegen des Datenordners, Einlesen der darin gespeicherten

Bilddaten, Festlegen einer Zeitachse für die betrachtete Messung, Kontrollieren des Signalverlaufs auf einzelnen Pixeln, Generieren des Steigungsbildes sowie zur Quantifizierung der dabei erhaltenen Werte (vgl. auch [79]).

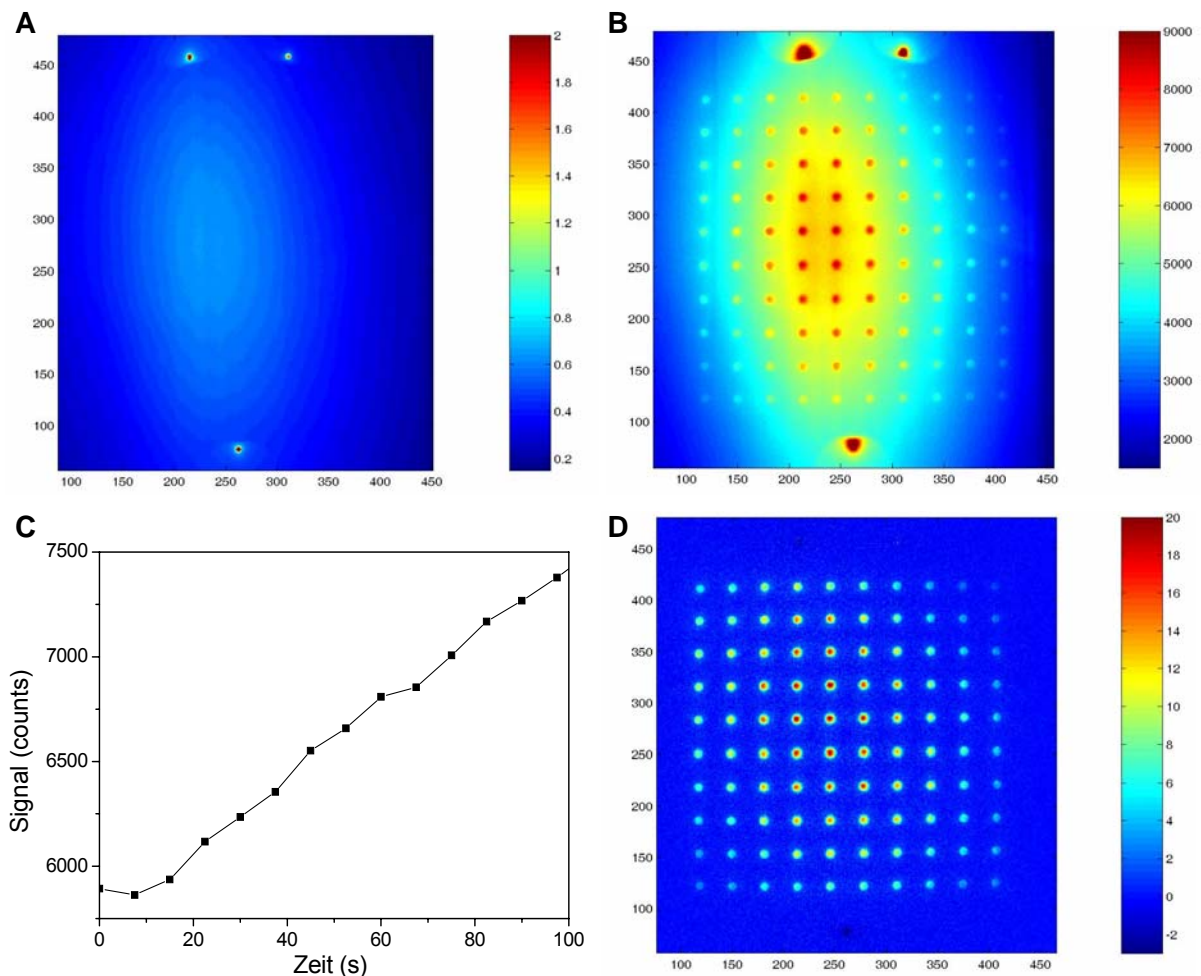


Abb. 11 Entwicklung der Fluoreszenzsignale während der Hybridisierungsreaktion

Hybridisierung von 0.5 nM Actin-51-Cy5 auf einem 10x10-Array von Actin-45-0mm (1 mm Spotabstand); Auswertung der CCD-Daten mit Software *Exprimage*, Darstellung in Falschfarben (Einheit: counts); **A:** $t = 0$ s, vor der Hybridisierung; **B:** $t = 120$ s, nach der Hybridisierung; **C:** Bindungskinetik innerhalb eines Pixels in einem Sondenspot; **D:** Signalsteigungen in [counts/s] im Bereich 60-120 s für alle Pixel

Um die Signalsteigungen der einzelnen Sondenspots zu quantifizieren, wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden angewendet. So wurde zum einen über den maximalen Wert innerhalb des Spots und zum anderen über den Mittelwert seiner gesamten Fläche ausgewertet, die im Modus des 2x2-Binnings üblicherweise einen Durchmesser von ca. 13 Pixeln hatte. Beide Methoden wurden von Dipl.-Chem. Eric Frauendorfer als Anwendungen für *Exprimage* programmiert. In beiden Verfahren integriert war ein Schritt, bei dem die Steigungswerte in den Spots um den Anteil der Signaländerung des Hintergrundes korrigiert wurden. Es wurden zwar aufgrund der gewählten Immobilisierungsmethode mit dem integrierten Blockschrift keine systematischen unspezifischen Anbindungen an der

Chipoberfläche beobachtet und das Hintergrundsignal zeigte bei den meisten Messungen keine signifikante Änderung, allerdings traten bei manchen Messungen dennoch im Mittel gering positive aber auch negative Änderungen des Hintergrundsignals auf. Um eine bessere Reproduzierbarkeit zwischen den verschiedenen Messungen zu gewährleisten, wurde daher routinemäßig bei Bestimmung der Steigungswerte der Signalhintergrund von den Sondenspots abgezogen.

4.5.5.1 Maximumsmethode

Zu Beginn der hier durchgeführten Arbeiten stand lediglich die Maximumsmethode für die Datenauswertung zur Verfügung. Entsprechend sind im Ergebnisteil die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse mit einem „MAX“ in der Legende gekennzeichnet. Alle Ergebnisse mit der Kennzeichnung „MW“ wurden dagegen mit der Mittelwertmethode erhalten.

Bei der Maximumsmethode erfolgte die Hintergrundkorrektur zunächst durch die Generierung einer sog. Basismatrix. Dabei handelt es sich um ein dreidimensionales Gitter, welches dadurch erzeugt wurde, dass wie in Abb. 12 dargestellt zunächst mit der *Exprimage*-Anwendung „Einzelbild ohne base“ ein Raster auf dem Steigungsbild so positioniert wurde, dass die Linien des Rasters jeweils auf dem Signalhintergrund zentral zwischen den Spotpositionen im Array lagen. Die Matrix wurde dann durch die auf den Rasterlinien liegenden Signalwerte sowie durch Interpolation der Werte auf den dazwischen eingeschlossenen Flächen erhalten. Zur Hintergrundkorrektur der Daten erfolgte die Subtraktion der Matrix vom Steigungsbild. Die Auswirkung dieses Schrittes auf die Daten lässt sich am besten in einer eindimensionalen Darstellung verdeutlichen. Da diese Methode der Hintergrundkorrektur bei speziellen Fragestellungen ebenso auf das Endbild der Hybridisierungsmessung angewendet werden kann und die Auswirkung der Korrektur dabei noch deutlicher wird, ist in Abb. 13 die Signalintensität entlang einer Achse durch fünf verschiedene Spots in einem Endbild vor (A) und nach (B) der Korrektur dargestellt. Während in A der inhomogene Hintergrund aufgrund des Ausleuchtungsprofils als Basis der Signalpeaks noch deutlich zu erkennen ist, sind die Peaks in B alle auf das gleiche Ausgangsniveau zurückgesetzt.

Ausgehend von dem hintergrundkorrigierten Steigungsbild wurde dann die eigentliche Quantifizierung vorgenommen. Dafür wurde durch die *Exprimage*-Anwendung „Markerauswertung“ erneut ein Raster wie in Abb. 12 über dem korrigierten Steigungsbild positioniert und innerhalb der einzelnen Zellen das Pixel mit der maximalen Intensität bestimmt. Die dabei im *Matlab*TM-Fenster (ähnlich dem in Abb. 15) erhaltenen Werte in [counts/s] charakterisierten die maximalen Signalsteigungen der in den jeweiligen Zellen positionierten Sondenspots.

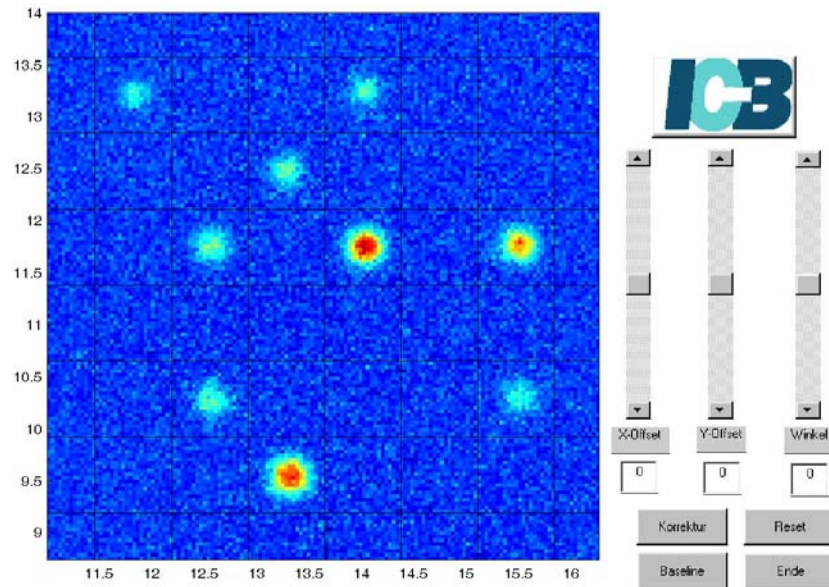


Abb. 12 Positionierung des Rasters zur Generierung der Basismatrix

Dargestellt ist das nach dem Befehl „Einzelbild ohne base“ geöffnete Fenster der Software *Exprimage* für die Anwendung auf ein 6x6-Array verschiedener Sonden, auf denen nur teilweise Hybridisierung stattgefunden hat. Mit den Werkzeugen im rechten Teil des Fensters können das Raster (schwarze Linien) positioniert und die Berechnung der Matrix gestartet werden.

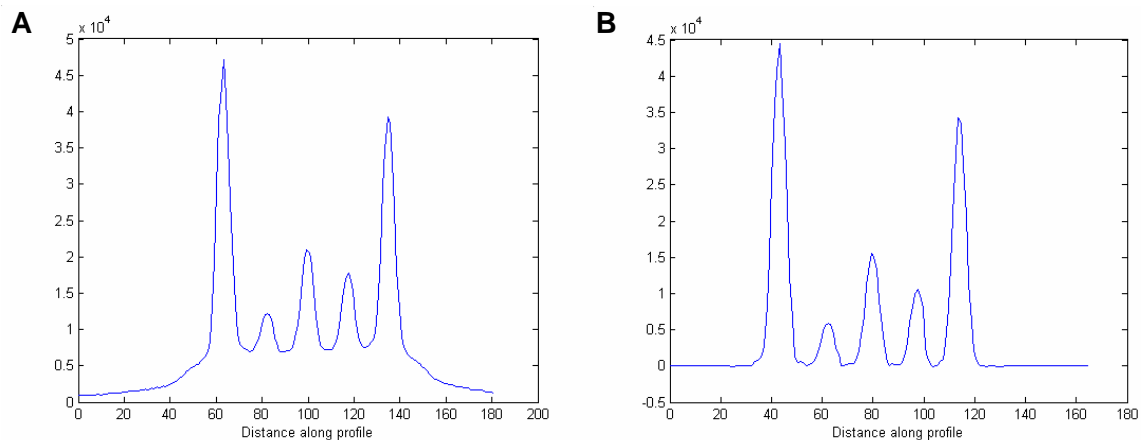


Abb. 13 Auswirkung der Hintergrundkorrektur mit einer Basismatrix auf ein Endbild

Dargestellt ist ein Querschnitt durch fünf Spots in einem Endbild. **A:** vor und **B:** nach der Korrektur. Einheit der y-Achse: counts.

4.5.5.2 Mittelwertmethode

Die Mittelwertmethode zur Quantifizierung der Sondenspots wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Eric Frauendorfer entwickelt. Dabei erfolgte die Bestimmung der gemittelten Signalsteigungen für Hintergrundpositionen sowie für die Sondenspots in einem Schritt, woraufhin die Korrektur der Werte erst anschließend in *Excel*TM (Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt wurde. Zunächst wurde durch die *Exprimage*-Anwendung „Markerauswertung“ ein deutlich größeres Raster mit kleineren Zellen als bei der Maximumsauswertung auf dem

Sondenarray positioniert (Abb. 14). Die Sondenspots waren dabei eng von einer einzelnen Zelle eingeschlossen und gleichzeitig von neun entsprechend großen Zellen umgeben.

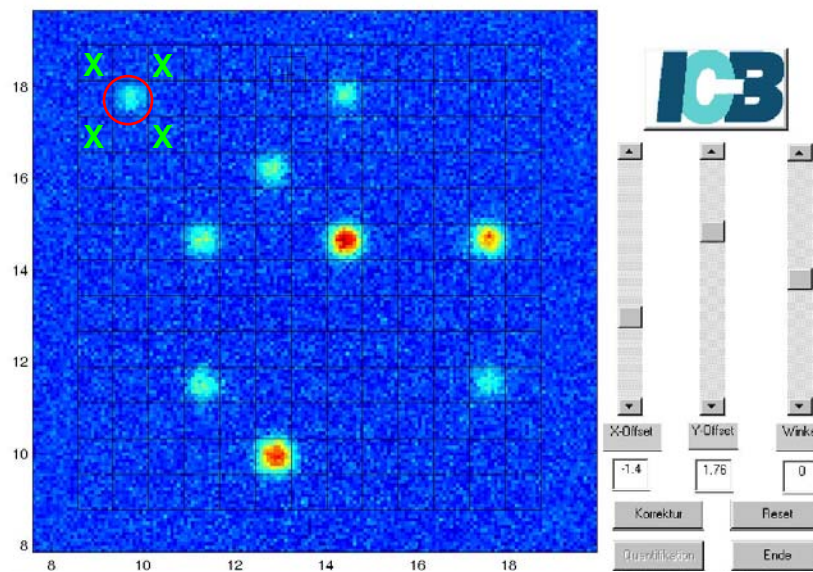


Abb. 14 Positionierung des Rasters für die Mittelwertauswertung

Dargestellt ist das nach dem Befehl „Markerauswertung“ geöffnete Fenster der Software *Exprimage* für die Anwendung auf denselben 6x6-Array wie in Abb. 12. Mit den Werkzeugen im rechten Teil des Fensters kann das Raster (schwarze Linien) positioniert und die Berechnung der Mittelwerte in den Zellen des Rasters gestartet werden. **X**: Felder zur Berechnung des Hintergrundwertes für den rot markierten Sondenspot.

Nach Ausrichtung des Rasters wurde für jede Zelle der Mittelwert (MW) der Intensitäten der enthaltenen Pixel berechnet. Der Wert für die Hintergrundanbindung um einen Sondenspot ergab sich dabei durch Bildung des Mittelwertes der vier diagonal um den jeweiligen Spot angeordneten Zellen (Abb. 14), gleichzeitig wurde die Standardabweichung (*standard deviation*, SD) über diese vier Zellen berechnet. Integriert in die Berechnung wurde gleichzeitig eine Spotkontrolle im Sinne einer Ja/Nein-Antwort, durch die ein Sondenspot mit „1“ markiert wurde, wenn an ihm keine Anbindung zu erkennen war, und mit „0“, wenn eine Hybridisierung auch rechnerisch bestätigt werden konnte. Als Basis für diese Beurteilung diente dabei die Standardabweichung des Hintergrundes, so wurde eine „0“ zugeteilt, wenn die Summe aus der 2fachen SD und dem Hintergrundwert noch unter dem Mittelwert des zugehörigen Sondenspots lag. Alternativ konnte hier zugunsten einer größeren Sicherheit des Ergebnisses auch mit der 3fachen SD gearbeitet werden. Die gesamte Berechnung der beschriebenen Werte wurde in einem Schritt von *Matlab*TM durchgeführt und die erhaltenen Daten wurden im *Matlab*TM-Fenster dargestellt. Abb. 15 zeigt das entsprechende Ergebnis für das in Abb. 14 behandelte Steigungsbild. Die Daten wurden dann in einem *Excel*TM-File gespeichert, in dem schließlich noch die Hintergrundwerte der jeweiligen Positionen im Array von den korrespondierenden Spotsignalen abgezogen wurden.

```

MATLAB
File Edit View Web Window Help
Current Directory: D:\0304\c03042

Values at "true" spots:
1.58 -0.07 0.05 1.71 -0.11 -0.11
0.03 -0.10 2.31 -0.21 -0.18 -0.13
-0.08 2.43 -0.13 5.81 -0.15 4.40
-0.15 -0.23 -0.33 -0.21 -0.20 -0.13
-0.11 2.38 -0.21 -0.23 -0.05 1.89
-0.04 -0.00 6.19 -0.24 -0.13 -0.24

Background at "true" spots:
0.01 -0.06 -0.09 -0.06 -0.07 -0.03
-0.07 -0.10 -0.09 -0.08 -0.09 -0.04
-0.21 -0.19 -0.16 -0.18 -0.19 -0.12
-0.18 -0.21 -0.23 -0.22 -0.24 -0.17
-0.06 -0.11 -0.18 -0.18 -0.16 -0.12
-0.03 -0.12 -0.18 -0.18 -0.15 -0.14

Std around "true" spots:
0.06 0.09 0.08 0.08 0.06 0.03
0.13 0.07 0.08 0.11 0.10 0.02
0.07 0.09 0.14 0.13 0.09 0.10
0.08 0.07 0.06 0.03 0.03 0.12
0.08 0.09 0.02 0.04 0.10 0.12
0.08 0.10 0.02 0.06 0.10 0.07

Flags with cutoff=-2 :
0 1 1 0 1 1
1 1 0 1 1 1
1 0 1 0 1 0
1 1 1 1 1 1
1 0 1 1 1 0
1 1 0 1 1 1

```

Abb. 15 *Matlab*TM-Fenster mit Ergebnissen der Quantifizierung nach der Mittelwertmethode

Block 1: MW der Zellen auf den 6x6 Sondenspots; Block 2: Hintergrundsignale der 6x6 Sondenspots; Block 3: SD der Hintergrundsignale; Block 4: Bewertung der Signalstärke auf den verschiedenen Sondenspots mit „0“ = Hybridisierung signifikant und „1“ = keine Anbindung.

4.5.5.3 Bestimmung kinetischer Konstanten

Auf Grundlage der Messungen zur Betrachtung der Abfolge von Assoziation, Gleichgewicht und Dissoziation der Hybridisierung erfolgte die Bestimmung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} sowie der Gleichgewichtskonstante der Dissoziation K_D . Für die Berechnung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{off} wurden die Dissoziationsverläufe, wie in 3.1.2.3 hergeleitet, einer exponentiellen Funktion erster Ordnung angepasst entsprechend Gl. 11:

$$R(t) = R_0' + R(t_D) \exp(-k_{off}(t-t_D)) \quad (\text{Gl. 11})$$

Das Fluoreszenzsignal R_{eq} wurde durch hyperbolischen Fit der Assoziationsverläufe als Differenz der Signalintensitäten im Gleichgewicht und zu Beginn der Assoziation erhalten. Durch Auftragung von R_{eq} gegen die Targetkonzentration für die aufgenommenen Sättigungsverläufe wurden mit Hilfe der hyperbolischen Ausgleichsfunktion

$$R_{eq} = \frac{R_{max} \cdot c}{K_D + c} \quad (\text{Gl. 8}),$$

welche sich analog zur Michaelis-Menten-Kinetik verhält, der Wert für das maximal erreichbare Fluoreszenzsignal R_{\max} und aus dem x-Achsenabschnitt bei $R_{\text{eq}} = 0.5 R_{\max}$ die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation K_D bestimmt. Über

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (\text{Gl. 7})$$

konnte dann die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} ermittelt und mit dem aus der Anfangssteigung des Fluoreszenzsignals in der Assoziationsphase nach

$$dR/dt = k_{\text{on}}cR_{\max} \quad (\text{Gl. 5})$$

erhaltenen Wert verglichen werden.

4.5.6 Methoden zur Korrektur des Ausleuchtungsprofils

Zur Korrektur der aufgrund der optischen Anordnung ungleichen Fluoreszenzanregung innerhalb der Sondenarrays wurden zwei verschiedene Methoden getestet und miteinander verglichen.

4.5.6.1 Verwendung einer Korrekturmatrix

Zunächst wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem zur Einschätzung des Intensitätsprofils sowie zur Generierung der Korrekturfaktoren ein separater Sensorchip vermessen wurde. Auf dem Sensorchip wurde zu diesem Zweck eine einzige Sonde (z.B. c-erb-47-0mm, 5 μM) in einem 8x7-Array immobilisiert und anschließend mit dem komplementären Modelltarget (z.B. c-erb-50-Cy5) hybridisiert. Das dabei erhaltene Endbild wurde zunächst wie in 4.5.5.1 dargestellt mit Hilfe einer Basismatrix untergrundkorrigiert. Aus den resultierenden Signalintensitäten der Sondenspots wurden dann sowohl lokale Korrekturfaktoren als auch eine dreidimensionale Korrekturmatrix durch Interpolation der Werte zwischen den Spotpositionen erstellt. Zur Bestimmung der Werte wurden jeweils mehrere Messungen mit einer relativ hohen Targetkonzentration (z.B. 0.2 nM) durchgeführt, um deutliche Signalintensitäten zu erhalten und die Korrekturfaktoren statistisch bewerten zu können. Diese Korrekturfaktoren bzw. die Korrekturmatrix wurden dann auf die untergrundkorrigierten Steigungswerte von Sondenspots auf beliebigen anderen Sensorchips angewendet, um die unterschiedliche Ausleuchtungsstärke möglichst zu kompensieren. Ein 8x7-Array mit einem Spotabstand von 0.7 mm wurde für den sog. Korrektur-Chip gewählt, um mit der daraus erstellten Korrekturmatrix die häufig verwendeten und analog im Ausleuchtungsprofil positionierten 6x5- bzw. 5x5-Arrays (Spotabstand ebenfalls 0.7 mm) normieren zu können.

4.5.6.2 Spotinterne Korrektur

Bei einer zweiten Methode zum Ausgleich der inhomogenen Ausleuchtung wurde die Generierung der Korrekturfaktoren auf jedem einzelnen Sondenarray integriert. Dazu wurde in einem Spot jeweils eine Mischung mit einer Gesamt-DNA-Konzentration von $6 \mu\text{M}$ bestehend aus der eigentlichen Zielsonde ($4.8 \mu\text{M}$) und der Sonde NPT1-18-0mm ($1.2 \mu\text{M}$) als Referenz immobilisiert. Zu Beginn der Messungen auf dem Sensorchip wurde dann zunächst mehrfach mit dem komplementären Referenztarget NPT1-18-Cy5 in einer relativ hohen Konzentration (z.B. 1 nM) hybridisiert. Aus den dabei erhaltenen Steigungswerten wurden Korrekturfaktoren für die einzelnen Spotpositionen bestimmt. Nach dieser Charakterisierung des jeweiligen Sensorchips wurden die Korrekturfaktoren auf die untergrundkorrigierten Steigungsbilder von Hybridisierungsmessungen der eigentlichen Zielsequenzen angewendet.

4.6 Methode der konventionellen Chiphybridisierung

4.6.1 Durchführung der Hybridisierung unter dem Deckgläschen

Bei den Versuchen zur konventionellen Chiphybridisierung wurden als Glasträger nur die Objektträger im Standardformat (Sigma-Aldrich) verwendet, auf denen der Sondenarray zweifach in angemessenem Abstand immobilisiert wurde (Abb. 16 A). Die Anordnung der Sonden innerhalb des Arrays erfolgte dabei immer nach dem gleichen Prinzip mit großer Redundanz. Es wurden üblicherweise bei einem Spotabstand von 0.7 mm zehn verschiedene Sondensequenzen in zwei Reihen à 5 Spots untereinander immobilisiert. Drei dieser identischen Doppelreihen ergaben einen Array, der wiederum viermal innerhalb eines Meta-Arrays aufgebracht wurde (Abb. 16 B).

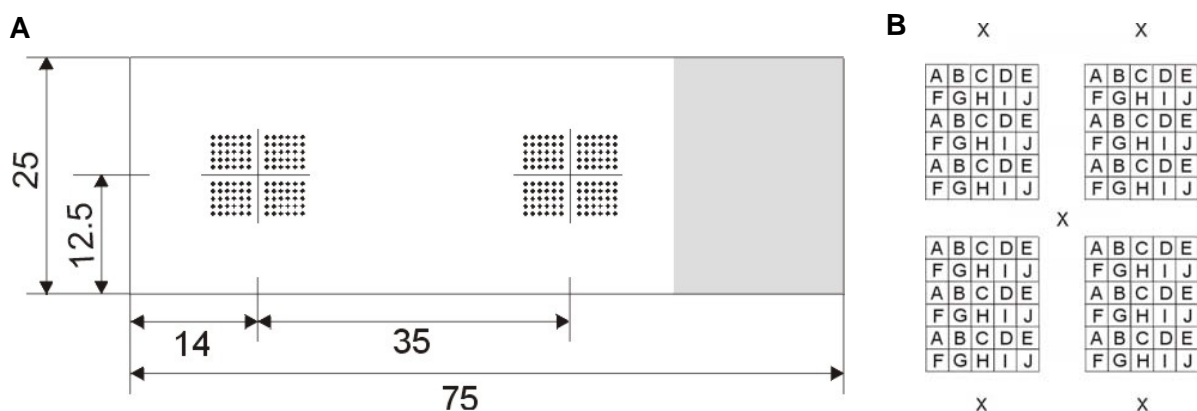


Abb. 16 Sondenimmobilisierung bei konventioneller Chiphybridisierung

A: Positionierung der Sondenarrays auf den Glasobjektträgern, **B:** Schema der immobilisierten Sondenarrays mit zehn verschiedenen Sondensequenzen A-J, X: Positionsmarker

Für die Hybridisierung unter dem Deckgläschen wurden ausschließlich Cy5-markierte PCR-Produkte eingesetzt. Dabei wurden jeweils 3.25 µl PCR-Produkt in Standardhybridisierungspuffer auf 13 µl Probenlösung verdünnt, 10 min bei 100°C denaturiert, auf Eis mindestens 1 min abgeschreckt und mit einer Pipette mittig auf den immobilisierten Sondenarray aufgebracht. Zur genauen Positionierung der Lösung auf dem Sondenarray wurde der Glasobjektträger auf eine entsprechende Schablone gelegt. Die Probenlösung wurde dann mit einem zuvor mit Ethanol gereinigten 20mmx20mm-Deckgläschen (VWR, Darmstadt) bedeckt (Abb. 17) und der Objektträger in einer Feuchtbox 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Targetmoleküle wurde er anschließend in einer Schale bei RT dreimal jeweils 5 min in folgenden Lösungen unter Erhöhung der Stringenz gewaschen:

1. 2x SSC / 0.1 % SDS
2. 1x SSC / 0.1 % SDS
3. 0.5x SSC

Nach einem letzten Waschschrift unter fließendem VE-Wasser für ca. 10 s wurde der Glasobjektträger im Stickstoffstrom getrocknet und bis zum Auslesen am Mikroarray-Scanner bei 4°C gelagert.

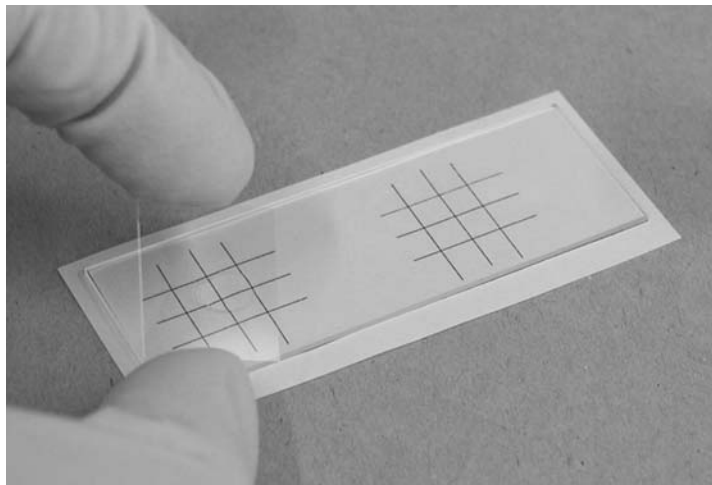


Abb. 17 Durchführung der Hybridisierung unter dem Deckgläschen

Die Arraypositionen werden durch eine Schablone unter dem Objektträger angedeutet. Auf dem linken Meta-Array befindet sich bereits die Probenlösung und das Deckgläschen wird vorsichtig aufgelegt.

4.6.2 Auslesen der hybridisierten Glasobjektträger

Die hybridisierten Glasobjektträger wurden in einem GMS418 Mikroarray-Scanner (MWG-Biotech, Ebersberg) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. Funke am Institut für Klinische Chemie der Universität Münster ausgelesen. Das Gerät ermöglicht die Anregung der Fluorophore Cy3 und Cy5 durch zwei integrierte Laserquellen der Wellenlängen 532 und 635 nm und detektiert die angeregte Fluoreszenzstrahlung mittels eines Photomultipliers

(*photomultiplier tube*, PMT). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem roten Laser bei 635 nm gearbeitet, wobei die Intensität der Anregung über die gesamte Oberfläche eines Objektträgers relativ homogen verteilt war. Mit Hilfe der Software *GMS418 ArrayScanner* wurden die Messungen gesteuert und die aufgenommenen Fluoreszenzbilder betrachtet. Für eine Messung wurde immer nur ein einzelner Glasobjektträger in den Zufuhrschacht des Gerätes gelegt, automatisch eingezogen und mit den eingestellten Parametern gescannt. Variabel waren dabei die Laserleistung (*laser power*, LP), die Verstärkung (*gain*) des Photomultipliers sowie die Größe der gescannten Oberfläche zu wählen. Wenn nicht anders vermerkt, wurde mit 100 % LP gescannt, während die prozentuale PMT-*gain*-Einstellung je nach Intensität der hybridisierten Sondenspots angepasst wurde, um eine Sättigung des Signals zu vermeiden. Die erhaltenen Bilder wurden im 16bit-Graustufenformat als tif-Dateien gespeichert.

4.6.3 Auswertung der Fluoreszenzbilder

Die Auswertung der am Mikroarrayscanner erhaltenen Bilder erfolgte mit der Software *GenePix ProTM* (Axon Instruments, Foster City, USA), die als Demo-Version zur Verfügung stand. Sie gliedert sich in verschiedene Benutzeroberflächen und ist grundsätzlich für die Analyse von Mikroarrays, auf denen Fluoreszenzmuster auf Basis zweier verschiedener Wellenlängen mit beliebigen Arrayscannern erhalten werden, geeignet. In dieser Arbeit wurden die Bilder zunächst im Anwendungsfenster „*Image*“ geöffnet und durch Bildbearbeitung wie Helligkeit, Kontrast oder Falschfarbendarstellung optimal visualisiert. Anschließend wurde ein dem Format des immobilisierten Sondenarrays entsprechendes Raster über dem Bild positioniert und automatisch vom Programm optimal an den erleuchteten Sondenspots ausgerichtet (Abb. 18). Durch Anklicken des „*Analyze*“-Buttons wurden dann die Daten für jeden einzelnen Spot innerhalb des Rasters berechnet und im „*Results*“-Fenster dargestellt. Dabei wurden zum einen die Mittelwerte innerhalb der angepassten Kreisfelder als Spotintensitäten berechnet (*F2Mean*). Zum anderen wurde als Hintergrundintensität eines Spots der Mittelwert über alle Pixel innerhalb der kreisförmigen Umgebung eines Spots gebildet (*B2Mean*), wobei die Grenze dieses Umgebungsbereiches durch den dreifachen Durchmesser des jeweiligen Kreisfeldes bestimmt war und benachbarte Spots ignoriert wurden. Die einzelnen Werte wurden ebenso wie die hintergrundkorrigierten Spotintensitäten (*F2Mean-B2*) sowie die Rasterkoordinaten des betrachteten Spots bei den Ergebnissen angegeben.

Routinemäßig wurde nur einer der vier Arrays innerhalb des Meta-Arrays ausgewertet und über die jeweils drei Sondenspots gemittelt zur Generierung des Endergebnisses. Nur in einzelnen Fällen wurde über alle $n = 12$ Spots des Meta-Arrays gemittelt.

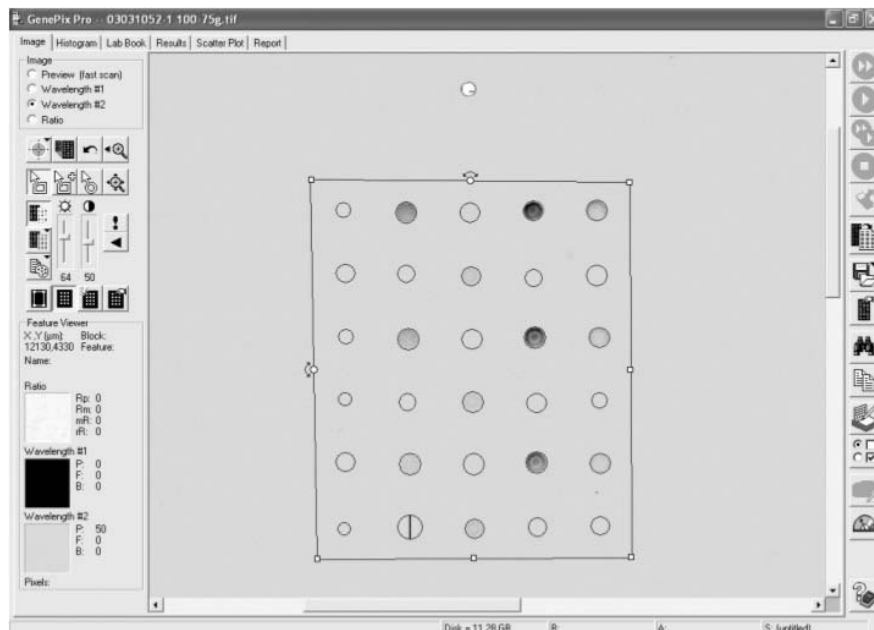


Abb. 18 Benutzeroberfläche der Software *GenePix Pro*TM zur Bildauswertung

Dargestellt ist das ausgerichtete Kreisraster über einem der vier 6x5-Arrays eines hybridisierten Sondenarrays im „Image“-Fenster.

4.7 Allgemeine Fehlerbetrachtung

Jedes analytische Verfahren kann in seiner Qualität sowohl nach Präzision als auch nach Richtigkeit beurteilt werden. Während die Präzision eingeschränkt wird durch unvermeidliche zufällige Fehler, die in der Statistik erfasst werden, wirken sich auf die Richtigkeit die schwerwiegenden systematischen Fehler aus [35].

Nahezu alle Arbeitsschritte, die dieser Arbeit zugrunde liegen, sind mit einem Fehler behaftet, sowohl die Präparation der Glasobjektträger als auch die Durchführung der Hybridisierungen im Sensorchip und unter dem Deckgläschen sind davon betroffen. Individuelle Fehler traten beispielsweise beim Zusammenbau der Sensorchips auf sowie beim Positionieren der Deckgläschen auf den Objektträgern, unter denen die Probenlösung nie ganz homogen verteilt war. Demgegenüber stehen die statistischen Fehler, die während eines Messvorganges z.B. beim Pipettieren oder durch Temperaturschwankungen entstanden sind. Nicht zu unterschätzen sind z.B. auch gerätetechnische Fehler, wie der Fehler des Dispensers zum Immobilisieren der Fangsonde oder des UV-VIS-Spektrometers zur Quantifizierung der DNA.

Da aber die Größe der einzelnen Fehler nicht in allen Fällen genau bestimmt werden konnte und zudem ihre Zusammenhänge untereinander nicht immer eindeutig waren, konnte eine Fehlerfortpflanzung nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz nicht durchgeführt werden. Es war vielmehr sinnvoll, die statistischen Schwankungen der Messwerte durch wiederholte Messung unter vergleichbaren Bedingungen zu ermitteln, weshalb die Messungen in der Regel

als Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden. Als Repräsentanzgröße wurde der arithmetische Mittelwert \bar{x} berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Gl. 14})$$

mit \bar{x} = Mittelwert, x_i = Messwert, n = Anzahl der Messungen.

Als statistische Kenngröße wurde der Schätzwert für die Standardabweichung σ der Einzelwerte bestimmt, die ein Maß dafür ist, wie weit die jeweiligen Werte um den Mittelwert streuen:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Gl. 15})$$

mit σ = Schätzwert für die Standardabweichung.

Die Anzahl der Einzelmessungen wird bei den Ergebnissen für jedes Experiment individuell angegeben. In den Diagrammen wird die Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt. Teilweise ist bei den Ergebnissen zusätzlich der Variationskoeffizient (VK) als Verhältnis zwischen der Standardabweichung und dem Mittelwert aufgeführt, welcher dem eigentlichen Messfehler entspricht.

Der statistische Fehler bei Messungen mit dem DNA-Sensorchip ist anhand mehrerer Messreihen unter dem Einfluss verschiedener Parameter genauer bestimmt worden (vgl. 5.1.2). Lediglich bei den Versuchen zur konventionellen Chiphybridisierung konnte der statistische Fehler in der Regel nicht ausreichend abgeschätzt werden. So wurden zwar die Schwankungen innerhalb eines Sondenarrays auf Basis der mehrfach immobilisierten Sondenspots bestimmt, eine mehrfache Bestimmung der Proben auf verschiedenen Meta-Arrays wurde allerdings nicht durchgeführt, da der Versuchsaufwand bezüglich der Herstellung einer entsprechenden Anzahl immobilisierter Glasobjektträger zu groß gewesen wäre. Dieser Umstand ist aber aufgrund der Tatsache zu vernachlässigen, dass bei der konventionellen Chiphybridisierung ohnehin nur eine semi-quantitative Aussage erhalten wurde.

Zur Bestimmung der Sensitivität eines Nachweises im DNA-Biosensor wurden Kalibrationskurven aufgenommen. Durch lineare Regression wurde eine Geradengleichung erhalten, deren Steigung der Sensitivität entspricht. Als Nachweisgrenze wurde bei Anwendung der Mittelwertmethode diejenige Targetkonzentration definiert, deren Signal dem Dreifachen der Standardabweichung des Nullwertes entspricht.

5 Ergebnisse

5.1 Grundlagen der Realzeit-Hybridisierung im DNA-Biosensor

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Modell-Oligonukleotiden (vgl. Anhang Tab. 22) die Analyse von DNA-DNA-Wechselwirkungen im DNA-Sensorchip charakterisiert und optimiert. Dabei wurden neben der Immobilisierung der Fangsonden verschiedene Parameter der Hybridisierungsereignisse wie z.B. Spezifität und Reproduzierbarkeit untersucht, um dadurch das Messverfahren besser zu verstehen und auch die kinetischen Grundlagen des Messprinzips genauer zu analysieren. Schließlich wurde der Übergang vom Modell-Targetoligonukleotid zur Detektion von PCR-Produkten demonstriert.

5.1.1 Untersuchungen zur Immobilisierung

5.1.1.1 Optimierung der Sondenkonzentration

Um einen ausreichenden Überschuss der immobilisierten Fangsondemoleküle im Verhältnis zu den Cy5-markierten Targets zu gewährleisten, wurde die Fangsondenkonzentration optimiert. Dazu wurde nach der Standardmethode auf den Sigma-Objektträgern ein Array der Sonde Actin-45-0mm in Konzentrationen von 0.0158 bis 15.8 μM mit je $n = 4$ Spots immobilisiert und mit 0.5 nM Actin-51-Cy5 hybridisiert. Die Signalsteigungen in Abb. 19 zeigen, dass oberhalb einer Sondenkonzentration von 5 μM Sättigung auftrat.

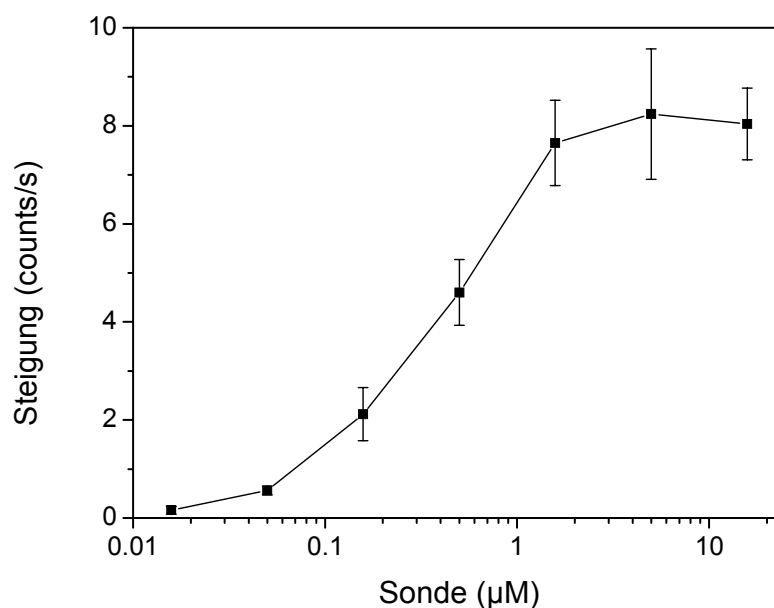


Abb. 19 Optimierung der Fangsondenkonzentration bei der Standardimmobilisierung

Sonde Actin-45-0mm, Target Actin-51-Cy5 0.5 nM, Sigma-Objektträger, keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über $n = 4$ Spots und $n = 3$ Messungen.

Die Fehlerbalken ergaben sich durch das inhomogene Ausleuchtungsprofil, das hier nicht korrigiert wurde. Als Standardsondenkonzentration wurde entsprechend $5 \mu\text{M}$ gewählt. Das Ergebnis erwies sich bei Anwendung der Standardimmobilisierungsmethode als unabhängig vom gewählten Glasträger und wurde z.B. analog auf den kleineren BK7-Glaschips erhalten (Daten nicht gezeigt).

5.1.1.2 Übertragung der Standardmethode auf verschiedene Glasobjektträger

Ein Teil der grundlagenorientierten Untersuchungen des DNA-Biosensorsystems wurde auf den kleineren BK7-Glaschips durchgeführt. Die damit erhaltenen Ergebnisse sind in der Legende entsprechend gekennzeichnet. Im Zuge der Weiterentwicklung des Sensorsystems erfolgten dann aber ein Umbau des Auslesegerätes und der Übergang zu den Glasobjektträgern im Standardformat. Das Standardprotokoll konnte für die Immobilisierung auf den ebenfalls unbehandelten Glasträgern übernommen werden. Getestet wurden die Glasobjektträger von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Menzel-Gläser (Braunschweig) und Marienfeld (Lauda-Königshofen) parallel in einem Ansatz durch Immobilisierung eines 10×10 -Arrays der Sonde Actin-45-0mm mit Spotabstand 1 mm. Anschließend wurde auf jeweils einem Objektträger eine Verdünnungsreihe für das Actin-51-Cy5-Target aufgenommen (Abb. 20).

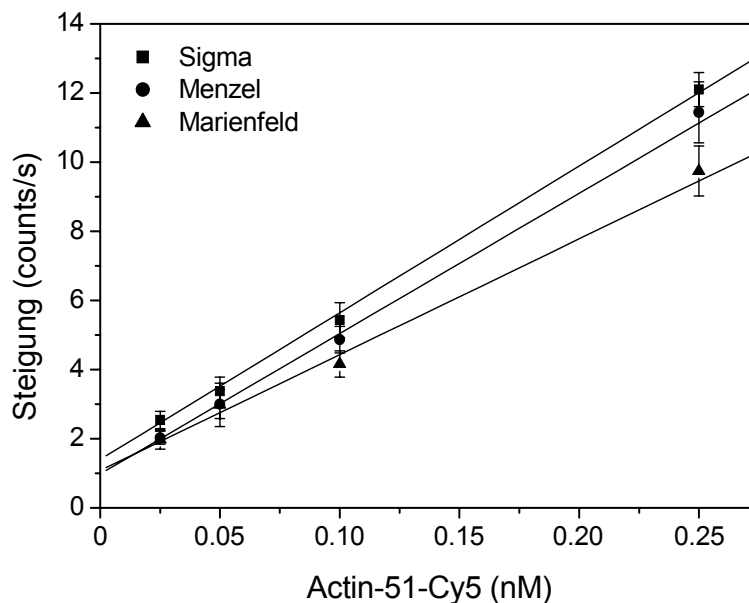


Abb. 20 Actin-51-Cy5-Verdünnungsreihe auf Glasobjektträgern unterschiedlicher Hersteller

Sonde Actin-45-0mm, keine Ausleuchtungskorrektur, MAX-Auswertung über $n = 4$ Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des 10×10 -Arrays und $n = 3$ Messungen.

Dabei ergaben sich Sensitivitäten von $42.4 \pm 2.4 \text{ counts}/(\text{s} \cdot \text{nM})$ für den Sigma-, $40.6 \pm 3.4 \text{ counts}/(\text{s} \cdot \text{nM})$ für den Menzel- und $33.5 \pm 3.2 \text{ counts}/(\text{s} \cdot \text{nM})$ für den Marienfeld-Objektträger. Für alle weiteren Untersuchungen wurden die Sigma-Objektträger verwendet, da sie die größte Sensitivität bewiesen hatten und deutlich besser verarbeitet waren als z.B.

die Menzel-Objektträger, von denen viele durch Kratzer oder Artefakte im Glas von vornherein unbrauchbar für die optische Auswertemethode waren. Aufgrund dieser Tatsache war auch der höhere Preis der Sigma-Objektträger mit 17.5 cent/Stck. im Vergleich zum Menzel-Objektträger mit 7 cent/Stck. gerechtfertigt. Nicht als nachteilig erwies sich die etwa um den Faktor 1.5 größere Eigenfluoreszenz der Sigma-Objektträger im Verhältnis zu den Menzel- und Marienfeld-Produkten (Daten nicht gezeigt), die durch die Auswertung über die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals kompensiert wurde.

Ein direkter Vergleich zwischen den Sigma-Objektträgern und den kleineren BK7-Glaschips war nicht möglich, da durch den Wechsel des Chipformates auch der Dispenser auf das Standardobjektträgerformat angepasst worden war und daher beide Glasträger nicht parallel in einer Charge immobilisiert werden konnten, was die Voraussetzung für eine bessere Vergleichbarkeit gewesen wäre. Messergebnisse auf den Sigma-Objektträgern konnten zudem nicht direkt mit zuvor auf den BK7-Chips erhaltenen Ergebnissen verglichen werden, da das Auslesegerät während des Umbaus vollständig neu justiert worden war. Grundsätzlich lässt sich aber feststellen, dass die Ergebnisse mit den beiden Glasmaterialien in derselben Größenordnung lagen.

5.1.1.3 Optimierung der Standardimmobilisierungsmethode

Im Rahmen der Übertragung des Standardimmobilisierungsprotokolls auf Glasobjektträger im größeren Format wurden verschiedene Aspekte der Methode genauer untersucht. Es konnte belegt werden, dass die im Deaktivierungsschritt eingesetzte 6-Amino-1-Hexansäure die unspezifische Anbindung der Cy5-markierten Target-Oligonukleotide deutlich besser verhindert als das im Originalprotokoll [102] verwendete 6-Amino-1-Hexanol (Abb. 21). Ursache dafür ist die negativ geladene Carboxy-Endgruppe auf der Chipoberfläche, welche die ebenfalls negativ geladenen DNA-Stränge besser abstößt als die OH-Gruppe des Alkohols.

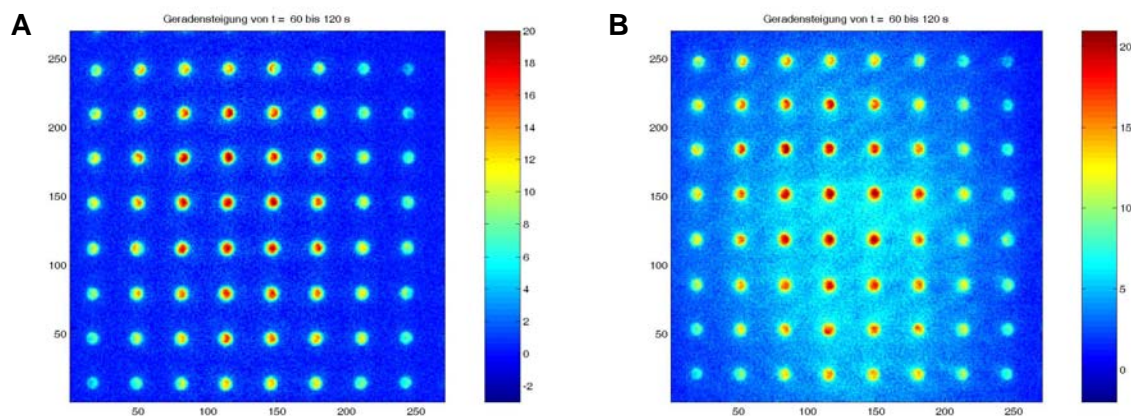


Abb. 21 Vergleich der unspezifischen Bindung von Cy5-Target bei Deaktivierung der Sensoroberfläche mit (A) 6-Amino-1-Hexansäure und (B) 6-Amino-1-Hexanol

Sonde Actin-45-0nm, Target Actin-51-Cy5 0.5 nM. Dargestellt sind die Steigungsbilder im Bereich 60-120 s.

Zunächst wurden die DNA-Fangsonden wie bei Schult [79] in Dispensierpuffer (1x PBS, 1.25 % (m/v) Ethylenglykol) immobilisiert und die Objektträger anschließend 2.5 h bei 80°C gebacken. Die damit erhaltenen Steigungsbilder zeigten auf den ersten Blick einen homogenen Sondenarray (Abb. 21 A), bei Analyse der Spotform am GMS418 Mikroarrayscanner zeigte sich jedoch, dass die Spots deutliche „Donut“- oder „Kaffeerand“-Effekte aufwiesen (Abb. 22 A). Wurden die Objektträger nach dem Dispensieren nicht getempert, sondern über Nacht in einer Feuchtbox bei 37°C inkubiert, ergab sich eine noch viel ungleichmäßigere Spotform (Abb. 22 B), wahrscheinlich aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften des Ethylenglykols. Erst bei Immobilisierung der Sonden in reinem VE-Wasser und anschließender Inkubation in der Feuchte konnte eine homogene Form der Sondenspots bei einem Durchmesser von $239 \pm 8 \mu\text{m}$ (über $n = 9$ Spots) erzielt werden (Abb. 22 C), so dass diese Methode als Standardmethode gewählt wurde. Zur Beschleunigung der relativ zeitaufwendigen Immobilisierungsmethode kann die Feuchte-Inkubation auch durch das zweistündige Backen bei 80°C ersetzt werden, wobei allerdings geringe Einbußen bezüglich der Spothomogenität akzeptiert werden müssen.

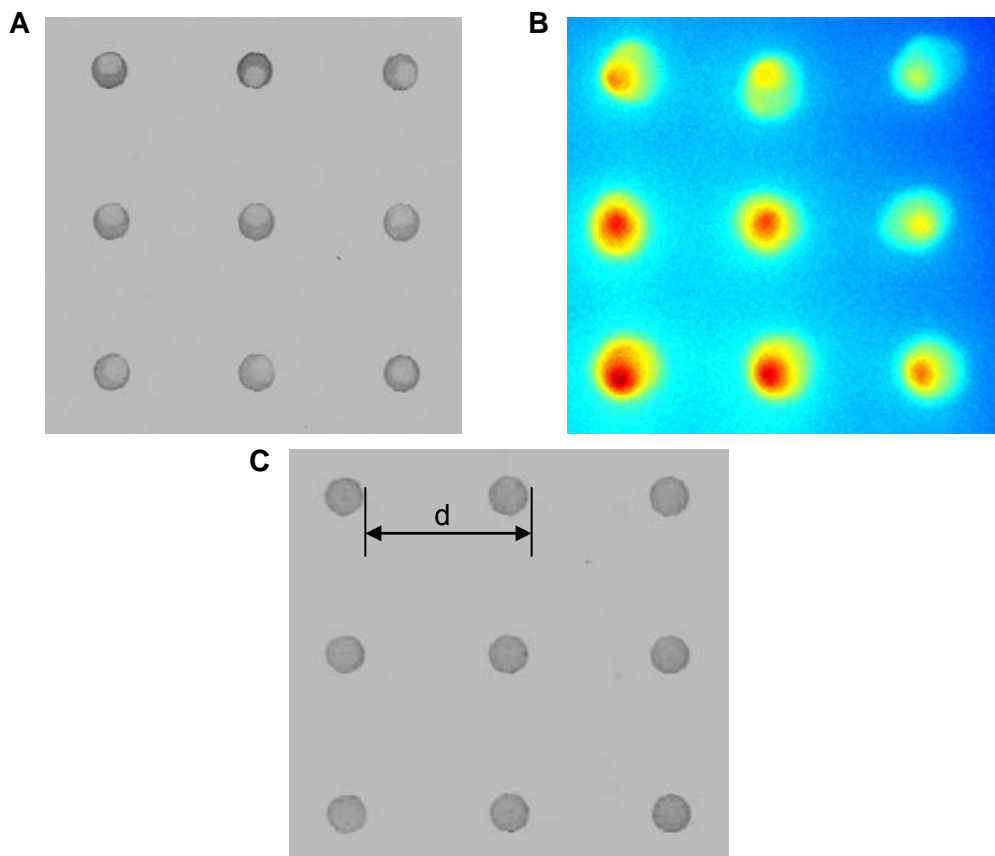


Abb. 22 Spotform bei Immobilisierung der DNA-Fangsonden in Dispensierpuffer und Backen der Objektträger (A) bzw. Inkubation in der Feuchtbox (B) sowie bei Immobilisierung in reinem VE-Wasser und Inkubation in der Feuchte (C)

Gezeigt sind jeweils Ausschnitte aus einem 10x10-Array der Sonde Actin-45-0mm nach Hybridisierung mit 0.5 nM Actin-51-Cy5 (Spotabstand 1 cm). **A+C**: Bild des GMS418-Scanners, **B**: Endbild (1x1-Bin角度) des Sensorsystems. Der mittlere Spotabstand d von $1000 \pm 16 \mu\text{m}$ ($n = 12$) in **C** bestätigt die Positioniergenauigkeit des Dispensers.

5.1.1.4 Lagerstabilität der nach Standardmethode immobilisierten Objektträger

Hinsichtlich einer besseren Koordination der verschiedenen Arbeitsschritte im Labor sowie eines möglichen Einsatzes der chipbasierten Nachweismethoden durch externe Anwender wurde die Lagerstabilität der nach der Standardmethode immobilisierten Glasobjektträger untersucht. Dazu wurde zunächst auf sechs Objektträgern der zu Testzwecken übliche 10x10-Array der Actin-45-0mm-Sonde immobilisiert. Nur ein Objektträger wurde anschließend sofort mit 0.5 nM Actin-51-Cy5 vermessen, die anderen wurden bei 4°C gelagert und erst nach bis zu 16 Wochen wurde jeweils ein Objektträger pro Messtag hybridisiert. Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Messtage wurde die 0.5 nM Targetlösung jeweils aus derselben aliquotierten und bei -20°C gelagerten 1 µM Stammlösung angesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die unter diesen Bedingungen gelagerte Oligonukleotid-Lösung nicht an Aktivität verlor und das Ergebnis dementsprechend beeinflusste (Daten nicht gezeigt). Abb. 23 zeigt, dass die Signalsteigungen über den betrachteten Zeitraum nur sehr langsam und relativ konstant abnahmen. Auf dem 16 Wochen lang gelagerten Objektträger wurden noch 74 % der Signalsteigung des sofort nach der Herstellung vermessenen Objektträgers detektiert. Es ergab sich eine Drift von -0.10 ± 0.01 counts/s pro Woche, so dass die Signalintensität in dem betrachteten Zeitraum etwa um 2 % pro Woche abnahm.

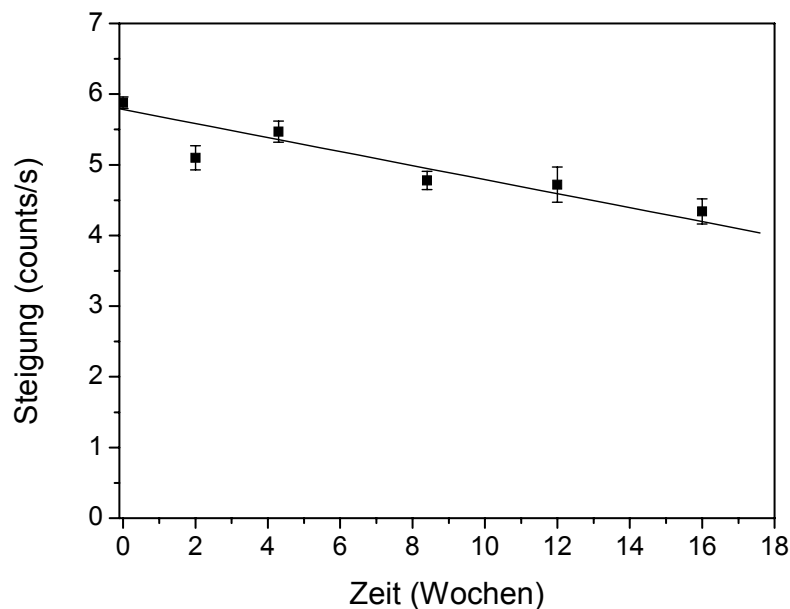


Abb. 23 Lagerstabilität der nach Standardmethode immobilisierten Objektträger

Sonde Actin-45-0mm, Target Actin-51-Cy5 0.5 nM, keine Ausleuchtungskorrektur, n = 1 Objektträger pro Messpunkt, MW-Auswertung über n = 4 Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des 10x10-Arrays und n = 5 Messungen.

5.1.1.5 Lagerstabilität der nach Standardmethode voraktivierten Objektträger

Um eine größere Flexibilität bei der Herstellung immobilisierter Sondenarrays nach der Standardmethode zu erlangen, wurde untersucht, ob die silanisierten und mit Phenyldiisothiocyanat aktivierten Glasobjektträger bis zum Dispensierprozess zwischengelagert werden können. Dazu wurden vier Objektträger in einem Ansatz parallel aktiviert, von denen dann drei bei -20°C gelagert wurden, während der vierte Objektträger sofort im Anschluss bespottet und zu Ende prozessiert wurde. Auf den drei anderen Objektträgern wurden die identischen Sonden 7, 14 und 28 Tage nach der Aktivierung immobilisiert, so dass die fertigen Objektträger nach zwischenzeitlicher Lagerung bei 4°C alle am 29. Tag vermessen werden konnten. Abb. 24 zeigt, dass dabei kaum Abweichungen zwischen den Hybridisierungssignalen der vier Objektträger auftraten, so dass die voraktivierten Objektträger mindestens über einen Zeitraum von 4 Wochen lagerstabil sind. Der etwas geringere Wert bei 0 Tagen Lagerung lässt sich darauf zurückführen, dass in diesem Experiment die Lagerstabilität der immobilisierten Objektträger (vgl. 5.1.1.4) dem Ergebnis überlagert und entsprechend für bereits vier Wochen gelagerte Objektträger ein geringer Rückgang der Signalstärke zu erwarten war. Sowohl bei dem hier gezeigten Versuch als auch in 5.1.1.4 basierte die statistische Bewertung des Ergebnisses nur auf mehreren Messungen auf einem einzelnen Objektträger pro Messpunkt, weil zum einen die Herstellung einer viel größeren Anzahl Objektträger nicht praktikabel gewesen wäre und zum anderen Versuche zur Reproduzierbarkeit (vgl. 5.1.2.2) gezeigt haben, dass die Abweichungen zwischen Ergebnissen auf verschiedenen Objektträgern nicht groß waren.

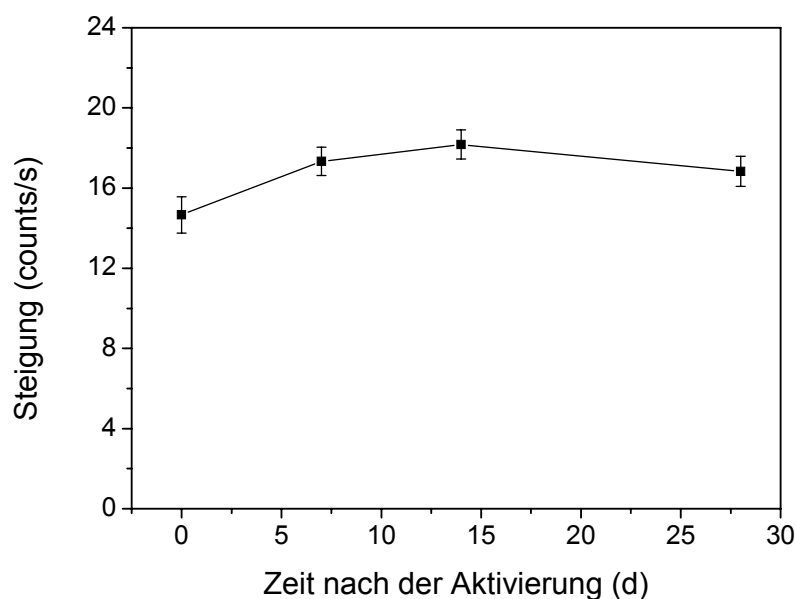


Abb. 24 Signalstärke nach unterschiedlicher Lagerdauer der voraktivierten Objektträger

Sonde Actin-45-0mm, Target Actin-51-Cy5 0.5 nM, keine Ausleuchtungskorrektur, $n = 1$ Objektträger pro Messpunkt, MAX-Auswertung über $n = 4$ Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des 10×10 -Arrays und $n = 5$ Messungen.

5.1.1.6 Einsatz von kommerziellen voraktivierten Glasobjektträgern

Ein Grund für die Anpassung des Chipformates auf die Größe von Standardobjektträgern war die Absicht, auch auf kommerzielle voraktivierte Glasobjektträger für die Immobilisierung von DNA zurückgreifen zu können, u.a. um dadurch bei Bedarf mehr Sensorchips in kürzerer Zeit herstellen zu können. Bei dem Vergleich der in Tab. 1 aufgelisteten voraktivierten Objektträger mit den nach Standardmethode immobilisierten wurden jeweils die Hybridisierungseffizienz, die unspezifische Hintergrundanbindung bei mehreren Messungen sowie die Spotform bewertet. In Tab. 5 sind die Ergebnisse stichwortartig für jedes Produkt zusammengefasst. Zur optischen Auswertung ist dazu jeweils das Steigungsbild im Bereich 60-120 s von einem Teilausschnitt des hybridisierten 10x10-Arrays dargestellt. Abb. 25 zeigt zum Vergleich das entsprechende Bild für einen Standard-Sigma-Objektträger. Nur in einzelnen Fällen ist zur Bewertung der Spotform zusätzlich der Ausschnitt eines Endbildes oder eines Bildes vom GMS418 Mikroarrayscanner gezeigt.

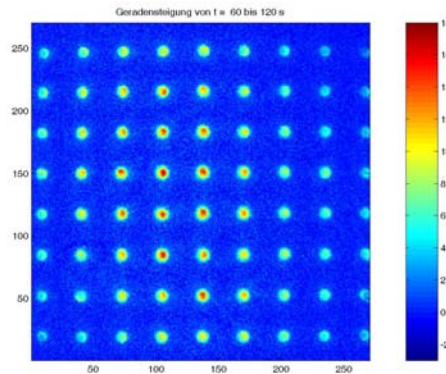


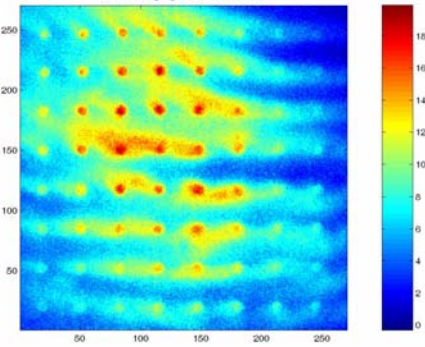
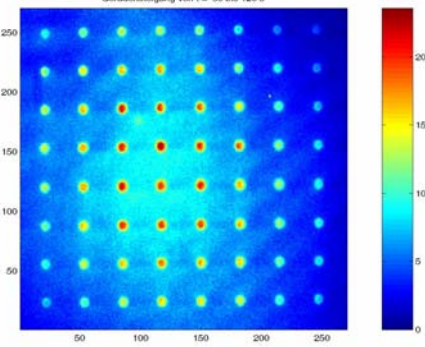
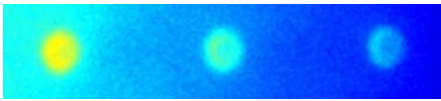


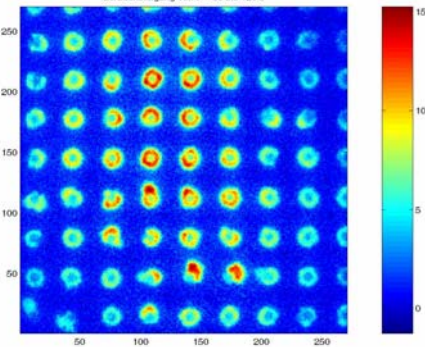
Abb. 25 Steigungsbild (60-120 s) auf einem nach Standardmethode immobilisierten Objektträger

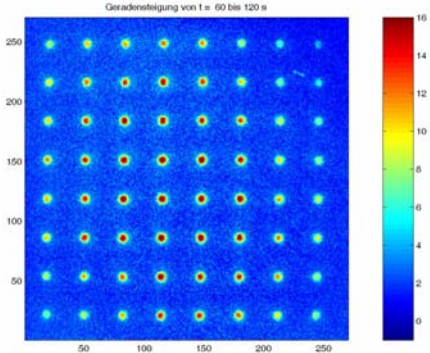
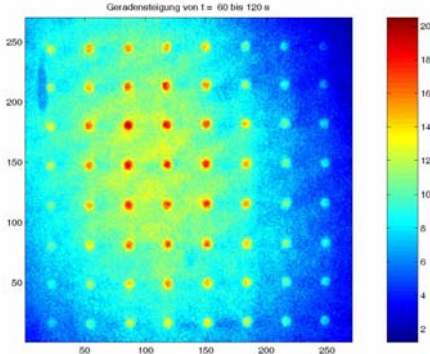
Ausschnitt des 10x10-Arrays der Sonde Actin-45-0mm, Target Actin-51-Cy5 0.5 nM.

Tab. 5 Einsatz kommerzieller voraktivierter Objektträger im DNA-Sensorchip

Bewertung: ↑ = gut, → = mittel, ↓ = schlecht. Hinweise zur Kopplungschemie finden sich in Tab. 1.

Hersteller/ Produkt	Testergebnis	Spotform
Biocat/ Easypot®	<ul style="list-style-type: none"> - Evaneszent-Feld-Anregung möglich - Spotform relativ gut, aber GMS418-Bild zeigt starken Donut-Effekt - minimale Hintergrundanbindung - Hybridisierungseffizienz etwas besser als auf Standard-Sigma-Objektträger <p>↑</p>	

Hersteller/ Produkt	Testergebnis	Spotform
Clontech/ DNA- Ready™ Type II	<ul style="list-style-type: none"> - Evaneszent-Feld-Anregung möglich - extrem schlechte Spotform - stellenweise sehr hohe Hintergrundanbindung - Steigungsbild nicht auszuwerten ↓	
Corning/ CMT- GAPS™	<ul style="list-style-type: none"> - Evaneszent-Feld-Anregung möglich - Spotform relativ gut, aber Endbildausschnitt zeigt leichte Kaffeerand- und Donuteffekte - hohe Hintergrundanbindung - korrigierte Signalsteigungen dadurch deutlich geringer als bei Standard-Sigma-Objektträgern ↓	 
Eppendorf/ Creative Chip®	<ul style="list-style-type: none"> - keine Evaneszent-Feld-Anregung möglich - Auslesen am GMS418 Scanner zeigt erfolgte Immobilisierung und relativ inhomogene Spotform 	
Genescan/ ArrayLINK hyphob®	<ul style="list-style-type: none"> - keine Evaneszent-Feld-Anregung möglich - Auslesen am GMS418 Scanner zeigt erfolgte Immobilisierung und sehr inhomogene Spotform 	
Greiner Bio- one/ ALDEHYDE slides	<ul style="list-style-type: none"> - Evaneszent-Feld-Anregung möglich - sehr schlechte Spotform mit starkem Donuteffekt - minimale Hintergrundanbindung - Hybridisierungseffizienz etwa 50 % schlechter als auf Standard-Sigma-Objektträger - unsaubere Verarbeitung, unbehandelte Produkte weisen zahlreiche Artefakte auf der Oberfläche auf ↓	
Quantifoil/ QMT Micro- Spot Slide®	<ul style="list-style-type: none"> - keine Evaneszent-Feld-Anregung möglich 	

Hersteller/ Produkt	Testergebnis	Spotform
Sigma-Aldr./ Sigma Screen™	<ul style="list-style-type: none"> - Evaneszent-Feld-Anregung möglich - gute Spotform, relativ homogen im Endbild (nicht gezeigt) - stark schwankende Hintergrundanbindung - Hybridisierungseffizienz im Bereich des Standard-Sigma-Objekträgers <p>→</p>	 <p>Geradensteigung von t = 60 bis 120 s</p>
PicoRapid/ PicoSlides™	<ul style="list-style-type: none"> - Evaneszent-Feld-Anregung möglich - Immobilisierungsmethode analog Ref. [102], wie auch die Standardmethode - Da noch kein User Manual vorhanden ist, wurden der Dispensierpuffer und die Nachbearbeitung variiert. - bestes Ergebnis mit Wasser als Immobilisierungspuffer und Inkubation in Feuchtkbox - Spotform relativ gut - sehr hohe Hintergrundanbindung - Hybridisierungseffizienz mehr als 50% schlechter als auf Standard-Sigma-Objekträger <p>↓</p>	 <p>Geradensteigung von t = 60 bis 120 s</p>

Hier sind für die Produkte, bei denen die Oberflächenbehandlung laut Anleitung nach verschiedenen Methoden durchgeführt werden konnte, nur die besten erzielten Ergebnisse dargestellt. Im Rahmen des Projektes zur Detektion von Mikroorganismen wurden auch die voraktivierten CSS-Silylated™-Objekträger (CEL Associates, Pearland, USA) für die Anwendung im DNA-Biosensor getestet, die Ergebnisse dazu finden sich in 5.3.1.1.

Es hat sich gezeigt, dass von den zehn getesteten Produkten nur zwei, nämlich die Easyspot®-Objekträger von Biocat und die CSS-Objekträger von CEL Associates, für die Anwendung im DNA-Biosensor uneingeschränkt geeignet waren. Mit einzelnen Objektträgern ließ sich aufgrund der optischen Eigenschaften des beschichteten Glases gar kein evaneszentes Feld auf der Sensoroberfläche anregen. Der aus der Oberflächenaktivierung resultierende Brechungsindex der Glaträger wich in diesen Fällen zu stark von dem abgestimmten Brechungsindex von Prisma und Silikonöl ab, so dass die Bedingung für die Totalreflexion auch bei Anpassung der Geräteeinstellungen (insbesondere des Einstrahlwinkels) in dem möglichen Bereich nicht mehr erfüllt werden konnte.

Da die nach Standardmethode immobilisierten Objektträger in der Summe der Eigenschaften von keinem der kommerziellen Objektträger übertroffen wurden und in der Bereitstellung deutlich preisgünstiger waren, wurden im weiteren Verlauf zumindest bei den Arbeiten zu

den Grundlagen des Sensorsystems sowie zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln ausschließlich Standard-Sigma-Objekträger verwendet.

5.1.2 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit

5.1.2.1 Arbeitsstabilität

Da die Hybridisierung der Cy5-markierten Targetmoleküle im Sensorchip reversibel ist und die gebildeten Doppelstränge durch einen alkalischen Waschschrift denaturiert werden können, wurde die Reproduzierbarkeit der Signalsteigungen bei wiederholter Messung einer Targetlösung in einem Sensor untersucht. Auf einem Sigma-Objekträger wurde dafür ein 10x10-Sondenarray immobilisiert und in $n = 20$ Messungen hybridisiert. Die Regeneration zwischen den Messungen erfolgte durch Spülen mit $1 \times 200 \mu\text{l}$ alkalischer Regenerationslösung und $2 \times 200 \mu\text{l}$ Waschpuffer bei einer Fließrate von $25 \mu\text{l/s}$. In Abb. 26 sind exemplarisch die Steigungswerte von fünf beliebigen Spots des Arrays für alle durchgeführten Messungen aufgetragen. Die unterschiedlichen Signalniveaus ergaben sich aufgrund der inhomogenen Ausleuchtung, die hier nicht korrigiert worden ist. Zur Quantifizierung des Signalverlustes über $n = 20$ Messungen wurde die Drift des Signals als Steigung der linearen Regression bestimmt. Gemittelt über die fünf Spots ergab sich eine Drift von -0.07 ± 0.01 counts/s pro Messung ($\leq 0.5\%$ pro Messung), wobei der letzte Messwert im Mittel noch $85 \pm 2\%$ des ersten Wertes betrug. Über alle Messungen ergab sich ohne Berücksichtigung des Drifts ein Variationskoeffizient von $5.0 \pm 0.7\%$. Damit zeigte der DNA-Biosensor eine relativ gute Arbeitsstabilität.

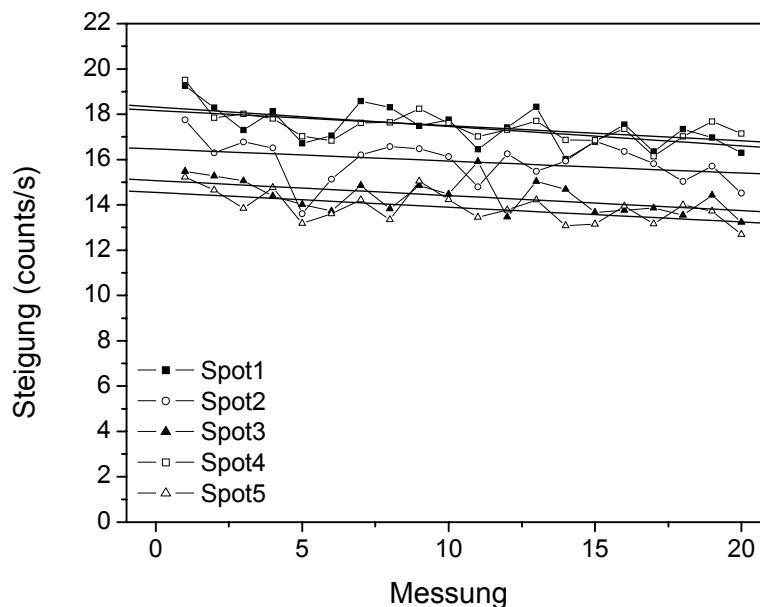


Abb. 26 Reproduzierbarkeit des Messsignals bei wiederholter Regenerierung des Sensors
Sonde Actin-45-0mm, Target Actin-51-Cy5 0.5 nM, keine Ausleuchtungskorrektur, MAX-Auswertung.

Auf den kleineren BK7-Glaschips konnte vor der Anpassung des Chipformates eine noch etwas bessere Arbeitsstabilität über $n = 15$ Messungen demonstriert werden (Daten nicht gezeigt).

Dass die Sensoroberfläche durch die Einwirkung der alkalischen Regenerierungslösung auf Dauer geschädigt und der Sensorchip dadurch unbrauchbar wurde, zeigte ein Versuch, bei dem der Regenerationsschritt variiert wurde (Abb. 27). Dabei wurden $2 \times 200 \mu\text{l}$ Regenerierungslösung mit einer deutlich langsameren Fließrate von $0.5 \mu\text{l/s}$ und anschließend $2 \times 200 \mu\text{l}$ Waschpuffer mit einer Fließrate von $3 \mu\text{l/s}$ nach der Hybridisierung über den Chip gepumpt.

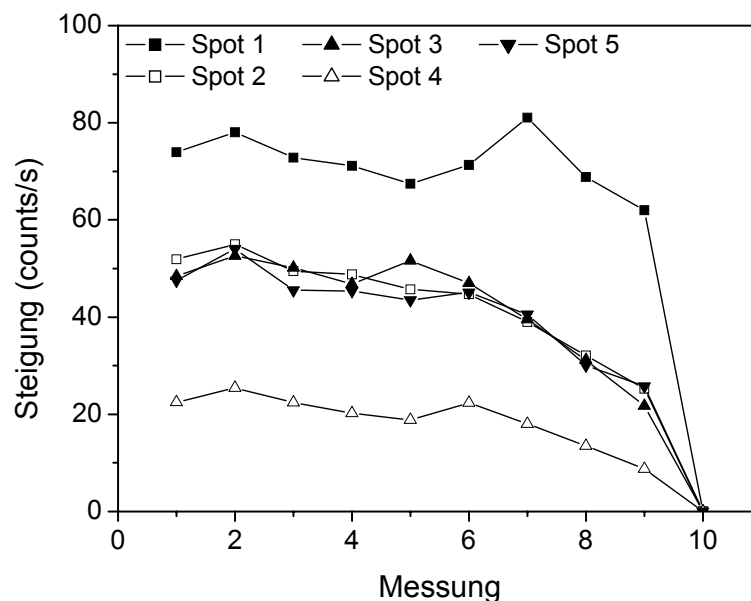


Abb. 27 Reproduzierbarkeit des Messsignals bei längerer NaOH-Exposition während der Regeneration

Sonde c-erb-47-0mm, Target c-erb-50-Cy5 0.5 nM, keine Ausleuchtungskorrektur, MAX-Auswertung.

Die starken Niveauunterschiede zwischen den Signalen der verschiedenen Spots ergaben sich hier dadurch, dass Sondenspots mit unterschiedlichen Sondenkonzentrationen betrachtet wurden, was jedoch keine Auswirkung auf die Aussage des Experimentes hat. Es zeigte sich, dass die Arbeitsstabilität des Sensors bei einer länger andauernden Exposition von alkalischer Lösung auf der Oberfläche drastisch reduziert wurde. Bereits nach zehn Messungen konnte keine Hybridisierung mehr detektiert werden. Die Regeneration der Sensorchips musste dementsprechend immer möglichst schnell und mit einem möglichst geringen Volumen der alkalischen Lösung erfolgen. Die ebenfalls verlängerte Einwirkzeit des Waschpuffers konnte hier nicht Ursache für das Ergebnis sein, da die Sensoren häufig mit Waschpuffer gefüllt über längere Zeiträume von bis zu zwei Stunden im Auslesegerät lagen, ohne dass anschließend ein Rückgang der Sensorsignale beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

5.1.2.2 Messungen auf mehreren Chips unterschiedlicher Chargen

Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse von unterschiedlichen Sensorchips einschätzen zu können, wurden fünf Chargen à drei Sigma-Objektträger nach identischer Methode an unterschiedlichen Tagen hergestellt. Innerhalb eines Messtages wurden dann alle 15 Objektträger in $n = 3$ Messungen hybridisiert (Abb. 28).

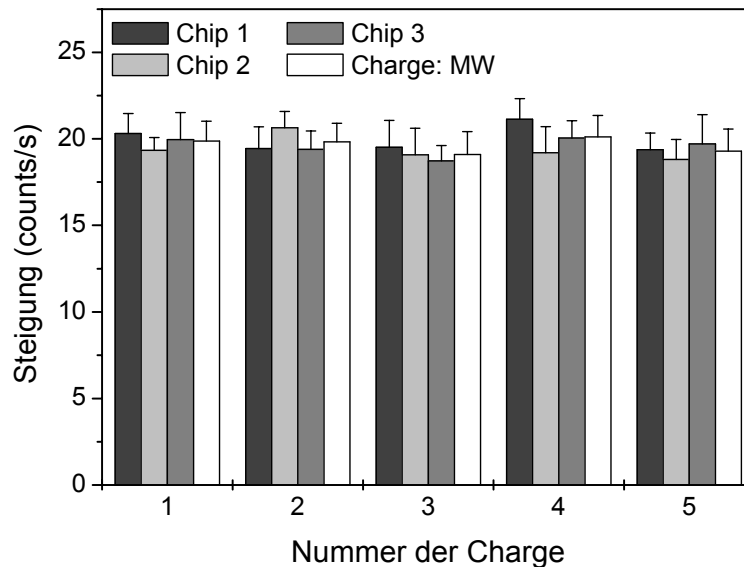


Abb. 28 Reproduzierbarkeit für mehrere Chips unterschiedlicher Chargen

Sonde Actin-45-0mm, Target Actin-51-Cy5 0.5 nM, keine Ausleuchtungskorrektur, MAX-Auswertung über $n = 4$ Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des 10x10-Arrays und $n = 3$ Messungen.

Es ergab sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit sowohl für Ergebnisse von verschiedenen Chips aus einer Charge als auch für Messwerte von mehreren Chips aus unterschiedlichen Chargen. Die Abweichung zwischen den Messwerten der drei Chips innerhalb einer Charge lag mit 3.0 % im Bereich der Abweichung von 2.2 % zwischen den für die fünf Chargen erhaltenen Mittelwerten und es traten keine signifikanten Unterschiede auf. Als Mittelwert über alle Sensorchips wurde ein Messwert von 19.6 ± 1.2 counts/s mit einem Variationskoeffizienten von 6.2 % erhalten.

5.1.2.3 Einfluss des Pipettierfehlers

Da die Targetlösungen für die Hybridisierungsmessungen an jedem Messtag neu aus 1 μ M konzentrierten Stammlösungen in mehreren Verdünnungsschritten angesetzt worden sind, wurde untersucht, inwieweit der dabei aufgetretene Pipettierfehler zu Abweichungen bei den Messergebnissen führte. Dazu wurden in parallelen Ansätzen drei 0.2 nM Lösungen des c-erb-50-Cy5-Targets in Standardhybridisierungspuffer aus einer 1 μ M Stammlösung durch

eine 1:40-Verdünnung im ersten und eine 1:125-Verdünnung im zweiten Schritt hergestellt und in einem Sensorchip vermessen (Abb. 29).

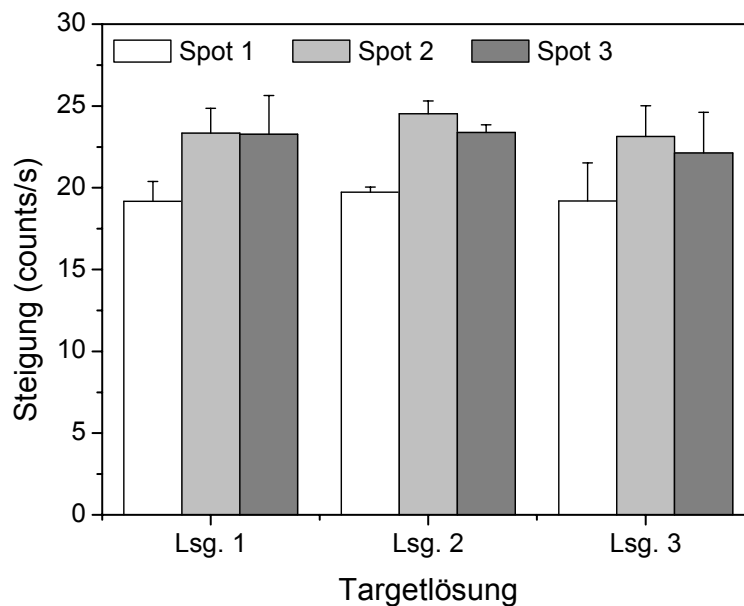


Abb. 29 Auswirkung des Pipettierfehlers

Sonde c-erb-47-0mm, Target c-erb-50-Cy5 0.2 nM, BK7-Glaschip, keine Ausleuchtungskorrektur, MAX-Auswertung für drei einzelne Spots des 10x10-Arrays über $n = 3$ Messungen.

Über $n = 3$ Messungen wurde hier im Mittel ein Variationskoeffizient von 6.8 % erreicht. Die Abweichung zwischen den gemittelten Messwerten auf einem Sondenspot bei Verwendung der unterschiedlichen Targetlösungen lag dagegen nur bei 2.1 %, so dass der Pipettierfehler trotz der relativ hohen Viskosität des Standardhybridisierungspuffers (vgl. 5.1.3.4) vernachlässigt werden konnte. Das Experiment hat damit bestätigt, dass der Verdünnungsfehler auf das Messergebnis keine größere Auswirkung hatte als auf Basis des Fehlerfortpflanzungsgesetzes und eines Pipettierfehlers von etwa 1 % erwartet.

5.1.3 Variation verschiedener Parameter der Hybridisierung

5.1.3.1 Optimierung der Fließrate

Um zu gewährleisten, dass die Fortbewegung der Targetmoleküle im Fließkanal in Richtung der Chipoberfläche maßgeblich durch Konvektion und nicht durch Diffusion erfolgt und die Anbindung dementsprechend nahezu vollständig kinetisch kontrolliert abläuft, wurde die Fließrate optimiert. Die Hybridisierung eines Modelltargets wurde dazu bei verschiedenen Fließraten verfolgt (Abb. 30). Es zeigte sich, dass die Signalsteigung bei abnehmender Fließrate geringer wurde, was auf eine zunehmende Verarmung an Targetmolekülen auf der Sensoroberfläche zurückzuführen ist, deren Anbindung dann maßgeblich nur noch durch Diffusion beeinflusst wurde. Bei Messung unter der stehenden Lösung wurde zwar noch ein

leichter Anstieg des Signals beobachtet, allerdings nicht mit einem linearen, sondern gesättigten zeitlichen Signalverlauf (Daten nicht gezeigt). Im Hinblick darauf, dass bei höheren Fließraten deutlich mehr Targetlösung für gleiche Messzeiten zur Verfügung stehen muss und der Probencontainer des Sensorchips nur 200 μl fasst, wurde hier als Kompromiss standardmäßig eine Fließrate von 1 $\mu\text{l/s}$ gewählt.

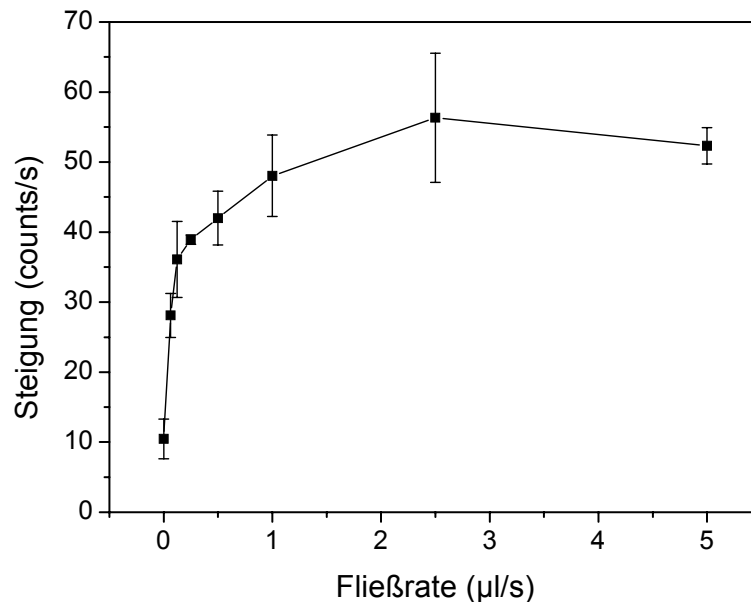


Abb. 30 Optimierung der Fließrate

Sonde c-erb-47-0mm, Target c-erb-50-Cy5 0.5 nM, BK7-Glaschip, MAX-Auswertung für $n = 1$ Spot über $n = 2$ Messungen.

5.1.3.2 Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung

Mit Hilfe des im DNA-Biosensorsystem integrierten Thermostaten konnte die Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung demonstriert werden. Dazu wurden zum einen die Wechselwirkungen der Targets Actin-51-Cy5, CD31-50-Cy5, c-erb-50-Cy5 und GAPDH-50-Cy5 mit ihren komplementären 45mer-Sonden und zum anderen die Anbindung des NPT1-56-Cy5-Targets an der kürzeren 18mer-Sonde bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Es muss betont werden, dass die angegebenen Temperaturen nur grobe Anhaltspunkte sind, da die Temperatureinstellung mit dem gegebenen System nur sehr ungenau möglich war. Dennoch konnten damit grundsätzliche Tendenzen deutlich gemacht werden. Abb. 31 zeigt, dass die Hybridisierungseffizienz für alle fünf Wechselwirkungen bei steigender Temperatur abnahm, weil die jeweiligen Schmelzpunkte T_m erreicht und schließlich überschritten wurden. Dies war bei der kürzeren NPT1-18mer-Sequenz schon bei einer niedrigeren Temperatur der Fall als bei den längeren Systemen, so wurde an der NPT1-18-0mm-Sonde bereits bei 39°C keine Anbindung mehr beobachtet, an den längeren 45mer-Sonden von Actin, CD31, c-erb und GAPDH dagegen erst bei 49°C. Eine Ausnahme bildete lediglich das Verhalten der

Actin-Hybridisierungssequenz, für die das Optimum der Hybridisierungseffizienz erst im Bereich von 34°C erreicht wurde, bevor das Signal bei weiterer Temperaturerhöhung abfiel. Die T_m -Werte lagen hier deutlich unter den im Anhang (siehe 8.1) angegebenen Werten von über 70°C für Actin, CD31, c-erb und GAPDH sowie 53°C für NPT1, weil der Schmelzpunkt durch den hohen Formamidanteil im Hybridisierungspuffer abgesenkt wurde (vgl. 3.1.1.3), so dass der optimale Bereich der Hybridisierung für viele Sequenzen bereits bei RT erreicht wurde.

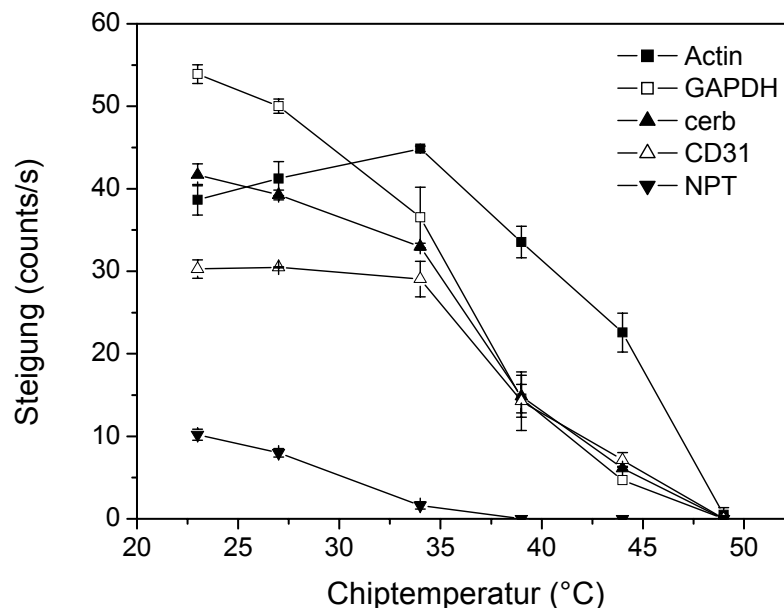


Abb. 31 Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung verschiedener Sequenzen

Sonden: Actin-45-0mm, CD31-44-0mm, c-erb-47-0mm, GAPDH-44-0mm und NPT1-18-0mm, Targets in Mischung je 0.2 nM: Actin-51-Cy5, CD31-50-Cy5, c-erb-50-Cy5, GAPDH-50-Cy5 und NPT1-56-Cy5, BK7-Glaschip, keine Ausleuchtungskorrektur, MAX-Auswertung für $n = 2$ Spots über $n = 3$ Messungen.

Das im Vergleich zu den anderen Sequenzen viel schwächere NPT1-Signal bei RT sowie der niedrigere T_m -Wert ergaben sich dadurch, dass die Wechselwirkung sich hier nur über 18 bp erstreckte und nicht wie im Fall der anderen Targets nahezu die gesamte Targetsequenz erfasste, so dass die überlappenden Enden des NPT1-56-Cy5-Targets lediglich zu sterischen Behinderungen führen konnten.

5.1.3.3 Spezifität der Hybridisierung

Dass neben der Konzentration auch die Assoziationskonstante k_{on} einen Einfluss auf die Signalsteigung hat (vgl. Gl. 5), wurde durch den Vergleich der Hybridisierung von perfect-match- und mismatch-Sequenzen demonstriert (Abb. 32). Für eine 18mer-Hybridisierungssequenz des NPT1-Systems wurde gezeigt, dass bereits ein zentraler mismatch ausreichte, um die Hybridisierung nahezu vollständig zu unterdrücken, während mit der 45mer-Sequenz

des Actin-Systems bei Hybridisierung mit der 5mm-Sonde immerhin ein 50%iger Signalabfall bis hin zum vollständigen Ausbleiben des Signals bei 10 mismatches zu beobachten war. Je länger die komplementäre Sequenz ist, umso geringer ist also der Einfluss eines einzelnen mismatches.

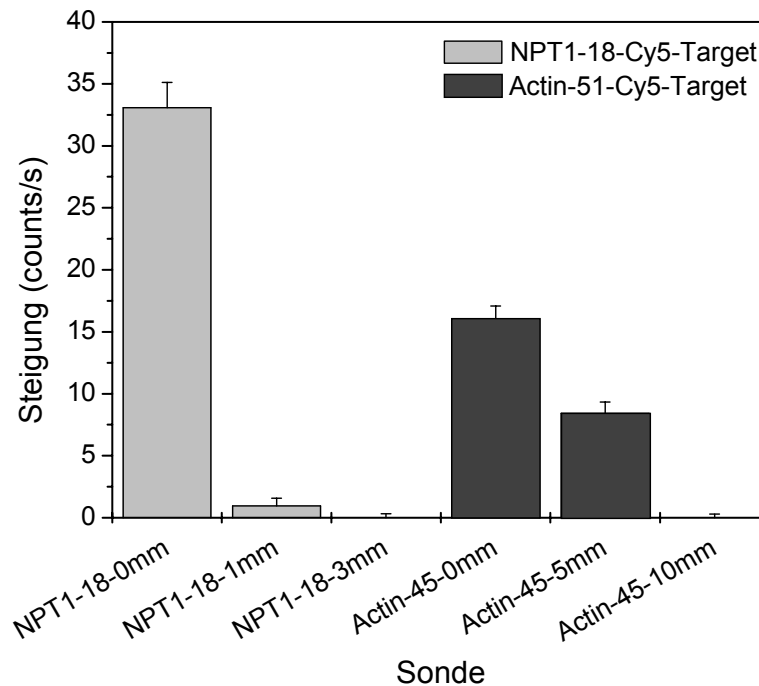


Abb. 32 Spezifität der Hybridisierung

Targets in Mischung je 0.5 nM, keine Ausleuchtungskorrektur, MAX-Auswertung für n = 2 Spots über n = 3 Messungen.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse für das NPT1-System in Abb. 31 und Abb. 32 wird der große Unterschied zwischen der Anbindung des 18mer- und des 56mer-Targets an der NPT1-18-0mm-Sonde deutlich. Während das lange NPT1-Target im Verhältnis zur 45mer-Actin-Sequenz deutlich schwächer nachgewiesen werden konnte, waren die sterisch weit weniger anspruchsvollen Wechselwirkungen des kurzen NPT1-Targets mit der ebenso langen perfekt-komplementären Sonde viel stärker als die Hybridisierung des längeren 45mer-Actin-Systems.

5.1.3.4 Einsatz verschiedener Hybridisierungspuffer

Von Schult [79] wurde bereits die Optimierung des Hybridisierungspuffers für Messungen im DNA-Sensorchip beschrieben, wobei unter den dort getesteten Puffern der Standard-hybridisierungspuffer 0.5xUH/50%FA am besten abgeschnitten hatte. Er wird durch Mischung von gleichen Teilen 50%ig in Wasser verdünnten Formamids (FA) und Ultrahyb™-Puffers (Ambion, Austin, USA) erhalten und enthält dementsprechend 50 % FA, andere Komponenten sind vom Hersteller nicht angegeben worden. In dieser Arbeit wurde der

Standardpuffer mit weiteren Puffern verglichen, um seine Leistungsfähigkeit besser einschätzen zu können. In einem ersten Experiment wurden neben dem Standardpuffer die kommerziellen Puffer Perfect Hyb™ Plus und ArrayHyb™ LowTemp (beide Sigma-Aldrich), die SlideHyb™-Puffer #1 bis #4 (Ambion) sowie der nach [96] hergestellte, im Folgenden „Biotech“ genannte Puffer (10x SSC, 0.1 % SDS, 50 % FA) eingesetzt. In dem jeweiligen Puffer wurden die Targets Actin-51-Cy5, CD31-50-Cy5, c-erb-50-Cy5 und GAPDH-50-Cy5 je 0.1 nM bei RT in einer parallelen Messung mit den perfekt komplementären Sonden hybridisiert. Die Signalsteigungen in Abb. 33 machen deutlich, dass je nach Zusammensetzung des Puffers die Wechselwirkungen verschiedener Sequenzen unterschiedlich stark beeinflusst wurden, da die Steigungsprofile über die vier betrachteten Sequenzen variieren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sich zum einen die Puffer 0.5xUH/50%FA, ArrayHyb™ LowTemp und Biotech und zum anderen die vier SlideHyb™-Puffer in ihrer Zusammensetzung ähnlich waren. Die besten Ergebnisse wurden mit den Puffern ArrayHyb™ LowTemp und Biotech erzielt, allerdings zeigten diese beiden auch die schlechtesten physikalisch-chemischen Eigenschaften aller getesteten Puffer. Zwar waren auch die anderen Puffer bei RT zum Teil relativ viskos, der ArrayHyb™ LowTemp- und der Biotech-Puffer ließen sich bei RT aber aufgrund von Niederschlagsbildung nicht gut verarbeiten.

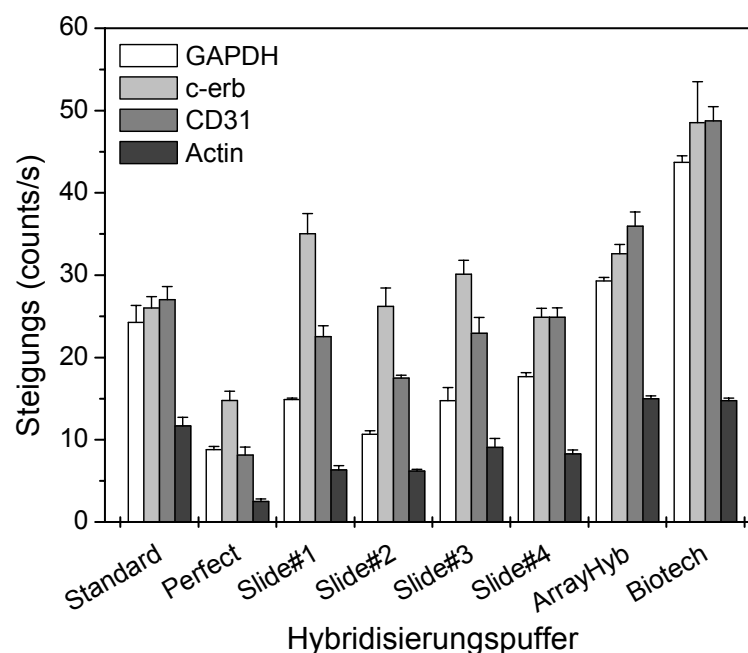


Abb. 33 Vergleich der Hybridisierungseffizienz in verschiedenen Hybridisierungspuffern

Sonden: Actin-45-0mm, CD31-44-0mm, c-erb-47-0mm und GAPDH-44-0mm, Targets in Mischung je 0.1 nM: Actin-51-Cy5, CD31-50-Cy5, c-erb-50-Cy5 und GAPDH-50-Cy5, BK7-Glaschip, Korrektur der Ausleuchtung mit Korrekturmatrix, MAX-Auswertung für n = 2 Spots über n = 3 Messungen.

Während sich der Niederschlag im Biotech-Puffer, der in der Literatur [96] für die Anwendung bei 42°C empfohlen wird, durch leichtes Erwärmen kurzzeitig auflöste, wurde der Niederschlag im ArrayHyb™ LowTemp-Puffer entgegen anders lautender Herstellerangaben auch

nach 30 min Erhitzen auf 70°C nicht vollständig gelöst. Bei dem Niederschlag handelte es sich wahrscheinlich um das in großen Mengen relativ schlecht lösliche Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), welches den Hybridisierungspuffern als anionisches Detergenz zugesetzt wird.

Besonders große Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz traten beim Vergleich des Standardpuffers mit dem 1x PicoRapid-Hybridisierungspuffer (PicoRapid, Bremen) auf. Dazu wurde eine Lösung der Targets Actin-51-Cy5, CD31-50-Cy5, c-erb-50-Cy5, GAPDH-50-Cy5 und NPT1-18-Cy5 (je 0.5 nM) in dem jeweiligen Puffer auf einem Array hybridisiert, auf dem sowohl die perfekt komplementären, als auch die Sonden Actin-45-5mm, Actin-45-10mm, NPT1-18-1mm und NPT1-18-3mm immobilisiert worden waren. Beide Puffer wurden bei RT und bei 42°C getestet, da der PicoRapid-Puffer für die Anwendung bei 42°C empfohlen wird. Es zeigte sich jedoch (Abb. 34), dass er bei beiden Temperaturen keine zufrieden stellenden Ergebnisse lieferte. Während sich bei RT für den Standardpuffer die bekannte Diskriminierung der verschiedenen mismatches ergab und auch die 50mer-perfect-match-Targets gut gebunden wurden, führte das 18mer-NTP1-Target im PicoRapid-Puffer an allen drei korrespondierenden Sonden, also auch denen mit 1 bzw. 3 mismatches, zu nahezu gleichen Signalen.

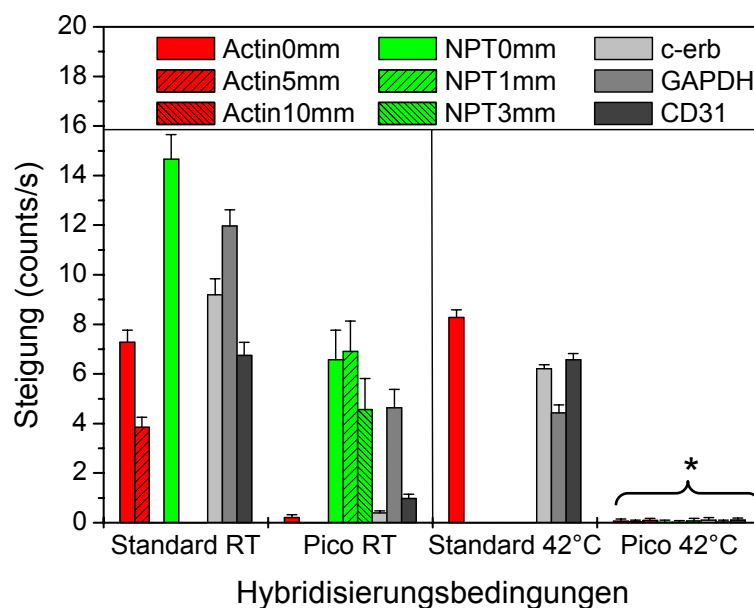


Abb. 34 Vergleich zwischen Standard- und PicoRapid-Hybridisierungspuffer bei RT und 42°C

Targets in Mischung je 0.5 nM: Actin-51-Cy5, NPT1-18-Cy5, CD31-50-Cy5, c-erb-50-Cy5 und GAPDH-50-Cy5, keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung für n = 2 Spots über n = 3 Messungen, * = keine signifikante Anbindung.

Die Anbindung der längeren Targets c-erb-50-Cy5, CD31-50-Cy5 und Actin-51-Cy5 erfolgte dagegen nur sehr schwach, wobei für beide Actin-mismatch-Sonden kein Signal detektiert wurde. Lediglich das GAPDH-50-Cy5-Target wurde ebenso wie das NPT1-18-Cy5-Target noch mit 50 % der im Standardpuffer beobachteten Signalstärke nachgewiesen. Bei 42°C

konnten im Standardpuffer wie erwartet nur noch die längeren Targets detektiert werden, wobei hier auch die Differenzierung der fünf Basenfehlpaarungen in der Actin-Sequenz gelang, da keine Anbindung mehr an der Actin-45-5mm-Sonde auftrat. Im PicoRapid-Puffer wurde dagegen unter den empfohlenen Temperaturbedingungen auf keiner der immobilisierten Sonden Hybridisierung beobachtet, obwohl der Puffer laut Angaben des Herstellers besonders für die Hybridisierung von 50mer-Oligonukleotiden geeignet sein soll.

Unter identischen Bedingungen wie der PicoRapid-Puffer wurde auch der MWG-Hybridisierungspuffer (MWG-Biotech, Ebersberg) getestet. Mit diesem wurden sehr ähnliche Ergebnisse wie mit dem Standardpuffer erhalten (Daten nicht gezeigt), weil er aber ebenfalls für eine Anwendung bei 42°C empfohlen wird und bei RT einen Niederschlag bildet, war er für die Standardmessungen im DNA-Sensorchip ungeeignet.

Im Vergleich der hier untersuchten Hybridisierungspuffer hat der Standardpuffer die besten Eigenschaften bewiesen und wurde daher für alle Hybridisierungsmessungen verwendet.

5.1.3.5 Vergleich der Auswertung mit Maximums- und Mittelwertmethode

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden in dieser Arbeit verwendeten Auswertungsmethoden auf Basis des Maximums bzw. des Mittelwertes wird deutlich, wenn man Messungen zur Verdünnungsreihe eines Targets mit beiden Methoden auswertet und die Ergebnisse miteinander vergleicht. Der Vorteil der Mittelwertmethode kommt dabei besonders im Bereich der Nachweisgrenze zur Geltung. Als Beispiel sind in Abb. 35 für eine Verdünnungsreihe des Actin-51-Cy5-Targets die Ergebnisse beider Auswerteverfahren dargestellt. Während sich mit der Mittelwertmethode ein Blindwert im Bereich des Nullpunktes ergab, der auch in der Verlängerung der Ausgleichsgeraden für die vier Messpunkte lag, zeigte das Ergebnis der Maximumsmethode keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen dem Blindwert und dem Messwert bei 0.05 nM, obwohl in dem entsprechenden Steigungsbild an dem korrespondierenden Sondenspot noch eine Anbindung zu erkennen war. Ursache für diesen erhöhten Blindwert sind das natürliche Rauschen der Signalintensitäten im Steigungsbild und die Tatsache, dass auch auf einer Oberfläche, auf der keine Anbindung stattgefunden hat, immer einzelne Pixel solche Intensitäten erreichen, die denen innerhalb von Sondenspots mit sehr schwacher Anbindung entsprechen. Bei der Maximums-Auswertung, auf welche die Software *Exprimage* zunächst beschränkt war, musste deshalb bei schwachen Konzentrationen immer auch eine zusätzliche optische Bewertung der Spots erfolgen und es war nicht möglich, eine mathematisch begründete Nachweisgrenze anzugeben. Wie erwartet konnte dagegen die Aussagekraft der Auswertungsmethode durch Anpassung an den Mittelwert optimiert werden, weil die Mittelwertmethode einzelne „Ausreißer“-Pixel nicht so stark wichtet und dadurch eine unabhängige mathematische Bewertung der Anbindung am Sondenspot liefert. So ließ sich auf Basis der

dreifachen SD des Blindwertes eine Nachweisgrenze angeben, in diesem Fall lag diese z.B. bei 13 pM mit einer Sensitivität von 17.0 ± 0.6 counts/(s*nM). Bezüglich des statistischen Fehlers der Messwerte zeigte sich erwartungsgemäß, dass zwischen beiden Methoden kein grundsätzlicher Unterschied besteht, da sich die auftretenden Variationen bei beiden Auswertungen gleichermaßen auswirken. Die Aussage von Ergebnissen ist also letztlich unabhängig von der angewendeten Auswertungsmethode, wenn dabei Messungen mit ausreichend großen Targetkonzentrationen betrachtet wurden. Ein weiterer Vorteil der Mittelwertmethode liegt darin, dass sie zeitlich weniger aufwendig ist, da der rechenintensive Schritt zur Erzeugung der Basismatrix zwecks Untergrundkorrektur entfällt.

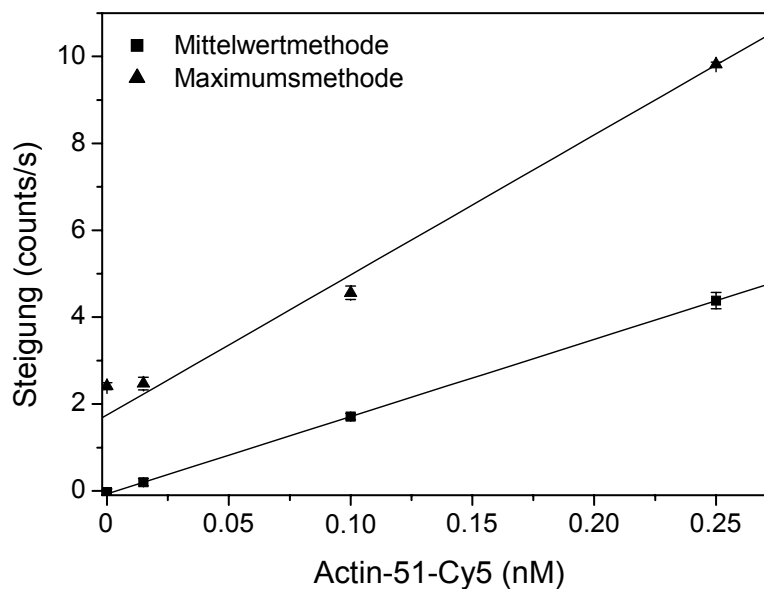


Abb. 35 Auswertung einer Verdünnungsreihe mit Maximums- und Mittelwertmethode

Sonde: Actin-45-0mm, keine Ausleuchtungskorrektur, Auswertung für $n = 2$ Spots über $n = 3$ Messungen.

5.1.3.6 Methoden zur Korrektur des Ausleuchtungsprofils

Im Folgenden werden die Eigenschaften der beiden zur Korrektur des Ausleuchtungsprofils verwendeten Methoden (vgl. 4.5.6) zunächst anhand von Beispielen erläutert und dann miteinander verglichen.

Verwendung einer Korrekturmatrix

Ein typisches untergrundkorrigiertes Endbild für einen Sensorchip mit einem 8x7-c-erb-Sondenarray nach Hybridisierung mit dem komplementären Target zeigt Abb. 36 A. Darin ist die allgemeine Position eines 6x5-Arrays auch auf anderen Sensorchips angedeutet, auf den die aus den c-erb-Signalintensitäten generierte Korrekturmatrix angewendet werden sollte. Die Verwendung der Matrix war deshalb notwendig, weil die Spotpositionen auf unterschiedlichen Sensorchips im Gerät nur in den seltensten Fällen genau deckungsgleich waren. In

Abb. 36 B sind die für die Sondenspots in A mit der Maximummethode erhaltenen Endwerte dreidimensional dargestellt, um das Ausleuchtungsprofil zu verdeutlichen.

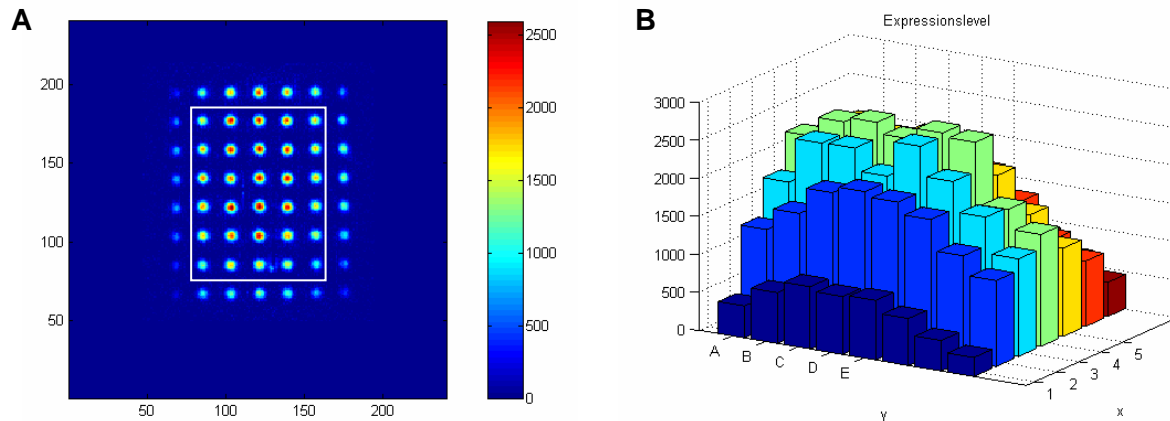


Abb. 36 8x7-c-erb-Sondenarray als Ausgangspunkt zur Generierung der Korrekturmatrix

Sonde: c-erb-47-0mm, Target: c-erb-50-Cy5 0.2 nM, BK7-Glaschip, **A**: untergrundkorrigiertes Endbild mit typischer Lage eines 6x5-Arrays (weiße Markierung), **B**: Endwerte für die 8x7 Sondenspots

Die Korrekturfaktoren bzw. aus diesen dann die Korrekturmatrix wurden durch Hybridisierung des Arrays mit c-erb-50-Cy5-Targetlösung erhalten. Zur Veranschaulichung zeigt Tab. 6 die für den Array in Abb. 36 berechneten Faktoren an den einzelnen Sondenpositionen sowie deren jeweilige Variationskoeffizienten.

Tab. 6 Korrekturfaktoren für die 8x7 c-erb-Sondenpositionen eines Chips zur Generierung der Ausgleichsmatrix

Angegeben sind die VKs der Korrekturfaktoren an den einzelnen Sondenpositionen für n = 6 Messungen (0.1 nM und 0.2 nM c-erb-50-Cy5-Targetlösung: je n = 3 Messungen).

Faktoren							VK (%)						
5.66	2.16	1.48	1.21	1.43	1.72	3.64	19.15	6.65	0.20	2.32	5.07	1.16	5.37
3.85	1.68	1.11	1.08	1.12	1.44	2.29	8.21	1.74	2.88	6.31	1.50	2.81	6.88
3.11	1.37	1.14	1.05	1.15	1.40	1.90	8.76	1.97	0.02	3.75	3.52	1.70	2.51
3.02	1.31	1.27	1.08	1.12	1.46	1.99	11.23	0.50	3.52	3.57	2.39	3.54	5.12
3.26	1.42	1.05	1.04	1.15	1.56	2.18	12.34	4.77	5.39	3.02	0.21	0.03	3.22
4.35	1.56	1.20	1.13	1.33	1.80	2.78	10.63	2.98	8.59	0.75	6.84	4.48	4.76
6.11	2.09	1.49	1.56	1.74	2.51	3.88	15.61	3.92	0.09	14.18	0.47	0.55	2.97
8.73	2.50	2.00	1.95	2.25	3.27	5.51	26.02	4.43	2.60	3.74	0.91	2.20	11.25

Es wird deutlich, dass die Korrekturfaktoren teilweise bereits mit einem stark schwankenden und nicht unerheblichen statistischen Fehler belegt waren. Die daraus generierte Korrekturmatrix sollte deshalb nur für 6x5-Arrays angewendet werden, weil besonders bei der

Interpolation in den Randbereichen große Fehler auftraten. Wurde die Matrix auf die zentralen 6x5-Endwerte des hier betrachteten Arrays angewendet, so ergab sich wie erwartet ausgehend von einem für die unkorrigierten 30 Spot-Signale erhaltenen MW von 2034 ± 401 counts (VK: 20 %) eine gute Kompensation der Werte zu einem MW von 2685 ± 80 counts (VK: 3 %). Die Qualität der Korrektur verschlechterte sich jedoch, sobald die Matrix auf den 6x5-c-erb-Array eines anderen Chips angewendet wurde, so betrug der VK über die 6x5 korrigierten Werte in einem Fall auch nach der Korrektur noch 16 %. Um die Abweichungen zwischen den von unterschiedlichen 8x7-Arrays abgeleiteten Korrekturmatrizen näher zu bestimmen, wurden daher nach der geschilderten Methode auch mit zwei weiteren 8x7-c-erb-Chips Ausgleichsmatrizen bestimmt. Abb. 37 zeigt, dass die prozentuale Abweichung in dem betrachteten 6x5-Sonden-Ausschnitt stark variierte und teilweise fast 20 % erreichte. Ursache für diese Unterschiede bei konstanten Einstellungen des Auslesegerätes waren zum einen die Positioniergenauigkeit des Glaschips im Gerät und zum anderen Abweichungen bei der Immobilisierung des Sondenarrays. Zudem hat der hier dargestellte Vergleich noch nicht die statistischen Fehler der einzelnen Matrizen berücksichtigt.

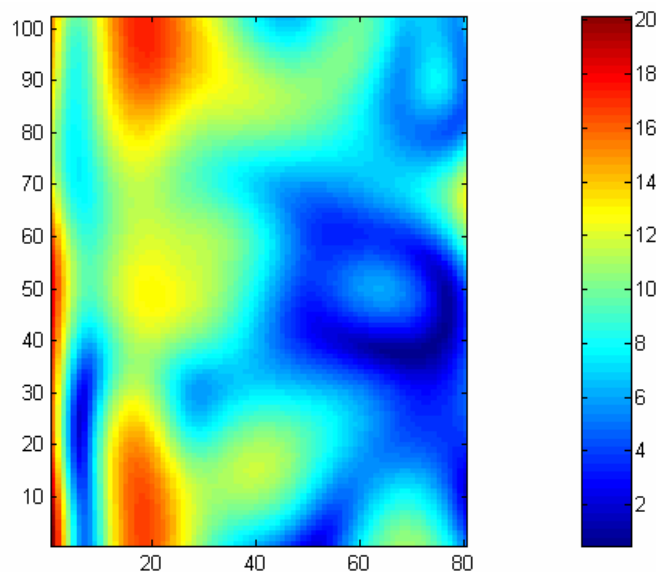


Abb. 37 2D-Darstellung der prozentualen Abweichung zwischen drei Korrekturmatrizen im Bereich des 6x5-Arrays

Einheit der Falschfarbenskala: %

Spotinterne Korrektur

Bei der spotinternen Korrekturmethode wurde die Generierung der Korrekturfaktoren auf jedem einzelnen Sondenarray integriert, indem jedem Sondenarray eine Referenz-Sondenarray zur Generierung der lokalen Korrekturfaktoren durch Vorab-Hybridisierung mit dem komplementären Target zugemischt wurde. Für die Entwicklung der Methode wurde zunächst das Mischverhältnis zweier Sondenarray innerhalb eines Spots dahingehend

optimiert, dass an der als Referenz gewählten Sonde NPT1-18-0mm mit einer relativ großen Targetkonzentration ein ausreichend intensives Signal zur Erzeugung der Korrekturfaktoren erhalten werden konnte, während die Konzentration der eigentlichen Sonde noch einen ausreichenden Überschuss bei der Hybridisierung gewährleistete. Eine Zusammensetzung der Sondenlösung aus 1.2 μM NPT1-18-0mm und 4.8 μM Zielsonde (z.B. c-erb-47-0mm) erwies sich dabei als geeignet (Daten nicht gezeigt).

Um die Korrekturmethode näher zu charakterisieren, wurden drei BK7-Glaschips mit einem 5x5-Array einer Mischung aus c-erb- und NPT1-Sonde belegt und die spotinternen Faktoren durch Hybridisierung mit NPT1-18-Cy5 erhalten. Zur Veranschaulichung sind in Tab. 7 die Korrekturfaktoren der 5x5 Positionen eines Chips sowie deren Variationskoeffizienten dargestellt. Die Werte verhielten sich wie erwartet ähnlich zu den im zentralen Bereich des 8x7-Arrays gelegenen in Tab. 6. Die relativ geringen Variationskoeffizienten spiegeln die übliche Arbeitsstabilität des Sensorsystems wider und lagen im Mittel bei $5.4 \pm 1.9 \%$. Es zeigte sich, dass bei den hier gewählten Geräteeinstellungen im überwiegenden Bereich des Arrays die Signalstärken maximal um den Faktor 1.5 (entsprechend einem Abfall der Ausleuchtung auf 66 %) voneinander abwichen, nur in den extremen Randpositionen erreichten die Faktoren Werte von ≥ 2 .

Tab. 7 Korrekturfaktoren für die 5x5 Sondenpositionen der Mischspots eines Chips bei spotinterner Korrektur des Ausleuchtungsprofils

Angegeben sind die VKs der Korrekturfaktoren an den einzelnen Sondenpositionen für $n = 5$ Messungen mit 1 nM NPT1-18-Cy5-Target.

Faktoren					VK (%)				
2.49	1.66	1.25	1.22	1.40	3.34	8.06	5.98	4.88	8.54
1.81	1.43	1.25	1.01	1.42	6.97	7.40	4.06	0.78	6.36
1.91	1.41	1.18	1.05	1.33	4.27	5.54	6.80	6.06	2.07
1.71	1.40	1.07	1.09	1.32	6.17	2.63	5.79	3.72	7.45
2.26	1.57	1.24	1.22	1.71	4.50	6.95	7.15	4.23	4.73

Die Faktoren wurden dann zur Korrektur von Messdaten eingesetzt, die auf den drei Chips durch jeweils dreifache Hybridisierung des 0.5 nM Targets c-erb-50-Cy5 mit der Maximumsmethode erhalten worden waren. Für diese $n = 9$ Messungen konnte der VK des Mittelwertes über alle 5x5-c-erb-Steigungswerte im Mittel durch die Korrektur von $20.2 \pm 0.6 \%$ auf $7.9 \pm 1.5 \%$ reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Bei Korrektur der Daten mittels einer Korrekturmatrix wurde die Abweichung zwischen den 25 Sondenspots mit eigentlich identischer Anbindung dagegen nur auf $13.9 \pm 1.9 \%$ verringert. Die spotinterne Korrekturmethode stellte damit beim Vergleich beider Methoden die insgesamt weniger fehleranfällige Variante dar, weil dabei die Abweichungen zwischen verschiedenen Chips vernachlässigt

werden konnten. Dennoch erlaubte auch dieses Verfahren keine einwandfreie Korrektur des Ausleuchtungsprofils und stellte einen zusätzlichen Aufwand für die gesamte Analyse dar. Weil im weiteren Verlauf der Arbeit mit dem DNA-Biosensor das Ausleuchtungsprofil noch etwas stärker aufgeweitet wurde, wodurch sich eine noch homogenere Intensität der Anregung ergab, konnte auf eine Korrektur verzichtet werden.

5.1.4 Kinetische Untersuchungen

5.1.4.1 Differenzierung in der Dissoziationsphase

Durch den Vergleich der Bindungskinetiken zweier unterschiedlicher Hybridisierungssequenzen konnte exemplarisch demonstriert werden, dass auch die Dissoziation zur Differenzierung zwischen zwei unterschiedlich starken Wechselwirkungen genutzt werden kann. Abb. 38 zeigt dazu die Signalverläufe für Assoziation und Dissoziation bei der Hybridisierung zum einen eines 50mer-Targets (c-erb-50-Cy5) mit der komplementären 47mer-Sonde und zum anderen eines 56mer-Targets (NPT1-56-Cy5) mit der viel kürzeren, zentral am Target angreifenden 18mer-Sonde. Es wird deutlich, dass zwischen der unterschiedlichen Dissoziationsstärke beider Hybridisierungssysteme unterschieden werden konnte. Das NPT1-System mit der kürzeren Hybridisierungssequenz zeigte eine deutlich stärkere Tendenz zur Ablösung des fluorophormarkierten Targets. Es ist jedoch auch erkennbar, dass in beiden Fällen die angebondenen Targetmoleküle in der Dissoziationsphase nicht vollständig abgelöst wurden.

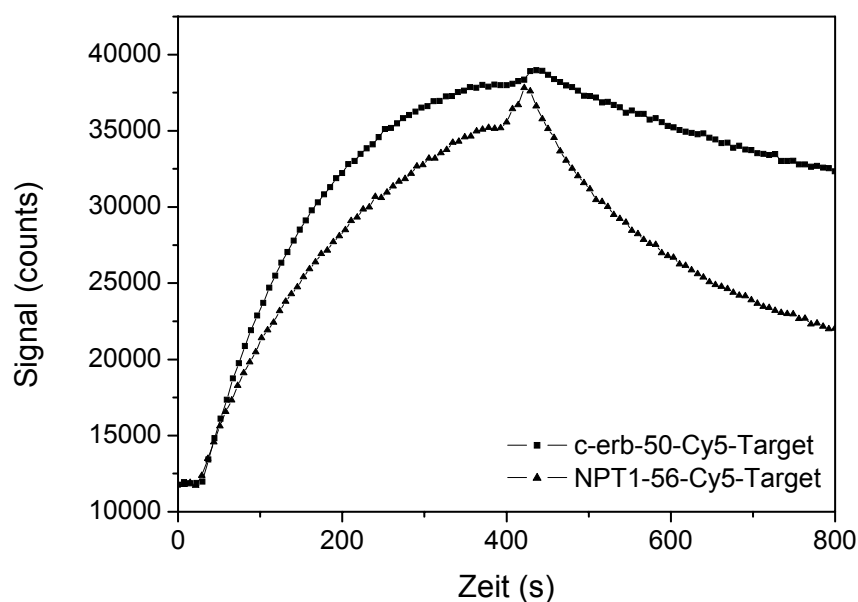


Abb. 38 Signalverläufe für Assoziation und Dissoziation zweier unterschiedlicher Systeme

Sonden: c-erb-47-0mm (0.16 μM) und NPT1-18-0mm (3.4 μM), Targets: c-erb-50-Cy5 (5 nM) und NPT1-56-Cy5 (7.5 nM), BK7-Glaschip. Signalverlauf auf dem intensivsten Pixel innerhalb des Sondenspots.

Die aufgenommenen Assoziationsverläufe ließen hier keinen direkten Vergleich zwischen den beiden betrachteten Sequenzsystemen zu, da in beiden Fällen verschiedene Target- und auch Sondenkonzentrationen verwendet wurden. Bei exakt gleichen Voraussetzungen wäre auch die Unterscheidung in der Assoziationsphase durch einen viel stärkeren Signalanstieg für das längere c-erb-System noch deutlicher möglich gewesen. Die Dissoziation, und damit auch die Geschwindigkeitskonstante k_{off} , verhält sich als Reaktion 1. Ordnung jedoch unabhängig von Target- und Sondenkonzentration, so dass sich die Konstanten k_{off} aus jeweils $n = 3$ Signalverläufen zu $(3.0 \pm 0.7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für das c-erb-System und $(6.2 \pm 1.2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für das NPT1-System ergaben (vgl. auch Abb. 41).

5.1.4.2 Bestimmung kinetischer Konstanten für verschiedene Systeme

Durch Aufnahme der Bindungskinetiken bei unterschiedlichen Targetkonzentrationen wurden die kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} sowie die Gleichgewichtskonstante K_D für die Wechselwirkung folgender Hybridisierungssequenzen bestimmt:

- Target Actin-51-Cy5 und Sonde Actin-45-0mm
- Target Actin-51-Cy5 und Sonde Actin-45-5mm
- Target NPT1-18-Cy5 und Sonde NPT1-18-0mm

Die Charakterisierung der Wechselwirkungen des Actin-Systems konnte simultan erfolgen, da auf dem entsprechenden Sensorchip die perfekt komplementäre 0-mismatch- sowie die 5-mismatch-Sonde nebeneinander immobilisiert worden waren. Die entsprechende 10-mismatch-Sonde befand sich zwar auch auf der Sensoroberfläche, da für diesen Sondenspot jedoch keine Anbindung detektiert wurde, konnten für diese Hybridisierungssequenz auch keine kinetischen Konstanten bestimmt werden. Gleiches gilt für die Wechselwirkung des NPT1-18-Cy5-Targets mit der NPT1-18-1mm-Sonde.

Aufgrund der relativ aufwendigen Bestimmungsmethode wurde der Signalverlauf nicht für jede Targetkonzentration mehrfach aufgenommen, nur einige Konzentrationen wurden zwei- oder dreifach vermessen, und zwar zumeist dann, wenn durch die Verknüpfung der aufeinander folgenden Einzelmessungen zunächst nur sehr ungleichmäßige Signalverläufe in der Assoziationsphase aufgenommen werden konnten und diese Ergebnisse in weiteren Versuchen verbessert werden sollten. Nicht für alle Targetkonzentrationen wurde neben der Assoziation auch die Dissoziation betrachtet. Die Signalabnahme unter Hybridisierungspuffer wurde nur nach Hybridisierung mit relativ großen Targetkonzentrationen verfolgt.

Es muss vorab betont werden, dass alle hier dargestellten Ergebnisse mit einem relativ großen Fehler behaftet sind, der jedoch nicht näher bestimmt werden konnte. Er wurde z.B. auch dadurch verursacht, dass die Assoziationsverläufe einer Targetsequenz bei verschiedenen Konzentrationen zwar immer auf dem gleichen Sondenspot innerhalb eines konstanten Arrays, aber teilweise auf unterschiedlichen Sensorchips aufgenommen wurden,

wodurch sich eine nicht ganz einheitliche Lage der Spots im Ausleuchtungsprofil und damit auch eine Variation der Signalniveaus in Sättigung ergab. Ebenso wie eine Variation der Sondenkonzentration hatte dagegen auch eine Variation der Ausleuchtungsintensität prinzipiell keine Auswirkung auf das Ergebnis beim Vergleich der Bindungskinetiken unterschiedlicher Hybridisierungssequenzen. Weiterhin wurde mit der für kinetisch kontrollierte Messungen nicht ganz optimalen Fließrate von $0.5 \mu\text{l/s}$ gearbeitet, da somit die Zeiten der einzelnen Messintervalle auf 400 s verlängert werden konnten und die Methode erst dadurch praktikabel war. Dennoch ermöglichte das Verfahren die Charakterisierung der betrachteten Hybridisierungssequenzen und die erhaltenen Ergebnisse geben die grundsätzlichen Tendenzen richtig wider.

In Abb. 39 sind exemplarisch die Bindungskinetiken für das Actin-51-Cy5-Target an der Actin-45-0mm-Sonde bei unterschiedlichen Targetkonzentrationen dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass das Gleichgewichtsniveau mit zunehmender Targetkonzentration anstieg und der Bereich des linearen Signalanstiegs während der Assoziation umso länger andauerte, je geringer die Targetkonzentration war, so dass z.B. mit einer 0.1 nM Targetlösung bei der hier gewählten Sondenkonzentration auch nach 2400 s noch kein Sättigungsniveau erreicht wurde. Der Wert für R_{eq} konnte daher für die kleineren Targetkonzentrationen nur angenähert werden. Es deutet sich hier außerdem wie auch schon bei dem Ergebnis in Abb. 38 an, dass das Signal bei fortschreitender Dissoziation nicht wieder ganz das Ausgangsniveau vor Beginn der Hybridisierung erreichte.

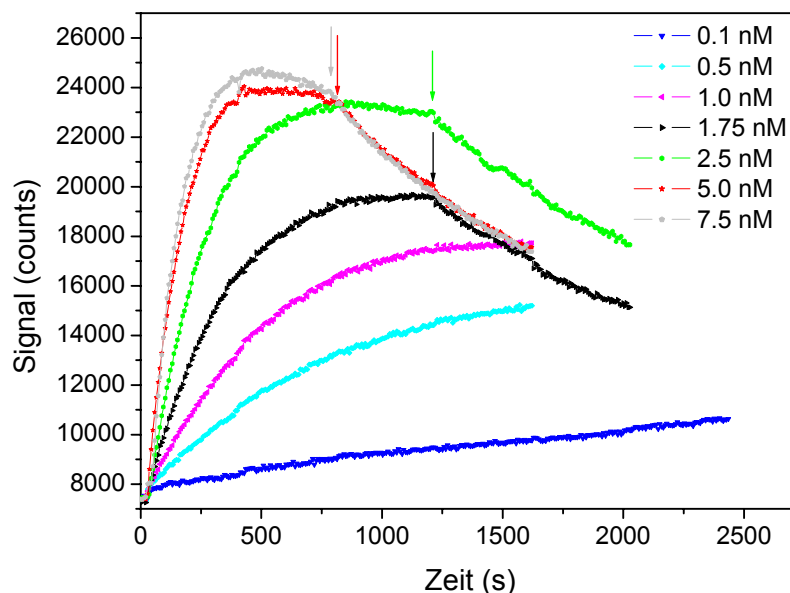


Abb. 39 Bindungskinetiken des Actin-51-Cy5-Targets an der perfekt komplementären Sonde

Sonde: Actin-45-0mm ($0.14 \mu\text{M}$), BK7-Glaschip. Target in verschiedenen Konzentrationen hybridisiert und anschließend in Hybridisierungspuffer ohne Target dissoziiert, \downarrow = Beginn der Dissoziation. Signalverlauf auf dem intensivsten Pixel innerhalb des Sondenspots. R_{eq} (Abb. 40) durch hyperbolischen Fit des Assoziationsverlaufes als Differenz der Signalintensität im Gleichgewicht und zu Beginn der Assoziation erhalten.

Abb. 40 zeigt die Auswertung aller für das Actin-System sowohl an der perfect-match(pm)- als auch an der five-mismatch(5mm)-Sonde aufgenommenen Assoziationsverläufe durch Auftragung der R_{eq} -Werte gegen die Konzentration. Durch den hyperbolischen Fit nach (Gl. 8) konnten für beide Systeme die Niveaus des maximalen Fluoreszenzsignals R_{max} gut angenähert werden (Tab. 8). Es fällt auf, dass sich diese Werte für das pm- und das 5mm-System stark unterscheiden und das maximal erreichbare Signal für die Actin-45-5mm-Sonde nur etwa 43 % des pm-Signals betrug. Diese Tatsache hat gezeigt, dass unter dem maximalen Fluoreszenzsignal R_{max} nicht einfach der Wert verstanden werden darf, der sich bei Belegung aller immobilisierten Sondenmoleküle mit fluorophormarkiertem Target ergibt, denn dann hätten sich die R_{max} -Werte für das pm- und das 5mm-System nicht unterscheiden dürfen. Vielmehr berücksichtigt die Größe R_{max} auch andere Aspekte der Hybridisierung, wie z.B. die unterschiedliche Effizienz der Wechselwirkung bei pm- und mm-Sequenzen, aber eventuell auch die unterschiedliche Zugänglichkeit verschiedener Sondensequenzen durch Bildung von Sekundärstrukturen im Spot.

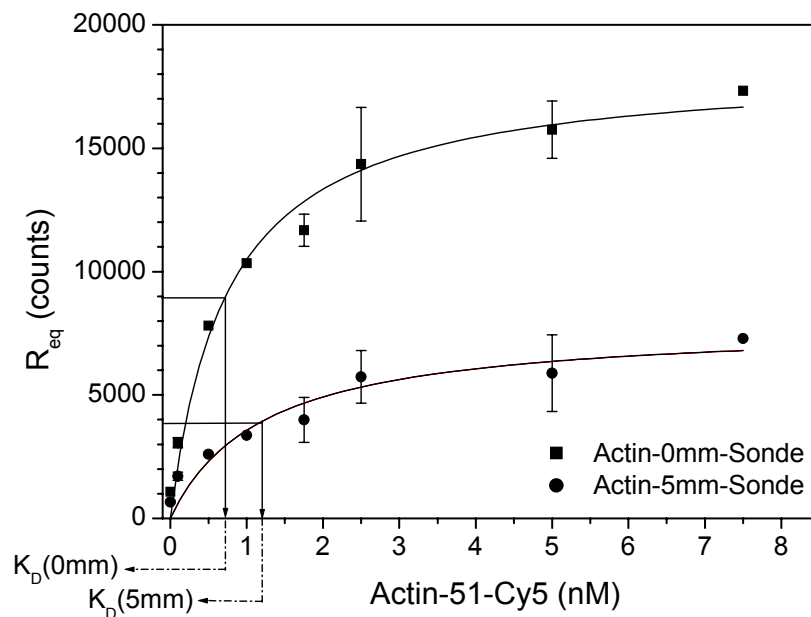


Abb. 40 Abhängigkeit des Signals im Gleichgewicht R_{eq} von der Targetkonzentration für die Hybridisierung des Actin-51-Cy5-Targets mit pm- und 5mm-Sonde

Die Auswertung in Abb. 40 zeigt auch, dass die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_D aus dem x-Achsenabschnitt bei $R_{eq} = 0.5 R_{max}$ je nach Qualität der Messdaten mit einem relativ großen Fehler behaftet war. Die in Tab. 8 angegebenen Fehler von K_D und R_{max} ergaben sich bei Berechnung der hyperbolischen Ausgleichskurve in *Origin*[®] (OriginLab, Northampton, USA). Wie erwartet wurden für die Hybridisierung auf der 5mm-Sonde ein größerer K_D -Wert und entsprechend eine größere Dissoziationsstärke als auf der pm-Sonde erhalten.

Mit $k_{on}(1)$ sind in Tab. 8 die Werte der Assoziationskonstanten bezeichnet worden, die sich nach (Gl. 7) aus k_{off} und K_D ergaben. Die Fehler der k_{off} -Werte beruhen dabei auf Mehrfachbestimmung mit mindestens $n = 5$, während die Fehler der $k_{on}(1)$ -Werte durch Fehlerfortpflanzung erhalten wurden. Die $k_{on}(2)$ -Werte gingen dagegen aus der Gleichung für die lineare Anfangssteigung (Gl. 5) hervor, wobei als Steigungswert jeweils der für den betrachteten Spot im Zeitraum 60-120 s nach der Maximumsmethode erhaltene Wert bei 0.5 nM Targetlösung eingesetzt wurde. Für die Signalsteigungen wurde ein relativer Fehler von 5 % zugrunde gelegt, der Fehler der Konzentrationsangabe wurde vernachlässigt. Die Fehler der $k_{on}(2)$ -Werte ergaben sich ebenfalls nach den Fehlerfortpflanzungsgesetzen. Analog wurde auch zur Bestimmung der kinetischen Konstanten des NPT1-18mer-Systems verfahren, die Ergebnisse finden sich ebenfalls in Tab. 8 und sind graphisch in Abb. 41 dargestellt.

Tab. 8 Kinetische Konstanten für verschiedene Hybridisierungssequenzen

n.b. = nicht bestimmt

	<u>Actin-51-Cy5 + Actin-45-0mm</u>	<u>Actin-51-Cy5 + Actin-45-5mm</u>	<u>NPT1-18-Cy5 + NPT1-18-0mm</u>	<u>NPT1-56-Cy5 + NPT1-18-0mm</u>
k_{off} ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	0.9 ± 0.2	2.3 ± 0.5	2.6 ± 0.6	6.2 ± 1.2
R_{max} (counts)	18339 ± 856	7900 ± 914	15957 ± 946	n.b.
K_D (nM)	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.6 ± 0.3	n.b.
$k_{on}(1)$ ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	1.2 ± 0.4	1.9 ± 1.1	1.6 ± 0.9	n.b.
dR/dt (counts/s)	10.1 ± 0.5	3.2 ± 0.2	9.1 ± 0.5	n.b.
$k_{on}(2)$ ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	n.b.

Beim Vergleich der Ergebnisse für die beiden Actin-Systeme wird deutlich, dass sich die mismatches tatsächlich auf alle drei Phasen der Hybridisierung ausgewirkt haben. Die größere Stärke der Dissoziation der 5mm-Wechselwirkung hat sich nicht nur in der Gleichgewichtskonstante K_D , sondern auch in der Geschwindigkeitskonstante k_{off} niedergeschlagen. Lediglich die Berechnung der Assoziationskonstante $k_{on}(1)$ aus K_D und k_{off} lieferte hier besonders für das 5mm-System kein sinnvolles Ergebnis, welches allerdings auch mit einem zu großen Fehler behaftet war, um signifikant zu sein. Die Bestimmung von k_{on} aus der linearen Anfangssteigung zeigte jedoch, dass Basenfehlpaarungen auch in der Assoziations-

phase unterschieden werden können, wenngleich der Unterschied zwischen $k_{on}(2)$ für die pm- und die 5mm-Hybridisierung kleiner als aufgrund der Steigungsunterschiede erwartet ausgefallen ist. Ursache dafür ist die Tatsache, dass die unterschiedlichen Hybridisierungseigenschaften der beiden Systeme und damit auch die Auswirkung der mm-Wechselwirkung bereits einen relativ großen Unterschied der R_{max} -Werte bewirkt haben.

Beim Vergleich zwischen der Hybridisierung des Actin-51-Cy5-Targets mit der Actin-45-0mm-Sonde und der des NPT1-18-Cy5-Targets mit der NPT1-18-0mm-Sonde fällt zunächst ein großer Unterschied bezüglich der Konstanten für die Dissoziation, K_D und k_{off} , auf, der ähnlich bereits in 5.1.4.1 beobachtet wurde und auf der viel geringeren Anzahl an Basenpaarwechselwirkungen im NPT1-System beruht. Die Tatsache, dass sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{on}(2)$ beider Systeme dagegen kaum unterschieden, ist auf zwei gegenläufige Effekte zurückzuführen. Zum einen war das Actin-System bei der Anbindung durch die größere Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotidbasen begünstigt. Zum anderen war die Hybridisierung des längeren Actin-Targets im Vergleich zum kürzeren NPT1-Target aber aufgrund des komplexeren Bindungsvorganges stärker behindert, so dass sich beide Effekte hier ausgeglichen haben.

Wie deutlich sich die sterische Hinderung bei Hybridisierung des beidseitig überlappenden NPT1-56-Cy5-Targets mit der NPT1-18-Sonde im Vergleich zur Hybridisierung des kurzen NPT1-18-Cy5-Targets auswirkte, zeigt ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten k_{off} für beide Systeme.

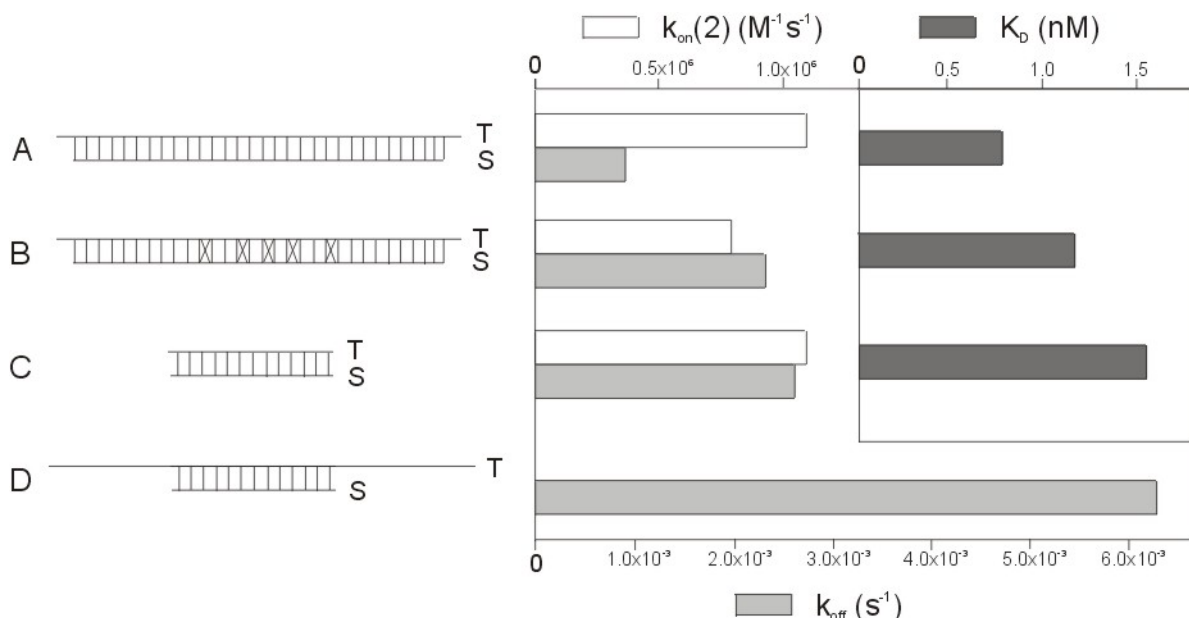


Abb. 41 Graphische Darstellung der kinetischen Konstanten aus Tab. 8

S: Sonde, T: Target; A: Actin-51-Cy5 (T) + Actin-45-0mm (S), B: Actin-51-Cy5 (T) + Actin-45-5mm (S), C: NPT1-18-Cy5 (T) + NPT1-18-0mm (S), D: NPT1-56-Cy5 (T) + NPT1-18-0mm (S), X: mismatch.

5.1.5 Vom Target-Oligonukleotid zum PCR-Produkt

5.1.5.1 Kalibration für ein Target-Oligonukleotid aus dem *cytb*-Gen

Um die Leistungsfähigkeit des DNA-Biosensors zu demonstrieren und die Einstellungen des Auslesegerätes z.B. nach Umbaumaßnahmen zu charakterisieren, wurden für verschiedene Hybridisierungssequenzen Kalibrationen aufgenommen. Abb. 42 zeigt z.B. eine Kalibration für das Rind-46-Cy5-Target bei Hybridisierung mit der 20mer-Sonde Rind684, welche im weiteren Verlauf auch zur Analyse der 377bp-*cytb*-PCR-Produkte zur Tierartendifferenzierung eingesetzt wurde (vgl. 5.2.3.1). Im untersuchten Messbereich von 0.015 bis 1 nM bestätigte sich hier wie auch schon in 5.1.3.5 der lineare Zusammenhang zwischen Steigung und Konzentration. Die Sensitivität betrug 12.8 ± 0.7 counts/(s*nM) bei einer Nachweisgrenze von 13 pM.

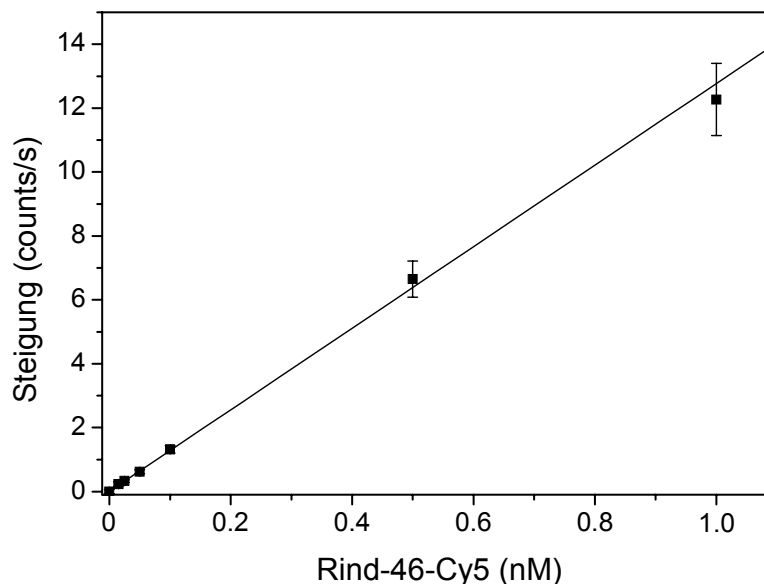


Abb. 42 Kalibration für das Rind-46-Cy5-Target

Sonde: Rind684, keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über $n = 3$ Spots und $n = 3$ Messungen.

Ein analoges Ergebnis wurde bei Hybridisierung mit der Huhn684-Sonde für die Kalibration des Huhn-46-Cy5-Targets erhalten, bei der die etwas geringere Sensitivität (10.5 ± 0.6 counts/(s*nM)) sowie die minimal schlechtere Nachweisgrenze (15 pM) auf den geringeren GC-Gehalt und damit die etwas schwächeren Wechselwirkungen der Hybridisierungssequenz zurückzuführen sind (Daten nicht gezeigt).

5.1.5.2 Denaturierungseffekt bei Hybridisierung eines Oligo-Doppelstranges

Um den Unterschied zwischen der Hybridisierung eines einzelsträngigen und eines doppelsträngigen DNA-Stranges unter definierten und kontrollierten Bedingungen zu verdeutlichen,

wurde für die Actin-45-0mm-Sonde die Anbindung des einzelsträngigen Actin-51-Cy5-Targets mit der des Hybrids aus Targetoligonukleotid und komplementärem Gegenstrang-oligonukleotid (Actin-51-gegen) sowohl mit als auch ohne vorangegangene thermische Denaturierung verglichen (Abb. 43). Das Ergebnis zeigt, dass bei zunehmendem Anteil des Gegenstranges in der Targetlösung die Hybridisierung des Cy5-markierten Targetmoleküls an die Fangsonde immer stärker unterdrückt wurde, bis schließlich bei einer 1:1-Mischung von Target und Gegenstrang ohne Denaturierung nur noch 19 % des Signals der reinen Targetlösung erreicht wurden. Ursache dafür ist die Tatsache, dass ein zunehmender Teil der Targetmoleküle in doppelsträngiger Form in der Probenlösung vorlag und dadurch nicht mehr an die immobilisierten Sondenmoleküle binden konnte. Dass dennoch bei 1:1-Mischung von Target und Gegenstrang eine geringe Anbindung beobachtet wurde, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Sondenmoleküle den Gegenstrang teilweise aus dem Doppelstrang verdrängten. Wurde die Probenlösung dagegen vor der Messung denaturiert, fiel die Abnahme des Fluoreszenzsignals bei Zumischung des Gegenstranges deutlich geringer aus. Allerdings ergab sich für die doppelsträngige DNA bei gleichem Verhältnis von Target und Gegenstrang trotz Denaturierung ein 24 % geringeres Signal als für das einzelsträngige Target, da auf der Sensoroberfläche die Hybridisierung des Targets mit der Fangsonde und die Renaturierung mit dem Gegenstrang konkurrierten. Dieses Ergebnis konnte auch bei einem Vergleich der durch Kalibration bestimmten Sensitivitäten für den Nachweis des Actin-Targets einzeln und in Mischung mit dem Gegenstrang bei Denaturierung bestätigt werden, wo für den Doppelstrang nur 76 % der Sensitivität des Einzelstranges erreicht wurden (Daten nicht gezeigt).

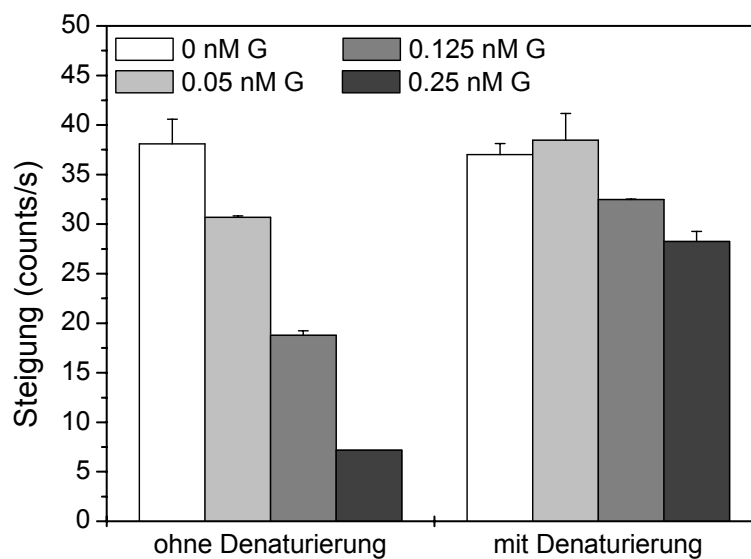


Abb. 43 Einfluss der Denaturierung auf die Hybridisierung von Mischungen des einzelsträngigen Actin-51-Cy5-Targets mit dem komplementären Gegenstrang

Sonde: Actin-45-0mm, Target: Actin-51-Cy5 (0.25 nM), Gegenstrang (G) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. BK7-Glaschip, spotinterne Korrektur, MAX-Auswertung über $n = 2$ Spots und $n = 3$ Messungen.

5.1.5.3 Hybridisierung von *cytb*-PCR-Produkten

Im nächsten Schritt wurden an Stelle der Target-Oligonukleotide Cy5-markierte PCR-Produkte nach Denaturierung auf der Sensoroberfläche hybridisiert. Abb. 44 B zeigt exemplarisch das Steigungsbild bei Anbindung des 377bp-*cytb*-PCR-Produktes der Spezies Rind (vgl. 3.2.4) auf einem Array unterschiedlicher Fangsonden (Abb. 44 A). Obwohl das PCR-Produkt nicht-aufgereinigt und die Probenmatrix hier deutlich komplexer war als bei Hybridisierung der Modell-Targets, traten keine Probleme etwa bezüglich unspezifischer Anbindung auf. Bei Analyse der Standard-PCR-Produkte mit Cy5-Primer-Markierung wirkte sich auch der erhöhte Fluoreszenzhintergrund durch die relativ große Konzentration des unverbrauchten Cy5-Primers nicht negativ auf das Ergebnis aus. Trotz des großen Längenunterschieds zwischen der immobilisierten Fangsonde und dem Cy5-markierten *antisense*-Strang des PCR-Produktes scheint die Anbindung sterisch nicht grundsätzlich behindert gewesen zu sein, da auch mit relativ kleinen PCR-Produkt-Volumina intensive Signale erhalten werden konnten. Die Signalanstiege verliefen auch bei Hybridisierung großer PCR-Produkt-Konzentrationen streng linear (Abb. 44 C), so dass alle zuvor mit Modelltargets optimierten Systembedingungen für die Detektion von PCR-Produkten übernommen werden konnten.

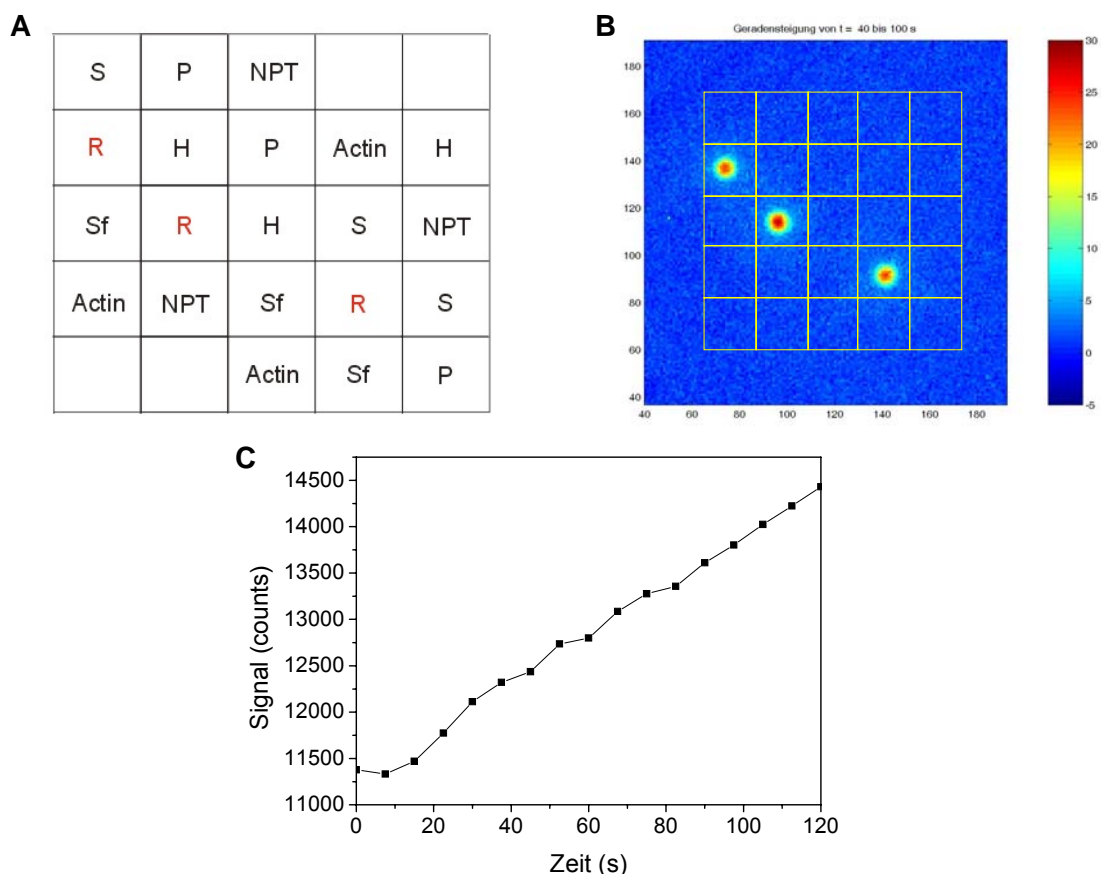


Abb. 44 Hybridisierung eines Cy5-markierten 377bp-*cytb*-PCR-Produktes der Spezies Rind

A: Belegung des Sondenarrays (S: Schwein684, P: Pute684, R: Rind684, H: Huhn684, Sf: Schaf684, Actin: Actin-45-0mm, NPT: NPT1-18-0mm), **B:** Steigungsbild im Bereich 40-100 s für die Messung mit 5 µl PCR-Produkt (Konzentration wurde nicht bestimmt), **C:** Signalverlauf auf einem Pixel des intensivsten Spots.

5.1.5.4 Regenerierbarkeit nach Messung von PCR-Produkten

Es hat sich gezeigt, dass die Arbeitsstabilität des Sensors bei Hybridisierung von PCR-Produkten nicht beeinträchtigt wurde. Bei wiederholter Messung eines einzelnen PCR-Produktes verhielt sich das Detektionssignal über $n = 15$ Messungen nahezu konstant mit einer über drei Spots gemittelten Drift von -0.002 ± 0.007 counts/s pro Messung ($< 0.1\%$ pro Messung) bei einem VK von $5.4 \pm 0.6\%$. Auch mit PCR-Produkten wurden daher im DNA-Sensorchip üblicherweise bis zu 20 Messungen pro Objektträger durchgeführt.

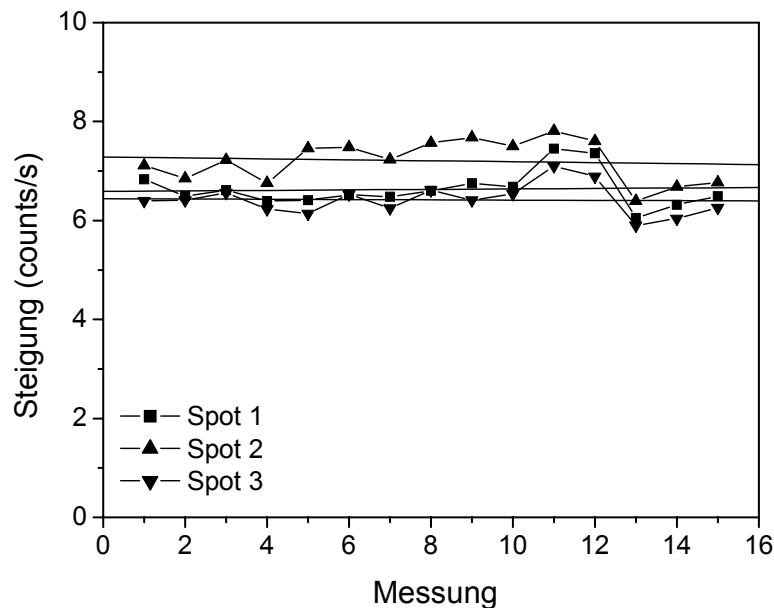


Abb. 45 Regenerierbarkeit des DNA-Sensorchips nach Hybridisierung mit PCR-Produkten

Sonde Rind684, je Messung $8 \mu\text{l}$ Rind-PCR-Produkt (Konzentration wurde nicht bestimmt), keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung.

5.2 Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit die Realzeit-Hybridisierung im DNA-Sensorchip hinsichtlich verschiedener grundlegender Aspekte charakterisiert und optimiert worden war, sollte im weiteren Verlauf eine Methode zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln als praktisches Anwendungsbeispiel für den DNA-Sensorchip etabliert werden. Die Ergebnisse zur Tierartendifferenzierung sind im Folgenden in drei Kapitel aufgeteilt worden. Zunächst wird in 5.2.1 die Anwendung der molekularbiologischen Methoden zur Herstellung und Charakterisierung der cytb-PCR-Produkte beschrieben, bevor dann die Ergebnisse der weiteren Analyse der PCR-Produkte zum einen durch konventionelle Chiphybridisierung (5.2.2) und zum anderen durch Realzeit-Hybridisierung (5.2.3) dargestellt werden. Die Hybridisierung auf DNA-Chips als Stand der Technik soll dabei der Detektion im Sensorchip als Vergleichsmethode gegenübergestellt werden und die Vorteile der Realzeitmethode verdeutlichen.

5.2.1 Herstellung der cytb-PCR-Produkte

Für den simultanen Nachweis der Spezies Rind, Schwein, Huhn, Pute, Schaf und Ziege sollte mit Hilfe eines universellen Primerpaares in einer Konsensus-PCR für jede Spezies ein Fragment des cytb-Gens der mtDNA amplifiziert werden. Mit cytb403 als *forward*-Primer ab Position 403 des cytb-Gens und cytb779 als *reverse*-Primer wurden die Primersequenzen auf Basis des Abgleichs des cytb-Gens für die verschiedenen Spezies in interspezifisch möglichst sequenzkonservierten Regionen positioniert (Abb. 46, vgl. auch 3.2.4). Um vereinzelte Inhomologien in diesen Bereichen zwecks einer verbesserten universellen Anbindung der Primer an die *Template*-DNA aller untersuchten Spezies auszugleichen, wiesen einzelne Positionen der Primersequenzen absichtlich eine statistische Verteilung von zwei oder drei verschiedenen Basen auf („Wobbeln“). Die Sequenz des Primers cytb403 wurde außerdem um zwei Nukleotide auf 26 nt verlängert, wodurch die Bindungseigenschaften beider Primer, charakterisiert durch den Schmelzpunkt T_m , einander angenähert worden sind (vgl. Anhang Tab. 23). Unabhängig von der Spezies sollte bei der Konsensus-PCR ein 377bp großes PCR-Produkt mit verschiedenen internen Bereichen von großer interspezifischer Sequenzvariabilität entstehen, das anschließend durch Hybridisierung mit tierartspezifischen Sondensequenzen charakterisiert werden sollte. Die für die Analyse sowohl durch konventionelle Chiphybridisierung als auch durch Realzeit-Hybridisierung im DNA-Sensorchip notwendige Fluorophormarkierung wurde dabei unter Standardbedingungen durch 5'-Cy5-Markierung des cytb779-Primers eingeführt, so dass in diesem Fall nur der *antisense*-Strang markiert wurde (Abb. 46).

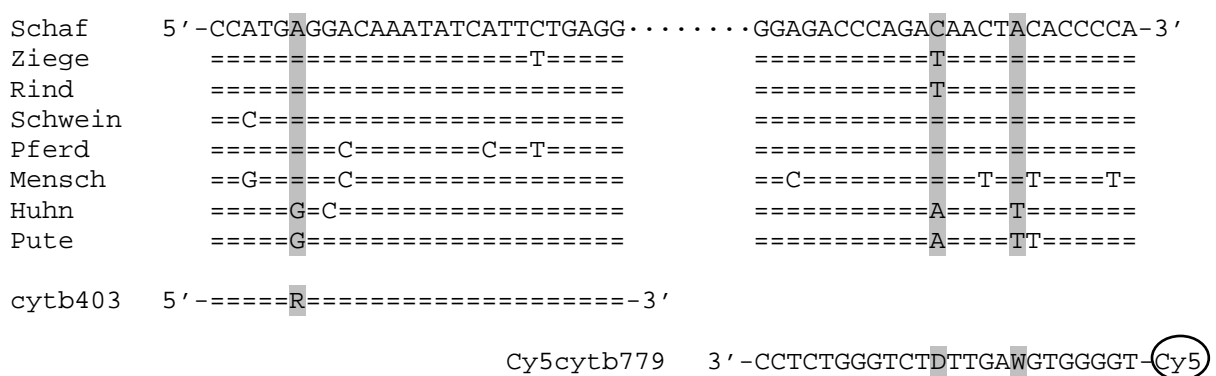


Abb. 46 Abgleich der cytb-Sequenzen verschiedener Spezies im Bereich der Primerbindungsstellen

Dargestellt sind die Sequenzen des cytb-*sense*-Stranges für die verschiedenen Spezies in den sequenzkonservierten Bereichen um die Positionen 403 und 779. Der *forward*-Primer cytb403 ist an einer Position und der *reverse*-Primer Cy5cytb779 an zwei Positionen „gewobbeln“ (grau unterlegt). R: A oder G, D: A oder G oder T (kein C), W: A oder T. Für Pferd und Mensch wurden die Primersequenzen hier nicht weiter optimiert, weil der Nachweis beider Spezies im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt wurde. Die 377bp-Amplifikate beider Spezies sollten lediglich auf Kreuzreaktivität bei der Hybridisierungsanalyse untersucht werden.

5.2.1.1 PCR der Referenz-DNA einzelner Spezies

Bei Einsatz aller zur Verfügung stehenden Referenz-DNAs (vgl. Tab. 2) als *Template* in der PCR wurden jeweils ohne weitere Optimierung der Standardbedingungen Produkte erhalten, die im Polyacrylamid-Gel (PA-Gel) eine intensive Bande bei 377 bp (vgl. 8.2) zeigten (Abb. 47). Auch für die Spezies Pferd wurde trotz dreier Basenfehlpaarungen zwischen dem Primer *cytb403* und der *Template*-DNA ein deutliches Produkt erhalten. In allen Ansätzen waren außerdem bei ≤ 60 bp je nach Reaktionsausbeute mehr oder weniger intensive Primer-Dimer-Doppelbanden zu erkennen. Nur bei einzelnen Spezies wie z.B. Ziege und Pute traten zusätzlich noch einzelne oder mehrere Banden im Bereich > 400 bp auf, die sich im weiteren Verlauf der Analyse aber nicht als störend erwiesen, zumal die entstandenen DNA-Moleküle mit > 400 bp bei einer Analyse der PCR-Produkte im ALFexpress™ Analysesystem (ALF) nicht detektiert wurden und dementsprechend nicht Cy5-markiert waren (Daten nicht gezeigt). Bei dem Pute-*Template* (Probe R-9) aus dem Ringversuch des BgVV traten diese zusätzlichen Banden z.B. nicht auf, so dass sie letztlich nicht spezies-, sondern probenspezifisch waren. Es fällt auf, dass die 377bp-Banden bei paralleler Auftragung im PA-Gel nicht immer genau auf einer Höhe liefen, weil in dem nicht denaturierenden Gel unterschiedliche Sekundärstrukturen die Laufgeschwindigkeit der PCR-Produkte beeinflussten. Wurden mehrere parallele PCR-Ansätze für eine *Template*-DNA durchgeführt, ergaben sich Schwankungen zwischen der Ausbeute der verschiedenen Reaktionsansätze.

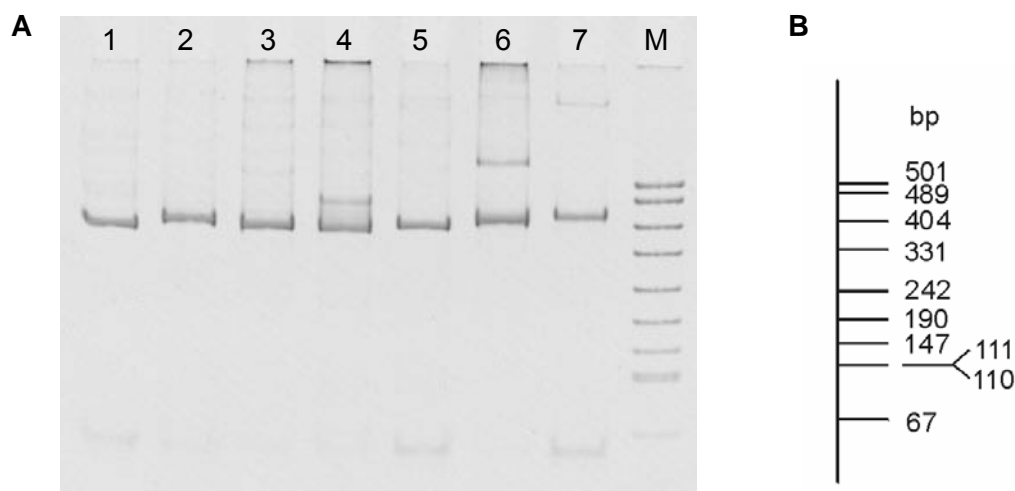


Abb. 47 Analyse der 377bp-cytb-PCR-Produkte verschiedener Spezies durch PAGE

A: PA-Gel nach Ethidiumbromidanfärbung, 1: Rind (Probe R-4), 2: Schwein (R-6), 3: Schaf (R-5), 4: Ziege (R-7), 5: Huhn (R-1), 6: Pute (R-3), 7: Pferd (R-2), M: pUC19-Marker; **B:** Zusammensetzung des pUC19-Markers.

Problematischer erwies sich die *cytb*-PCR lediglich bei Amplifikation von *Template*-DNA der Spezies Mensch. Unabhängig von der gewählten Probe traten relativ häufig Reaktionsansätze auf, bei denen die Reaktion gar nicht oder nur mit sehr geringer Ausbeute ablief (Abb. 48), was durch die schlechte Übereinstimmung zwischen den Primern und der

Template-DNA verursacht wurde. Da die Primer nicht gezielt für den Nachweis der Spezies Mensch konzipiert worden waren, kam es zwischen dem Cy5cytb779-Primer und der *Template*-Sequenz zu vier Basenfehlpaarungen, die alle nicht durch die statistische Basenverteilung an manchen Positionen des Primers erfasst wurden und von denen eine sehr ungünstig am 3'-Ende des Primers lag (Abb. 46). Abb. 48 zeigt auch deutlich, dass die Konzentration der Primer-Dimer umso größer war, je weniger PCR-Produkt entstanden ist.

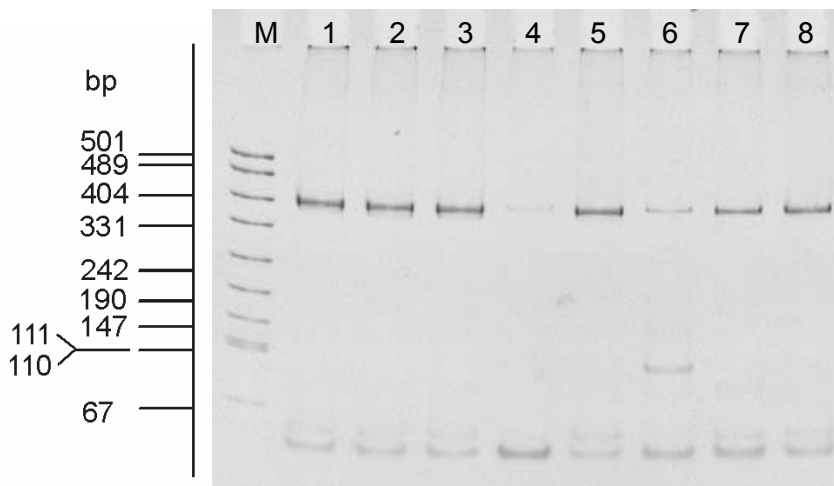


Abb. 48 Unterschiedliche Ausbeute bei Amplifikation von *Template*-DNA der Spezies Mensch Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, 1-4: Mensch-Probe R-12, 5-8: Mensch-Probe R-13.

5.2.1.2 Variation der *Annealing*-Temperatur

Um die PCR hinsichtlich Spezifität und Ausbeute zu optimieren, wurde zunächst die *Annealing*-Temperatur variiert (Abb. 49). Mit Schwein-*Template* wurde bei 66°C ein deutlicher Rückgang der PCR-Effizienz beobachtet, das Ergebnis konnte für das Rind-*Template* bestätigt werden. Nachdem für Huhn und Pute sichergestellt worden war, dass bei einer *Annealing*-Temperatur von 62°C ebenfalls noch keine Ausbeuteverluste auftraten, wurde die Anbindung der Primer als Kompromiss standardmäßig bei 62°C durchgeführt, um auch den Nachweis geringer DNA-Mengen der verschiedenen Spezies in den Realproben zu gewährleisten.

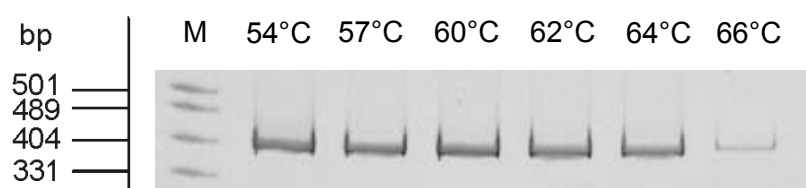


Abb. 49 Variation der *Annealing*-Temperatur bei Amplifikation von Schwein-*Template*-DNA Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, *Template*: Schwein-Probe R-11, M: pUC19-Marker.

5.2.1.3 Relative Quantifizierung der PCR-Produkt-Pools

Für die Spezies Rind (Probe R-10), Schwein (R-11), Huhn (R-8), Pute (R-9), Ziege (R-7) und Schaf (R-5) wurden PCR-Produkt-Pools hergestellt. Um die PCR-Produkte in weiteren Versuchen etwa zum Vergleich der Hybridisierungseffizienzen der verschiedenen Spezies bei den chipbasierten Nachweismethoden (vgl. 5.2.2.4, 5.2.3.2) optimal nutzen zu können, mussten ihre Konzentrationen relativ zueinander bestimmt werden. Diese relative Quantifizierung konnte durch parallele Detektion von Verdünnungen der Cy5-markierten PCR-Produkt-Pools im ALF durchgeführt werden, da der Markierungsgrad für alle PCR-Produkte aufgrund der Verwendung Cy5-markierter Primer 1 war. Die sechs Proben wurden dazu mehrfach nebeneinander im Gel aufgetragen. Abb. 50 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzsignale der ersten sechs Bahnen.

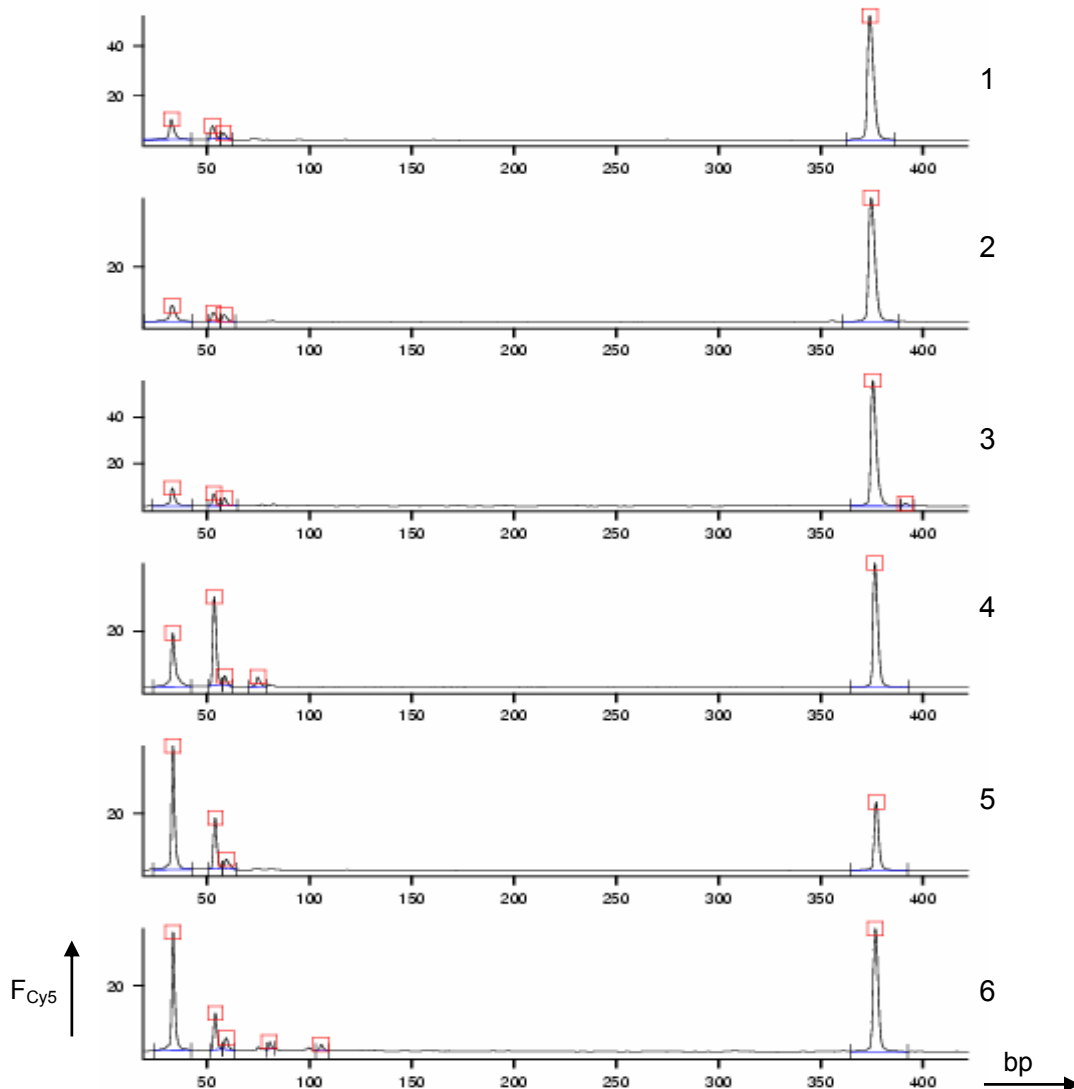


Abb. 50 Relative Quantifizierung der PCR-Produkt-Pools im ALFexpress™ Analysesystem

PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese getrennt und mit Hilfe des Cy5-Fluoreszenzsignals (F_{Cy5} , angegeben im Verhältnis (%) zur Intensität des gesättigten Signals) relativ zueinander quantifiziert, 1: Huhn, 2: Schaf, 3: Ziege, 4: Pute, 5: Schwein, 6: Rind. Aufgetragene PCR-Produkt-Verdünnungen: Huhn, Schaf und Ziege 1:30, Pute, Schwein und Rind 1:15.

Durch die Basenpaarskalierung anhand von 100 bp bzw. 300 bp großer Cy5-markierter Referenz-DNA ließ sich hier noch genauer als durch PAGE-Analyse feststellen, dass bei allen sechs Spezies tatsächlich einzelne 377bp-PCR-Produkte entstanden waren, die aufgrund der denaturierenden Eigenschaften des im ALF verwendeten, harnstoffhaltigen PA-Gels alle auf einer Höhe liefen. Im niedermolekularen Bereich traten eine Primer-Bande sowie Primer-Dimer-Doppelbanden auf, deren Intensität hier im Verhältnis zur 377bp-Bande größer war als im PA-Gel. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im PAGE aufgrund der Interkalation des Ethidiumbromids die Massen der aufgetrennten DNA-Fragmente und im ALF durch die Cy5-Detektion ihre Molaritäten verglichen werden. Abb. 50 verdeutlicht auch die Korrelation zwischen den Intensitäten der Primer- und der 377bp-Bande, dass nämlich bei hoher PCR-Ausbeute viel Primer verbraucht worden war und umgekehrt.

Durch Auswertung der 377bp-Bandenintensitäten in allen 18 Bahnen und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren ergaben sich die in Tab. 9 dargestellten Verhältnisse zwischen den Konzentrationen der PCR-Produkt-Pools. Es muss berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse mit einem relativ großen statistischen Fehler behaftet sind (zwischen 10 und 34 %), was insbesondere darauf zurückzuführen ist, dass die Laserleistung zur Anregung der Cy5-Fluoreszenz nicht über alle 40 Bahnen des ALF-Gels konstant war, sondern mit zunehmender Breite des Gels abnahm. Die Auswirkung des damit verbundenen Fehlers wurde aber durch den Vergleich relativ eng beieinander liegender Bahnen minimiert.

Tab. 9 Relative Signalintensitäten der PCR-Produkt-Pools im ALFexpress™ Analysesystem

F_{Pool} : Konzentrationsfaktor des jeweiligen PCR-Produkt-Pools in Bezug auf den Pool mit der geringsten Konzentration (Schwein). Bei der Berechnung der Mittelwerte von F_{Pool} wurde für Huhn, Schaf und Ziege zusätzlich noch der doppelt so große Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

Spezies	Bahn 1			Bahn 2			Bahn 3			MW (F_{Pool})	SD (F_{Pool})
	Bahn	Signal (counts)	F_{Pool}	Bahn	Signal (counts)	F_{Pool}	Bahn	Signal (counts)	F_{Pool}		
Huhn	1	3239	3.0	7	2485	4.4	13	528	2.3	6.4	1.1
Schaf	2	2758	2.6	8	2100	3.8	14	580	2.5	6.0	0.7
Ziege	3	3185	3.0	9	2019	3.6	15	607	2.7	6.2	0.5
Pute	4	2090	2.0	10	1263	2.3	16	439	1.9	2.1	0.2
Schwein	5	1069	1	11	5594	1	17	228	1	1	0
Rind	6	1850	1.7	12	909	1.6	18	476	2.1	1.8	0.3

Eine absolute Quantifizierung der PCR-Produkt-Pools war für deren weitere Anwendung nicht zwingend notwendig. Dennoch wurde versucht, die Konzentrationen der PCR-Produkte durch Abgleich ihrer Signalintensitäten in der PAGE mit den Signalen eines ebenfalls im Gel

aufgetragenen Standards zu bestimmen. Als Standard wurde dazu ein PCR-Produkt mit Hilfe des Qiaquick™ PCR Purification Kits aufgereinigt und bei 260 nm quantifiziert. Standard und nicht-aufgereinigtes PCR-Produkt wurden dann jeweils in einer Verdünnungsreihe zusammen in einem Gel aufgetragen, so dass durch die Kalibration des Standard-Signals den Signalintensitäten des nicht-aufgereinigten Produktes eine Konzentration zugeordnet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Methode erwies sich jedoch als zu ungenau, so traten Fehler z.B. dadurch auf, dass bei der Aufreinigung des Standards die Primer-Dimer nicht vollständig entfernt werden konnten und dadurch die photometrische Bestimmung verfälscht wurde. Auch bei der Auswertung der PA-Gele mit Hilfe des Programms *Osiris* ergaben sich relativ große Ungenauigkeiten, so dass sich nach Analyse der PCR-Produkt-Pools von Schwein, Rind, Huhn und Pute letztlich nur für Schwein und Pute eine gute Übereinstimmung zu dem Ergebnis der relativen Quantifizierung ergab. Mit Konzentrationen von 12 ± 2 ng/μl für den Schwein-Pool und 24 ± 2 ng/μl für den Pute-Pool wurde der Faktor von 2.1 ± 0.2 hier im Rahmen des statistischen Fehlers erfüllt. Um die absoluten Konzentrationen auch der anderen PCR-Produkt-Pools zumindest größenordnungsmäßig abzuschätzen, können sie mit Hilfe der relativen Faktoren bestimmt werden. Die molare Konzentration dieser im weiteren Verlauf u.a. für die Charakterisierung der Realzeit-Hybridisierung im DNA-Sensorchip eingesetzten PCR-Produkte lag damit etwa im Bereich von 100 nM.

5.2.1.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Weil die mit Hilfe der universellen Primer cytb403 und cytb779 erhaltenen 377 bp großen Amplifikate in ausreichender Konzentration vorlagen, konnten sie direkt durch die Methode des *Cycle Sequencings* sequenziert werden, um dadurch die Funktionalität des PCR-Konzeptes zu überprüfen und eine unabhängige Identifizierung der Spezies in den eingesetzten Referenz-DNA-Proben zu ermöglichen. Für die PCR-Produkte von Rind (R-10), Schwein (R-11), Huhn (R-8) und Pute (R-9) wurde eine eindeutige Übereinstimmung zwischen den erhaltenen Sequenzierdaten und den in Datenbanken (*Entrez Nucleotide*, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zugänglichen Referenzsequenzen festgestellt (Tab. 10). Für die cytb-Gensequenzen der einzelnen Spezies standen dabei teilweise mehrere Datenbankeinträge zur Verfügung, die sich aufgrund von Polymorphismen geringfügig unterscheiden können, da sie anhand unterschiedlicher Organismen generiert worden sind. In einigen Fällen umfassten die Einträge auch nur einen Teilabschnitt des cytb-Gens, der aber dennoch zum Vergleich mit den Ergebnissen der Sequenzierung herangezogen werden konnte. So konnten für alle vier untersuchten Spezies Datenbankeinträge mit 100%iger Übereinstimmung zu den erhaltenen Sequenzierdaten gefunden werden.

Tab. 10 Übereinstimmung der Sequenzierdaten mit verschiedenen Datenbankeinträgen

Spezies	Accession-No.	Übereinstimmung		Anmerkungen
		%	ident. Nukleotide	
Rind	NC_001567	100	282 / 282	---
Huhn	NC_001323	99	293 / 294	T→C-Austausch an Position 60
	AB044987	100	294 / 294	---
Schwein	NC_000845	100	279 / 279	---
Pute	L08381	97	275 / 281	6 Fehlstellen im ersten Teil der Sequenzierung
	AF230182	100	260 / 260	Acc.-No. erfasst nur Positionen 1-609 des <i>cytb</i> -Gens: erster Teil der Sequenzierung
	AY157979	100	177 / 177	Acc.-No. erfasst nur Positionen 1-447 des <i>cytb</i> -Gens: erster Teil der Sequenzierung

Es zeigte sich, dass die Sequenzierung am 5'-Ende des *sense*-Stranges nicht eindeutig war, weil bei der Aufreinigung der PCR-Produkte die Primer-Dimer nicht vollständig abgetrennt worden waren. Dadurch wurden eindeutige Ergebnisse der Sequenzierung ausgehend vom 5'-Ende erst nach etwa 90 Nukleotiden (nt) erhalten (Abb. 51). Die Länge des sequenzierten Abschnittes schwankte zwischen 279 nt (Schwein) und 294 nt (Huhn).

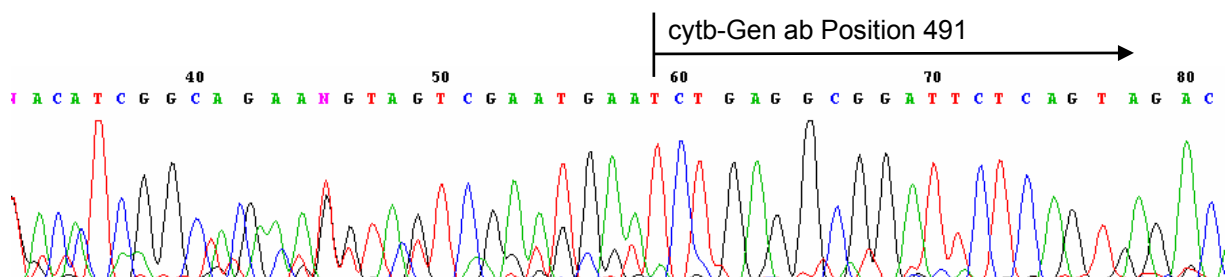


Abb. 51 Rohdaten der Sequenzierung des Rind-PCR-Produktes aus dem Bereich des Übergangs zwischen Primer-Dimer-Region und reinem PCR-Produkt

Die Skalierung der Abszisse ergibt sich aus den Rohdaten und bezieht sich auf die Anzahl der Nukleotide. Erst ab dem 59. Signal der Rohdaten ist die Sequenz eindeutig lesbar beginnend bei Position 491 des *cytb*-Gens der Spezies Rind. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, N: nicht eindeutig.

5.2.1.5 Vergleich der PCR-Effizienzen

Damit sich bei Anwendung des hier entwickelten Konsensus-PCR-Systems auf Realproben die Nachweisgrenzen für die verschiedenen Spezies nicht um mehrere Größenordnungen unterscheiden, wurde die Effizienz der PCR für die einzelnen Referenz-Materialien verglichen. Dazu wurden doppelte PCR-Ansätze mit je 10 ng *Template*-DNA angesetzt für die Proben der Spezies Huhn (R-1), Pute (R-3), Rind (R-4), Schaf (R-5), Schwein (R-6) und

Ziege (R-7) vom CVUA Münster sowie zwecks Vergleich von Material unterschiedlicher Herkunft für die genomische DNA von Rind (R-10) und Schwein (R-11) vom BgVV. Eine Analyse der PCR-Produkte durch PAGE erlaubte zunächst einen groben Vergleich der Reaktionsausbeuten in den verschiedenen PCR-Ansätzen (Daten nicht gezeigt), eine einfachere Quantifizierung der Ergebnisse ermöglichte aber die Analyse im ALF (Abb. 52), welche die Ergebnisse der PAGE grundsätzlich bestätigte. Die quantitative Bewertung der Effizienzunterschiede im ALF war dabei jedoch mit einem relativ großen Fehler behaftet, da zum einen bereits Abweichungen zwischen PCR-Ansätzen mit identischer Zusammensetzung auftraten und zum anderen der Vergleich der Fluoreszenzsignale einer relativ großen Anzahl von Proben auf parallelen Bahnen im ALF ungenau und von der abnehmenden Laserleistung überlagert war. Darüber hinaus waren die Konzentrationsangaben der extrahierten DNA-Proben fehlerbehaftet und auch die unterschiedliche Reinheit der DNA kann die Effizienzen zusätzlich beeinflusst haben. Die Ergebnisse zeigten aber zumindest tendenziell (Abb. 52), dass keine drastischen Unterschiede im PCR-Verhalten der verschiedenen Spezies und zwischen unterschiedlichen *Template*-DNA-Lösungen einer bestimmten Spezies bestanden. Die schwächste Effizienz besaß die PCR für Ziege, die damit – grob abgeschätzt – eine etwa neunfach schlechtere Amplifikation erreichte als die verhältnismäßig stärkste Pute-PCR. Ohne eine vorangegangene Optimierung der Primer lagen die Schwankungen zwischen den verglichenen PCR-Effizienzen damit dennoch in einem für ein Konsensus-PCR-System akzeptablen Rahmen, so dass die gewählten PCR-Bedingungen für einen parallelen Nachweis der Spezies eingesetzt werden konnten.

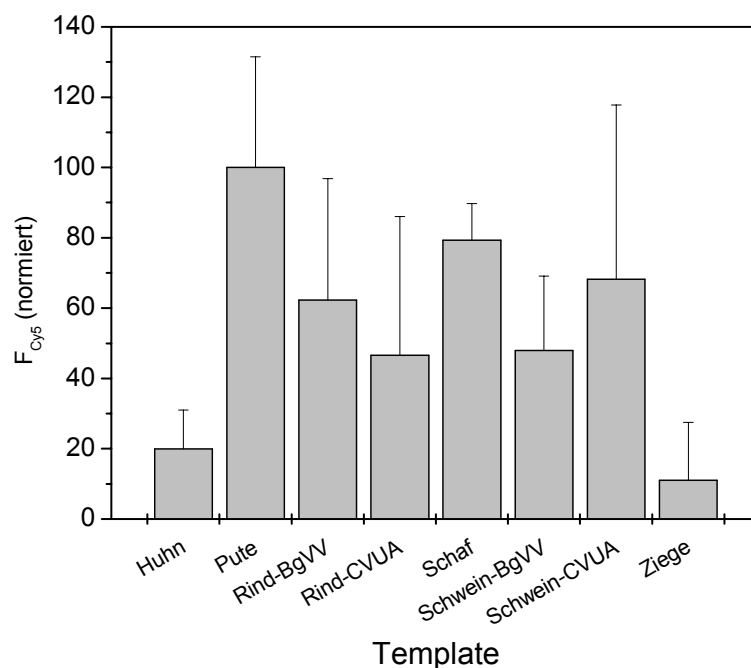


Abb. 52 Relativer Vergleich der PCR-Produkt-Ausbeuten für *Template*-DNA-Lösungen verschiedener Spezies und unterschiedlicher Herkunft

Zweifache Analyse der PCR-Produkte im ALF in jeweils doppelter Auftragung, Fluoreszenzsignale bei 377 bp normiert auf den Maximalwert und gemittelt über $n = 4$.

5.2.1.6 PCR von verschiedenen Mischungen zweier *Template*-DNAs

Um in der Phase der Charakterisierung der chipbasierten Methoden zur Tierartendifferenzierung auf PCR-Produkte von definierten *Template*-Mischungen zurückgreifen zu können und außerdem in einem ersten Schritt die Nachweisempfindlichkeit der PCR zu untersuchen, wurden in parallelen PCR-Ansätzen die *Templates* Rind (R-4) und Huhn (R-1) in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Während jeder Ansatz in der Summe 10 ng DNA enthielt, wurden die Anteile der beiden Spezies gegenläufig variiert mit 1 % als geringster Zumischung (Abb. 53). Die Analyse durch PAGE zeigte, dass in allen sieben Reaktionsansätzen 377bp-PCR-Produkte entstanden waren, wobei besonders in den Proben M-3, M-4 und M-5 mit nahezu ausgeglichenen Mischverhältnissen im Bereich von 377 bp eine enge Doppelbande zu erkennen war, weil das Rind- und das Huhn-PCR-Produkt im nicht-denaturierenden PA-Gel nicht exakt auf gleicher Höhe liefen. Bei Vergrößerung des Rind-*Template*-Anteils in den Proben M-1 und M-2 nahm dementsprechend die Intensität der unteren Bande zu, während in den Proben M-6 und M-7 mit Überschuss des Huhn-*Templates* nur noch die obere Bande zu erkennen war. Ob auch aus den 1%igen Zumischungen der *Template*-DNAs noch detektierbare PCR-Produkte entstanden waren, konnte erst durch die Anwendung der Hybridisierungsmethoden geklärt werden (vgl. 5.2.2.8 und 5.2.3.8).

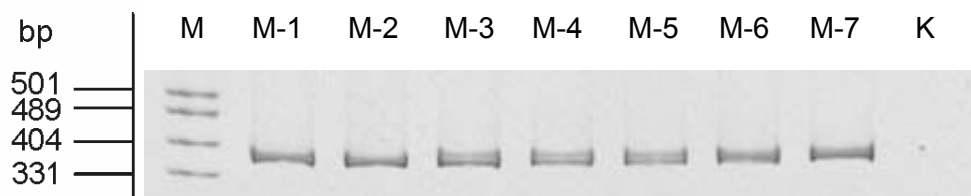


Abb. 53 Variation des Mischverhältnisses zweier DNA-*Templates* in der PCR

Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, M(ischung)-1: Rind(R):Huhn(H) = 100:0, M-2: R:H = 99:1, M-3: R:H = 75:25, M-4: R:H = 50:50, M-5: R:H = 25:75, M-6: R:H = 1:99, M-7: R:H = 0:100, K: Reagenzienkontrolle der PCR.

5.2.1.7 PCR der Validierungs- und Realproben

Mit den meisten der aus Realproben oder aus Proben zur Validierung stammenden *Template*-DNA-Lösungen wurden in den jeweils zweifach durchgeführten und anschließend gepoolten PCR-Ansätzen intensive Banden in der PAGE im Bereich von 377 bp erhalten. Solche Proben, in denen mit Hilfe der Referenzanalytik mehrere verschiedene Spezies nachgewiesen worden waren, wiesen üblicherweise eng beieinander liegende Mehrfachbanden auf (Abb. 54 A). Bei geringem Anteil einer Spezies war die korrespondierende Bande allerdings im PA-Gel nicht mehr zu erkennen (vgl. 5.2.1.6). Dies wurde bei Analyse der zu Validierungszwecken angesetzten Proben V-3 bis V-10 deutlich. Während sich bei 1%igen Zumischungen der Spezies Huhn bzw. Rind noch eine Aufweitung bzw. Aufspaltung der

Bande andeutete, traten bei den 0.1%igen Zumischungen nur noch die scharfen Banden der jeweiligen Hauptkomponente auf (Abb. 54 B).

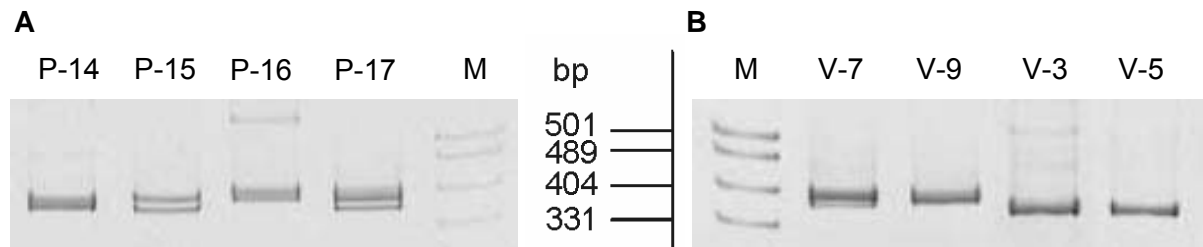


Abb. 54 PCR-Produkte von realen Mischproben (A) und Proben zur Validierung mit Zumischungen von 1.0 und 0.1 % (B)

Ethidiumbromid gefärbte PA-Gele, M: pUC19-Marker, **A**: P-14: 2 Spezies (S+H), P-15: 4 Spezies (R+S+H+P), P-16: 2 Spezies (S+P), P-17: 3 Spezies (R+S+P), Ergebnisse der Referenzanalytik; **B**: V-3: Rind + 1% Huhn, V-5: Rind + 0.1% Huhn, V-7: Schwein + 1% Rind, V-9: Schwein + 0.1% Rind.

Tendenziell eher schwächere Banden und in einzelnen PCR-Ansätzen sogar Reaktionsausfälle wurden mit *Template*-DNA-Lösungen aus Käseproben beobachtet, d.h. mit den Proben V-1 und V-2 auf Basis einer zertifizierten Ziegenfeta-Probe sowie den Realproben P-18 bis P-22 aus Schafs- bzw. Ziegenkäse. Nicht zufällig wiesen die meisten der entsprechenden DNA-Extrakte eine relativ geringe Gesamt-DNA-Konzentration auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in Milchprodukten grundsätzlich weniger DNA enthalten ist als in Fleischmaterial, so dass zwecks einer ausreichenden Zahl an Zellen die Extraktion aus größeren Probenmengen erfolgen muss [178]. Dabei ergibt sich zumeist eine komplexe Probenmatrix z.B. durch einen hohen Hintergrund an Proteinen oder Lipiden, die inhibierend bzw. störend auf die PCR wirken können. Um die PCR-Ausbeute zu verbessern, wurden zur Amplifikation der Proben V-1, V-2, P-21 und P-22 jeweils 2 μ l und damit die doppelte Menge *Template*-DNA eingesetzt. Von den auf Fleischproben basierenden DNA-Extrakten zeigte lediglich die Probe P-24 (Brühwurst B) eine sehr schwache PCR-Produkt-Bande, die allerdings durch die mit 7 ng/ μ l geringste DNA-Konzentration aller Probenextrakte verursacht wurde (Abb. 55).

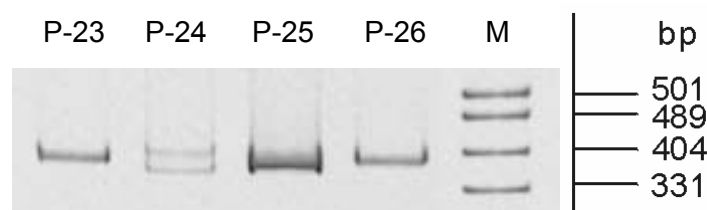


Abb. 55 Schwache PCR-Ausbeute für Mischprobe P-24 im Vergleich zu anderen Realproben

Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, P-23: 1 Spezies (S), P-24: 4 Spezies (R+S+H+P), P-25: 3 Spezies (R+S+P), P-26: 1 Spezies (S).

5.2.2 Tierartendifferenzierung durch konventionelle Chiphybridisierung

Im Rahmen der Entwicklung einer PCR-basierten Nachweismethode zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln durch Realzeit-Hybridisierungsanalyse als Anwendungsbeispiel für die Detektion im DNA-Sensorchip war es bis zu diesem Zeitpunkt gelungen, das Konsensus-PCR-System zur Amplifikation charakteristischer Teilsequenzen des *cytb*-Gens der verschiedenen Spezies zu etablieren und die PCR-Produkte molekularbiologisch zu charakterisieren. Bevor im weiteren Verlauf die PCR-Produkte in Realzeit im DNA-Sensorchip hybridisiert worden sind (vgl. 5.2.3), wurden sie zunächst durch konventionelle Hybridisierung auf DNA-Chips analysiert. Die konventionelle Chiphybridisierung wurde hier als Vergleichsmethode durchgeführt, weil sie für viele andere Fragestellungen den Stand der Technik im Bereich der Hybridisierungsanalyse darstellt. Die Tierartendifferenzierung auf DNA-Chips wurde zudem als Anwendungsbeispiel in der Literatur noch nicht beschrieben. Weiterhin bestand das Ziel bei der Anwendung der konventionellen Chiphybridisierung für die Analyse der PCR-Produkte auch darin, später durch einen Vergleich der Ergebnisse mit denen des DNA-Sensorchips die Vorteile der Realzeitmethode zu verdeutlichen.

Obwohl die konventionelle Chiphybridisierung der PCR-Produkte unter dem Deckgläschen nur eine Endpunktsbestimmung der Hybridisierung und nicht wie im DNA-Sensorchip eine kinetische Betrachtung der Bindungsreaktion erlaubt, ergaben sich in dieser Arbeit dennoch Parallelen zwischen beiden Methoden. So wurde für die Analyse der 377bp-PCR-Produkte zur Tierartendifferenzierung in beiden Fällen derselbe Satz tierartspezifischer Sonden immobilisiert (vgl. Anhang Tab. 23). Beim Design der SONDENSEQUENZEN boten sich aufgrund einer relativ großen interspezifischen Sequenzvariabilität die Bereiche ab Position 566 bzw. 684 des *cytb*-Gens für die Positionierung der Sonden an, wie ein Sequenzvergleich (*alignment*) des *cytb*-Gens für die verschiedenen Spezies verdeutlicht (vgl. Anhang Abb. 108). Letztlich wurde das Sonden-Set aus dem Bereich 684 als Grundlage der Detektion gewählt, da in dem Bereich 566 nur eine geringfügige Variabilität zwischen Schaf und Ziege mit lediglich zwei mismatches im Randbereich der SONDENSEQUENZEN auftrat. Abgesehen davon variierten die SONDENSEQUENZEN zwischen den verschiedenen Spezies aber sowohl im 566- als auch im 684-Bereich um mindestens fünf mismatch-Positionen und sollten somit eine deutliche Differenzierung der verschiedenen Spezies ermöglichen.

Weiterhin erwies sich auch bei der konventionellen Chiphybridisierung die Immobilisierung der Sonden auf blanken Glasobjektträgern von Sigma nach derselben Methode wie bei der Realzeit-Hybridisierung im DNA-Sensorchip als geeignet, so dass die in 5.1.1 optimierten Immobilisierungsparameter übernommen werden konnten. Entsprechend wurden auch bei der Hybridisierung unter dem Deckgläschen eine relativ homogene Spotform, nahezu keine unspezifische Hintergrundanbindung und eine hohe Positioniergenauigkeit des Dispensers beobachtet. Weil aber bei der Fluoreszenz-Detektion im GMS418-Mikroarrayscanner nach

der konventionellen Hybridisierung auf den DNA-Chips im Gegensatz zur Detektion im DNA-Sensorchip eine homogene Anregung über die gesamte Chipoberfläche möglich war, wurden die Sondenarrays auf den DNA-Chips grundsätzlich nach einem anderen Schema und mit einer höheren Redundanz der einzelnen Sondenspots ($n = 12$) als im DNA-Sensorchip immobilisiert (vgl. 4.6.1).

5.2.2.1 Spezifität der Sonden

Vor dem Hintergrund, die Nachweismethode zur Charakterisierung der *cytb*-PCR-Produkte durch konventionelle Hybridisierung unter dem Deckgläschen zu etablieren, wurden in einem ersten Schritt die PCR-Produkte aus den Referenzmaterialien der verschiedenen Spezies einzeln hybridisiert. Innerhalb des dabei eingesetzten Sondenarrays war neben den Sonden Huhn684, Rind684, Schwein684, Schwein566, Pute684, Rind684anti, Ziege684, Schaf684 und Schaf566 (vgl. Anhang Tab. 23) auch die Actin-45-0mm-Sonde immobilisiert worden, die wahlweise als Negativ- oder nach Zumischung des komplementären Targets als Hybridisierungskontrolle verwendet werden konnte (Abb. 56 B). Die bei Hybridisierung von Rind-PCR-Produkt erhaltenen Ergebnisse sind ausführlich in Abb. 56 dargestellt. Bei der Auswertung der innerhalb eines Arrays erhaltenen Signalintensitäten (Abb. 56 C) zeigte sich die intensive Anbindung an der Rind684-Sonde mit 9300 ± 2105 counts über $n = 3$ Spots. Sonden, an denen keine Anbindung stattgefunden hatte, wiesen dagegen grundsätzlich eine Signalstärke von < 100 counts auf. Geringfügig erhöhte Signale, die mit bloßem Auge im Fluoreszenzbild gar nicht zu erkennen waren, wurden für die Schwein566-Sonde (D) mit 123 ± 4 counts über $n = 3$ Spots erhalten, so dass eine sehr schwache Kreuzhybridisierung (1.3 %) des Rind-PCR-Produktes mit der S566-Sonde festgestellt werden konnte. Alle weiteren Messungen zeigten, dass für eine sinnvolle Interpretation der Messergebnisse die Einführung eines Schwellenwertes (*threshold*) von 300 counts notwendig war. Die Anbindung auf allen Sondenspots mit Signalstärken unterhalb des Schwellenwertes wurde dann als nicht signifikant bewertet.

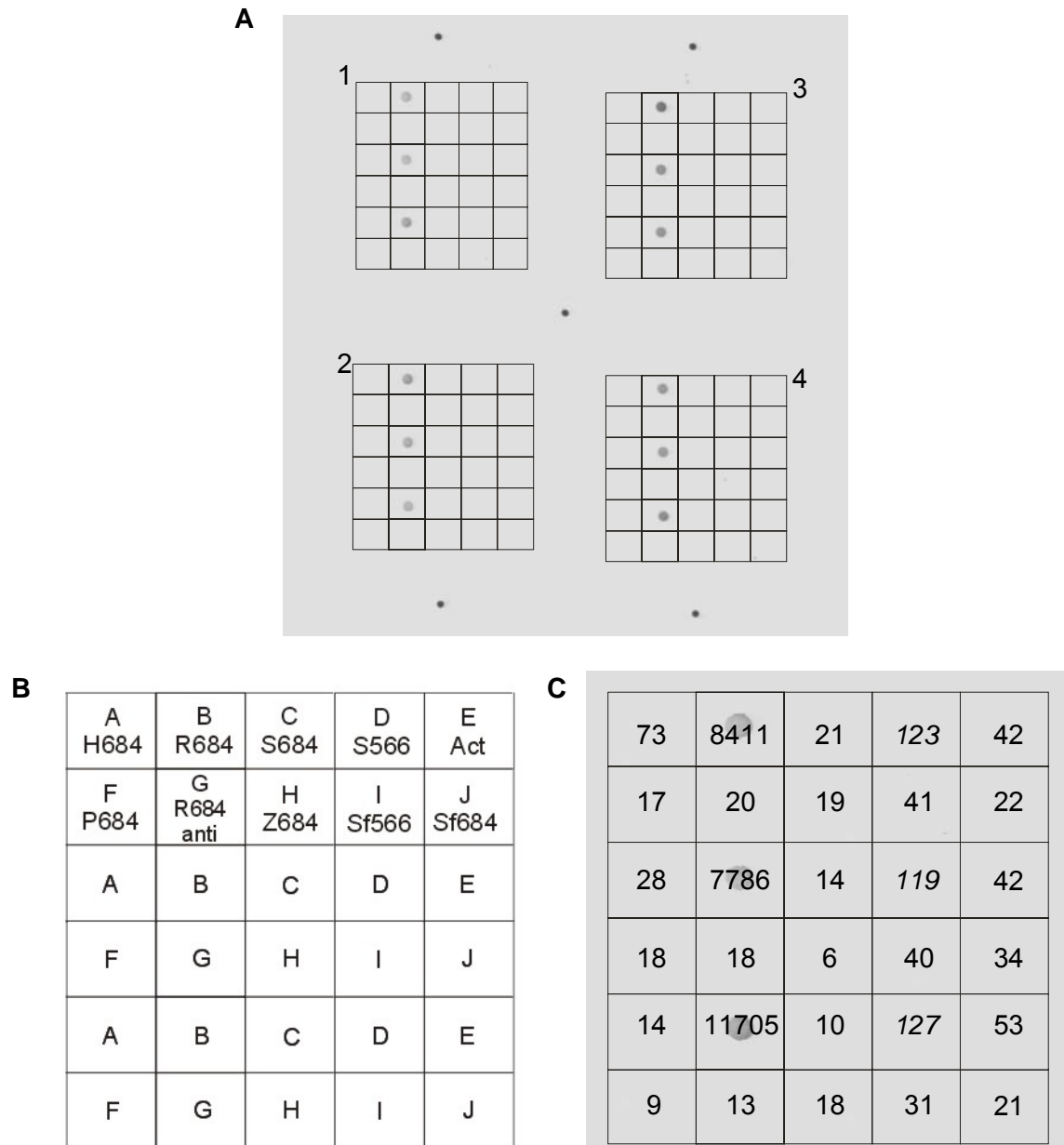


Abb. 56 Spezifität der Sonden zur Tierartendifferenzierung bei konventioneller Chiphybridisierung von Rind-PCR-Produkt

A: Fluoreszenzbild des Sonden-Meta-Arrays bestehend aus den Arrays 1-4 (vgl. 4.6.1) nach Hybridisierung mit Rind-PCR-Produkt und Auslesen am GMS418-Scanner (85 % *gain*). Die leicht versetzte Anordnung der Arrays ist auf eine Dejustierung der Scanneroptik zurückzuführen, die das Ergebnis aber nicht beeinflusst hat. **B:** Sondenbelegung eines Arrays, **C:** Hintergrundkorrigierte Signalintensitäten aller Sondenspots in Array 1 (kursive Werte: Kreuzhybridisierung).

Auch bei Hybridisierung der PCR-Produkte von Huhn, Schaf, Ziege, Schwein und Pute wurden an verschiedenen Sonden schwache Kreuzhybridisierungen beobachtet (Abb. 57), die jedoch in den meisten Fällen deutlich unter 3 % lagen und bei Anwendung des Schwellenwertes nicht erfasst wurden.

Starke Kreuzhybridisierung wurde lediglich in zwei Fällen beobachtet. Zum einen hat das Ziege-PCR-Produkt wie erwartet aufgrund der nur zwei mismatches (vgl. 5.2.2) mit nahezu

100%iger Kreuzhybridisierung an die Schaf566-Sonde ebenso gut wie an die Ziege684-Sonde gebunden (Abb. 57 D), und zum anderen zeigte das Schwein-PCR-Produkt eine starke unspezifische Wechselwirkung mit der Ziege684-Sonde, obwohl sich die Sequenzen von Schwein und Ziege im Bereich der Sondensequenz an neun Positionen unterscheiden. Gemessen an der maximalen Anbindung auf der Schwein566-Sonde lag die Kreuzhybridisierung hier bei 27 % (Abb. 57 E). Für die Detektion des Schwein-PCR-Produktes ergab sich außerdem ein relativ großer Unterschied zwischen den Signalstärken der Schweinsonden S566 und S684, der jedoch in direkter Korrelation steht zu den Eigenschaften der beiden Sonden (vgl. Anhang Tab. 23). Während die S566-Sonde mit 65 % den größten GC-Gehalt aller im Sondenarray immobilisierten Sonden aufweist, beträgt der GC-Gehalt der S684-Sondensequenz nur 35 %, weshalb die Signalstärke hier deutlich geringer war als an der S566-Sonde.

Der Nachweis der Spezies Schaf gelang dagegen mit vergleichbarer Signalstärke durch die Sonden Schaf684 und Schaf566 (Abb. 57 C), wobei die Sf566-Sonde allerdings in weiteren Versuchen zur konventionellen Chiphybridisierung aufgrund der Kreuzreaktivität mit Ziege und Schwein (Abb. 57 E) nicht mehr eingesetzt wurde.

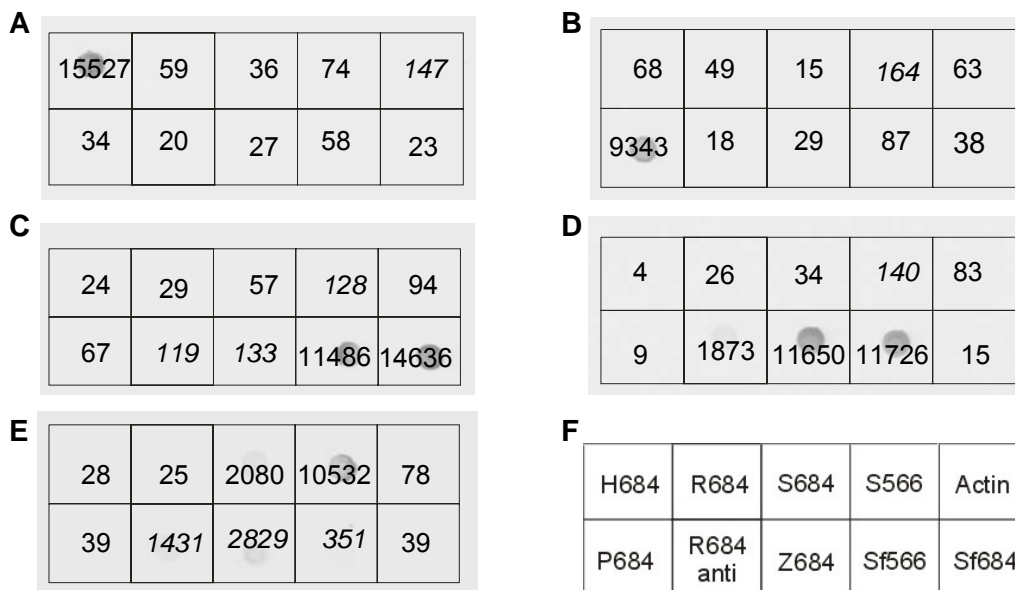


Abb. 57 Spezifität des Nachweises von Huhn-(A), Pute-(B), Schaf-(C), Ziege(D)- und Schwein-PCR-Produkt (E) bei konventioneller Chiphybridisierung

A-E: Fluoreszenzbilder der obersten beiden Reihen aus Array 1 (vgl. Abb. 56) mit den Signalstärken der Sondenspots an den jeweiligen Positionen des Rasters (kursive Werte: Kreuzhybridisierung, *gain*: 60-85 %), **F:** Sondenbelegung.

An der Sonde Rind684anti, die komplementär zu dem unmarkierten *sense*-Strang des PCR-Produktes ist, wurde ebenfalls in einzelnen Fällen eine mehr oder weniger starke Kreuzhybridisierung beobachtet. Da die Sonde speziell zur Detektion von Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkten konzipiert worden war, welche im Rahmen der konventionellen Chiphybridisierung

allerdings nicht eingesetzt worden sind, wurde sie auf den folgenden Arrays zur Hybridisierung unter dem Deckgläschen nicht mehr immobilisiert.

Auf Basis zahlreicher Hybridisierungen von PCR-Produkten einzelner Spezies unter Standardbedingungen konnte unabhängig vom eingesetzten *Template*-DNA-Material eine Matrix aller Wechselwirkungen mit den immobilisierten Fangsonden erstellt werden (Tab. 11). Es zeigte sich, dass die Actin-45-0mm-Sonde aufgrund geringer Kreuzhybridisierungen mit Rind und Schwein als Negativkontrolle ungeeignet war. Im Folgenden wurden das System aus Actin-Sonde und -Target daher als Hybridisierungs- und die NPT1-18-0mm-Sonde als Negativkontrolle eingesetzt.

Tab. 11 Auftretende Wechselwirkungen zwischen den PCR-Produkten der einzelnen Spezies und den immobilisierten Fangsonden bei der konventionellen Chiphybridisierung

pm: perfect-match, Angaben in %: Kreuzhybridisierung. Die beobachtete Kreuzhybridisierung lag in allen Fällen deutlich unterhalb des angegebenen Wertes. Unterstrichen sind bei mehreren zur Verfügung stehenden pm-Sonden jeweils die mit der maximalen Bindungsstärke, auf deren Signal sich die Kreuzhybridisierungen beziehen.

	Rind	Schwein	Huhn	Pute	Schaf	Ziege	Pferd	Mensch
R684	pm	---	---	---	---	---	---	---
S566	< 2 %	<u>pm</u>	---	< 3 %	< 2 %	< 3 %	< 3 %	< 3 %
H684	---	---	pm	---	---	---	---	---
P684	---	---	---	pm	---	---	---	---
Sf684	---	---	---	---	<u>pm</u>	---	---	---
Z684	---	~ 10-30 %	---	---	< 5 %	pm	---	---
S684	---	pm	---	---	---	---	---	---
Sf566	---	< 5 %	---	< 5 %	pm	100%	---	< 3 %
Actin	---	< 3 %	< 2 %	---	---	---	< 3 %	---
NPT	---	---	---	---	---	---	---	---

5.2.2.2 Variation der Hybridisierungsbedingungen

Mit dem Ziel, unter optimierten Hybridisierungsbedingungen die Kreuzhybridisierung von Schwein-PCR-Produkt mit der Ziege684-Sonde zu verringern oder sogar ganz zu unterdrücken, wurden sowohl die Inkubationstemperatur als auch der Formamidanteil im Hybridisierungspuffer variiert. Der Vergleich der Signalstärken nach Hybridisierung von Schwein-PCR-Produkt bei 37, 42 und 47°C zeigte, dass das Verhältnis zwischen der Anbindung an der Schwein566- und der Ziege684-Sonde nahezu konstant geblieben ist (Abb. 58). Zwar hat das Z684-Signal stetig abgenommen, allerdings lag die Signalintensität auch bei 47°C mit 548 counts noch deutlich oberhalb des Schwellenwertes und zeigte damit noch eine Kreuz-

hybridisierung zur S566-Sonde von 10 % gegenüber 14 % bei 37°C. An der S566-Sonde trat dementsprechend gegenüber den Standardbedingungen ein deutlicher Signalverlust von 68 % auf. Die Anbindung an der Schwein684-Sonde lag mit 242 counts bereits bei 42°C unterhalb des Schwellenwertes, was auf die im Verhältnis zu allen anderen Sonden sehr niedrige Schmelztemperatur von $T_m = 46^\circ\text{C}$ zurückzuführen ist. Im Unterschied zu der um 10°C höher schmelzenden Schwein566-Hybridisierungssequenz und auch zu der deutlich längeren Actin-Hybridisierungssequenz, deren Bindungsstärke durch die Temperaturerhöhung auf 47°C nicht abnahm, wurde für die Anbindung des Pute-PCR-Produktes an der P684-Sonde bereits bei 42°C ein Rückgang des Signals um 71 % beobachtet (Daten nicht gezeigt). Daher musste bei Hybridisierung oberhalb der Standardtemperatur von 37°C für die Detektion mit den 18mer-Tierartensonden grundsätzlich mit schlechteren Nachweisgrenzen gerechnet werden.

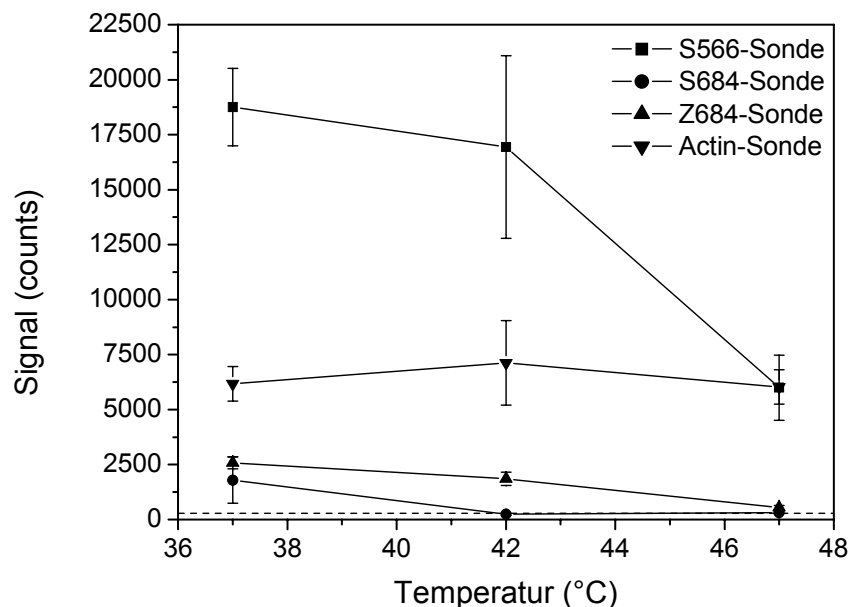


Abb. 58 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Signalintensitäten bei der konventionellen Chiphybridisierung von Schwein-PCR-Produkt

Hybridisierung einer Probenlösung aus Schwein-PCR-Produkt und 1 nM Actin-51-Cy5-Target als Hybridisierungskontrolle auf jeweils einem Meta-Array bei den drei verschiedenen Temperaturen. 60 % *gain*. MW über $n = 3$ Spots in Array 1. Gestrichelte Linie: Schwellenwert 300 counts.

Auch eine Erhöhung der Stringenz durch Variation des Formamidanteils im Hybridisierungspuffer von 37.5 % bei Standardbedingungen über 44 bis auf 50 % half nicht, die Kreuzhybridisierung von Schwein mit der Z684-Sonde einzuschränken. Beim Übergang von 37.5 zu 50 % Formamid verringerte sich die Anbindung an der Z684-Sonde lediglich um 25 % und lag immer noch deutlich über dem *Threshold*. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die schwachen Kreuzhybridisierungen von < 3 bzw. 5 % bei einer Stringenzerhöhung sowohl über die Temperatur als auch über den Formamidanteil kaum beeinflusst wurden, so dass

den entsprechenden Wechselwirkungen wahrscheinlich ein ganz anderer Hybridisierungsmechanismus zugrunde lag (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurden die Stringenzbedingungen bei der Hybridisierung von Schwein-PCR-Produkt bewusst verringert, um zu überprüfen, ob dadurch höhere Signalintensitäten besonders für die S684-Sonde bei einer ausreichenden Spezifität erreicht werden konnten. Bereits im ersten Schritt wurde durch parallele Erniedrigung sowohl der Inkubationstemperatur als auch des Formamidgehalts im Puffer ein deutlicher Signalanstieg an der S684-Sonde beobachtet (Abb. 59). Dieser war darauf zurückzuführen, dass durch die Verringerung des Formamidanteils der Schmelzpunkt T_m der Sondensequenz vergrößert wurde (vgl. 3.1.1.2, (Gl. 1)), so dass bei RT deutlich unterhalb des T_m -Wertes hybridisiert wurde und entsprechend eine starke Wechselwirkung beobachtet werden konnte. Unter Standardbedingungen (37°C, 37.5 % FA) lag dagegen der Schmelzpunkt der S684-Sonde aufgrund des geringen GC-Gehaltes im Bereich von 37°C, so dass nur eine sehr schwache Anbindung beobachtet wurde, während der T_m -Wert und entsprechend die Bindungsstärke für die S566-Sonde deutlich größer waren.

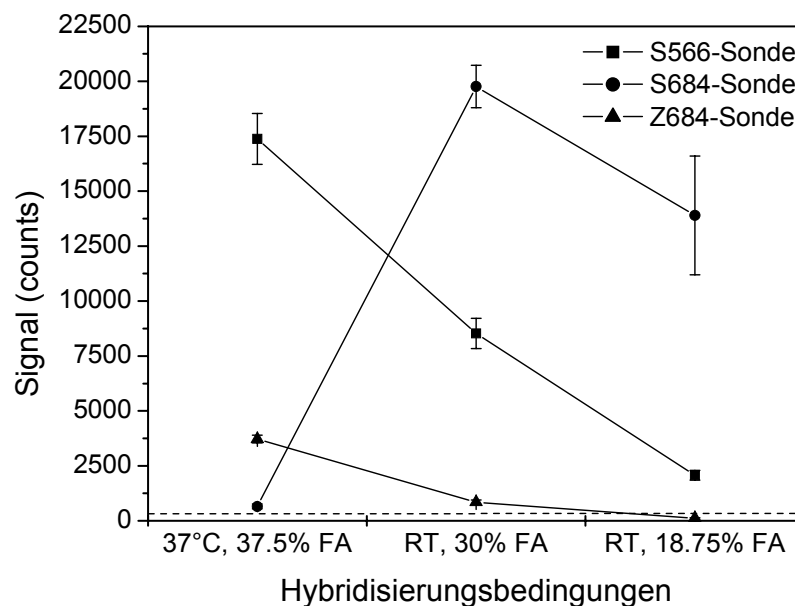


Abb. 59 Einfluss abnehmender Stringenz auf die Signalintensitäten bei der konventionellen Chiphybridisierung von Schwein-PCR-Produkt

Hybridisierung von Schwein-PCR-Produkt auf jeweils einem Meta-Array bei den drei verschiedenen Bedingungen. 65 % gain. MW über $n = 3$ Spots in Array 1. Gestrichelte Linie: Schwellenwert 300 counts.

Interessanterweise bewirkte bei RT eine weitere Verringerung des Formamidanteils sowohl für die S684- als auch für die S566-Sonde einen Rückgang des Signals, so dass das Formamid hier entsprechend bei zunehmender Konzentration einen aktivierenden Einfluss auf die Hybridisierung zeigte. Die unspezifische Wechselwirkung mit der Z684-Sonde wurde durch die Verringerung der Stringenz unerwartet schwächer und konnte schließlich vollstän-

dig unterdrückt werden. Sie verhielt sich damit eher untypisch und im Gegensatz zu anderen unspezifischen Anbindungen, welche bei einer entsprechenden Verringerung der Stringenz deutlich zunahm (vgl. 5.2.2.3), weshalb die weniger stringenten Bedingungen auch nicht für die Standardanwendung geeignet waren.

5.2.2.3 Test einer alternativen Sonde für Ziege

Mit der Absicht, einen spezifischen Nachweis von Ziege ohne Kreuzhybridisierung anderer Spezies zu ermöglichen, wurde anhand des Sequenzabgleichs für das *cytb*-Gen der verschiedenen Spezies (vgl. Anhang Abb. 108) die neue Sonde Ziege703 konzipiert. Die Suche nach einer neuen Zielsequenz innerhalb des 377 bp großen Bereiches der PCR-Produkte erwies sich dabei besonders durch die enge Verwandtschaft zwischen Schaf und Ziege, aber auch durch die Homologie der Sequenzen von Ziege und Rind als schwierig. Neben einer ausreichenden Anzahl von möglichst zentral gelegenen mismatch-Positionen gegenüber den Sequenzen anderer Spezies – wie in diesem Fall fünf im Verhältnis zur Schaf- und drei zur Rindsequenz – ist auch die Schmelztemperatur T_m für die Qualität einer Fangsonde wichtig. Deshalb wurde die Sonde Ziege703 im Gegensatz zu allen anderen Sonden um zwei Nukleotide verlängert, um den relativ geringen T_m -Wert auf 47°C zu erhöhen (vgl. Anhang Tab. 23). Bei konventioneller Chiphybridisierung mit den Cy5-markierten PCR-Produkten der einzelnen Spezies zeigte sich jedoch, dass zwar keine Kreuzhybridisierung mit der Sonde Z703 auftrat, gleichzeitig bei Standardbedingungen aber auch nur eine minimale Anbindung von Ziege-PCR-Produkt unterhalb des Schwellenwertes zu beobachten war (Abb. 60). Dieses Verhalten war auf den geringen GC-Gehalt der Z703-Sonde von nur 32 % zurückzuführen, was der starke Signalanstieg bei Verringerung der Stringenz bis auf RT und 18.75 % FA im Puffer zeigte. Allerdings sind diese wenig stringenten Bedingungen für eine Standardhybridisierung nicht geeignet, da auch die Kreuzhybridisierung von Ziege mit den Sonden Schwein566, Schwein684 deutlich sowie schwach mit Schaf684 und der NPT1-18-0mm-Negativkontrolle zunahm. Die Sonde Ziege703 erwies sich damit für die praktische Anwendung in diesem Array zur Tierartenbestimmung als ungeeignet.

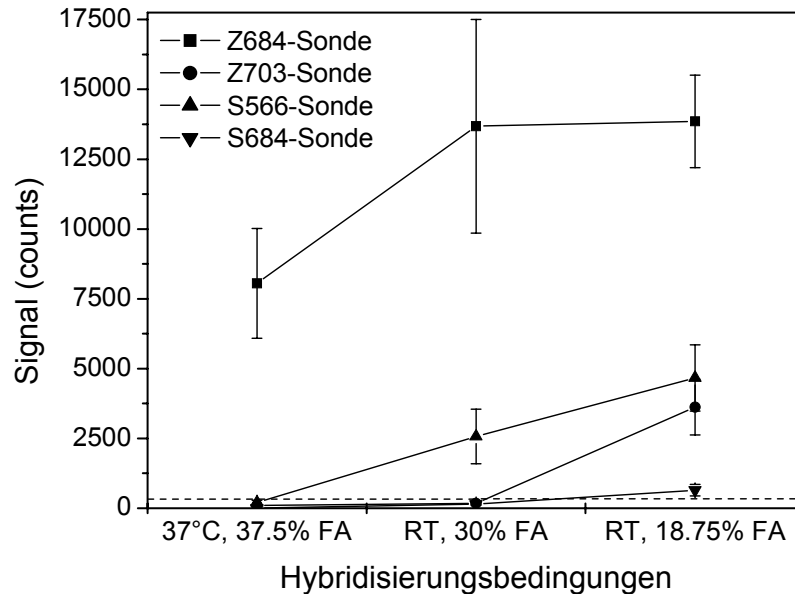


Abb. 60 Einfluss abnehmender Stringenz auf die Signalintensitäten bei der konventionellen Chiphybridisierung von Ziege-PCR-Produkt

Hybridisierung von Ziege-PCR-Produkt auf jeweils einem Meta-Array bei den drei verschiedenen Bedingungen. 65 % *gain*. MW über $n = 3$ Spots in Array 1. Gestrichelte Linie: Schwellenwert 300 counts.

5.2.2.4 Reproduzierbarkeit

Um die bei der konventionellen Chiphybridisierung auftretenden statistischen Schwankungen näher zu charakterisieren und die Reproduzierbarkeit der Hybridisierung zu untersuchen, wurde eine Probenlösung mit Schwein-PCR-Produkt und 0.5 nM Actin-51-Cy5-Target auf sechs Sonden-Meta-Arrays bei Standardbedingungen hybridisiert. Die Meta-Arrays befanden sich auf den vier verschiedenen Glasobjektträgern A, B, C und D, wobei auf A und B jeweils zwei Meta-Arrays immobilisiert worden waren. Nach Auswertung aller Spots der Sonden Schwein566 und Actin-45-0mm auf den sechs Meta-Arrays ergaben sich intra-Array-Variationskoeffizienten zwischen 14 und 70 %, die im Mittel bei 39 ± 18 % lagen (Abb. 61). Hierdurch wurden in erster Linie solche Abweichungen charakterisiert, die für das Signal einer SONDENSEQUENZ innerhalb eines Meta-Arrays z.B. durch die inhomogene Verteilung der Probenlösung unter dem Deckgläschen verursacht wurden.

Andererseits sollten aber auch die absoluten Ergebnisse auf den verschiedenen Meta-Arrays miteinander verglichen werden, zwischen denen sich Abweichungen z.B. dadurch ergaben, dass die Glasobjektträger nacheinander im Mikroarrayscanner ausgelesen wurden. Dazu wurden die Actin-Signale aller sechs Meta-Arrays jeweils paarweise für zwei Meta-Arrays auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Differenziert wurde dabei zwischen dem Intra-Objektträger-Vergleich von zwei Meta-Arrays desselben Objektträgers und dem Inter-Objektträger-Vergleich von zwei Meta-Arrays auf unterschiedlichen Objektträgern. Tab. 12

verdeutlicht, dass der Inter-Objektträger-Vergleich, bei dem sich nur 38 % der 13 verglichenen Ergebnisse als nicht signifikant unterschiedlich erwiesen haben, schlechter war als der jeweilige Vergleich der Ergebnisse innerhalb eines Objektträgers, die hier ohne signifikanten Unterschied geblieben sind. Für eine allgemeine Aussage fehlt allerdings eine noch größere Anzahl von Wertepaaren.

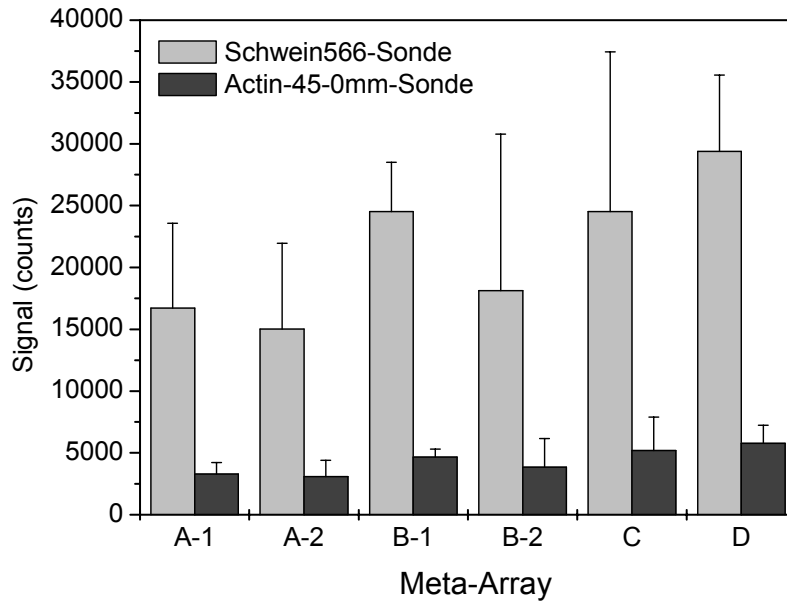


Abb. 61 Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten über n = 6 Meta-Arrays bei der konventionellen Chiphybridisierung

Hybridisierung einer Probenlösung mit Schwein-PCR-Produkt und 0.5 nM Actin-51-Cy5-Target. 65 % gain. MW über n = 12 Spots aller vier Arrays.

Tab. 12 Analyse der Reproduzierbarkeit bei konventioneller Chiphybridisierung durch Vergleich der Actin-Signale auf verschiedenen Meta-Arrays

Auswertung der Daten aus Abb. 61 mittels Students-T-Test (Software: *Origin*[®]), =: kein signifikanter Unterschied, ≠: signifikanter Unterschied, Wahrscheinlichkeit 95 %, hellgrau unterlegt: Intra-Objektträger-Vergleich, dunkelgrau unterlegt: Inter-Objektträger-Vergleich.

	A-1	A-2	B-1	B-2	C	D
A-1		=	≠	=	≠	≠
A-2	=		≠	=	≠	≠
B-1	≠	≠		=	=	≠
B-2	=	=	=		=	≠
C	≠	≠	=	=		=
D	≠	≠	≠	≠	=	

Die Ergebnisse zeigten, dass die statistischen Fehler bei der konventionellen Chiphybridisierung wie für die Methode typisch relativ groß waren. Die teilweise starken Abweichungen innerhalb eines Meta-Arrays konnten jedoch durch Bildung des Mittelwertes über alle $n = 12$ Spots verhältnismäßig gut ausgeglichen werden, wodurch sich grundsätzlich eine Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen verschiedener Meta-Arrays zumindest auf einem Glasobjektträger ergab (Abb. 61). Eine noch bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse von verschiedenen Meta-Arrays konnte aber erst durch eine Normierung der Fluoreszenzsignale erreicht werden. Das obige Experiment zeigte, dass die Signale des Actin-51-Cy5-Targets für eine Normierung der anderen Signale des jeweiligen Meta-Arrays geeignet waren, da bei einem paarweisen Vergleich der Meta-Arrays das Verhältnis zwischen den gemittelten Actin- und Schwein566-Signalen konstant blieb (Tab. 13).

Tab. 13 Verhältnis zwischen Actin- bzw. S566-Signalen beim Vergleich zweier Meta-Arrays

Auswertung der Daten aus Abb. 61, Wert 1 als Verhältnis der gemittelten Actin-Signale / Wert 2 als Verhältnis der gemittelten Schwein566-Signale auf den verglichenen Meta-Arrays.

	A-1	A-2	B-1	B-2	C	D
A-1	1 / 1	1.07 / 1.11	0.71 / 0.68	0.86 / 0.92	0.63 / 0.68	0.57 / 0.57
A-2	1.07 / 1.11	1 / 1	0.66 / 0.61	0.80 / 0.83	0.59 / 0.61	0.53 / 0.51
B-1	0.71 / 0.68	0.66 / 0.61	1 / 1	1.21 / 1.35	0.90 / 1.00	0.81 / 0.83
B-2	0.86 / 0.92	0.80 / 0.83	1.21 / 1.35	1 / 1	0.74 / 0.74	0.67 / 0.62
C	0.63 / 0.68	0.59 / 0.61	0.90 / 1.00	0.74 / 0.74	1 / 1	0.57 / 0.57
D	0.57 / 0.57	0.53 / 0.51	0.81 / 0.83	0.67 / 0.62	0.57 / 0.57	1 / 1

Wenn bei den folgenden Untersuchungen zur konventionellen Chiphybridisierung die Signale einer SONDENSEQUENZ auf unterschiedlichen Meta-Arrays relativ miteinander verglichen werden sollten, wurden deshalb zunächst auf jedem Meta-Array für alle SONDENSEQUENZEN die mittleren Signalintensitäten bestimmt, woraufhin dann auf Basis der gemittelten Actin-Signale für jeden Meta-Array bezogen auf den Meta-Array mit dem maximalen Actin-Signal ein relativer Faktor bestimmt wurde. Durch Anwendung der Faktoren auf alle gemittelten Signalintensitäten der Meta-Arrays wurden die Daten dann normiert.

5.2.2.5 Vergleich der Hybridisierungseffizienzen

Um ausschließen zu können, dass sich die Nachweisempfindlichkeiten für die verschiedenen Spezies bei der konventionellen Chiphybridisierung um Größenordnungen unterscheiden, wurden die Hybridisierungseffizienzen der cytb-PCR-Produkte mit den jeweils perfekt komplementären Sonden miteinander verglichen. Dazu wurden die relativ zueinander quanti-

fizierten PCR-Produkt-Pools (vgl. 5.2.1.3) durch Vorverdünnung auf die Konzentration des am schwächsten konzentrierten Schwein-PCR-Produktes eingestellt und separat in Probenlösungen mit 1.0 nM Actin-51-Cy5-Target hybridisiert. Abweichungen zwischen den Konzentrationen der abgeglichenen PCR-Produkt-Pools konnten durch mehrfache Analyse der Verdünnungen im ALFexpress™ Analysesystem im Rahmen der Methodengenauigkeit ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Auswertung der hybridisierten Sondenarrays zeigte ein Vergleich der auf Basis der Actin-Signale normierten Signalintensitäten für die verschiedenen Spezies, dass die Hybridisierungseffizienzen von Huhn, Pute, Rind und Ziege sehr ähnlich waren, während die Anbindung von Schwein- und Schaf-PCR-Produkt etwas stärker war (Abb. 62). Der größte Unterschied trat dabei zwischen der Hybridisierung von Rind und Schaf mit einem Faktor von 2.6 auf, wodurch andererseits aber gezeigt wurde, dass sich die Bindungsstärken an den verschiedenen Sonden nicht um Größenordnungen unterscheiden. Zudem dürfen die Signalunterschiede vor dem Hintergrund der Reproduzierbarkeit der konventionellen Chiphybridisierung unter dem Deckgläschen nicht überbewertet werden.

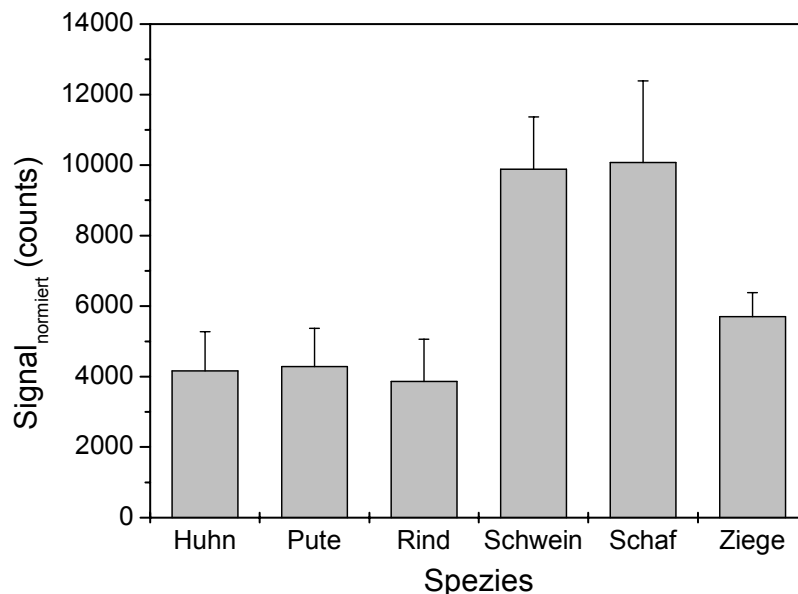


Abb. 62 Vergleich der Hybridisierungseffizienzen für die cytb-PCR-Produkte verschiedener Spezies bei der konventionellen Chiphybridisierung

Hybridisierung einer Probenlösung aus vorverdünntem PCR-Produkt-Pool und 1.0 nM Actin-51-Cy5-Target auf jeweils einem Meta-Array. Sonden: Huhn684, Pute684, Rind684, Schwein566, Schaf684 und Ziege684. 65 % *gain*. Normierung der Signale durch Verhältnisse der Actin-Intensitäten auf den sechs Meta-Arrays und Bezug auf das maximale Actin-Signal. MW über $n = 12$ Spots aller vier Arrays.

5.2.2.6 Variation der Inkubationszeit

Mit dem Ziel, den zeitlichen Ablauf der Hybridisierung unter dem Deckgläschen besser einschätzen zu können, wurde die Abhängigkeit der Signalintensität von der Inkubationszeit

untersucht (Abb. 63). Im Hinblick auf die relativ schlechte Reproduzierbarkeit wurden in drei unabhängigen Experimenten die Hybridisierungssignale bestimmt.

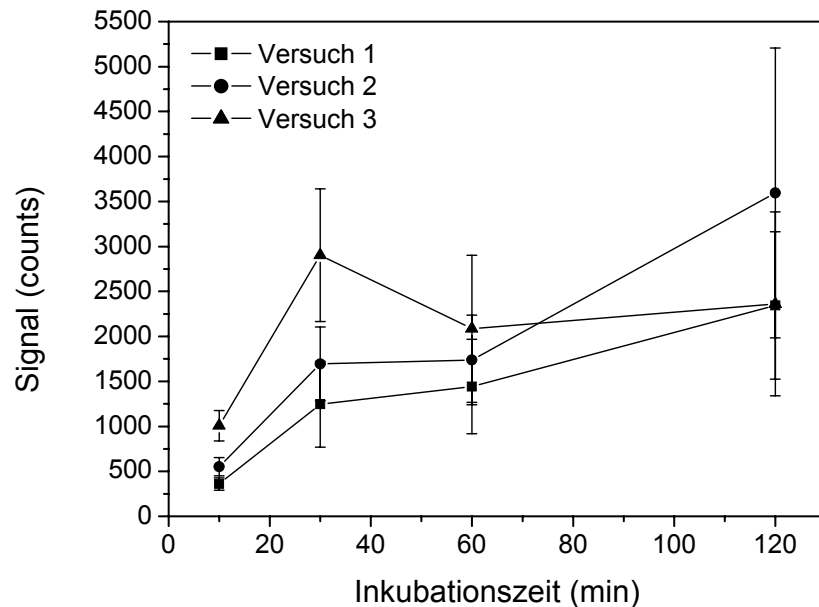


Abb. 63 Einfluss der Inkubationszeit auf die Signalintensitäten bei der konventionellen Chip-hybridisierung

Hybridisierung eines Meta-Arrays je Messpunkt, Sonde: Actin-45-0mm, Target: Actin-51-Cy5 0.7 nM, 65 % *gain*, MW über $n = 12$ Spots aller vier Arrays.

Es wurde festgestellt, dass die Anbindung nach 60-minütiger Inkubation noch nicht das Maximum erreicht hatte, sondern durch eine Verlängerung der Inkubationszeit eine weitere Zunahme der Signalintensität beobachtet werden konnte. Eine Verkürzung der Hybridisierungszeit auf 30 min bewirkte dagegen keinen Rückgang der Signalstärken, so dass einerseits zwecks Optimierung der Versuchsdauer die nach Standardprotokoll gewählte Inkubationszeit entsprechend verringert werden konnte und andererseits eine gewisse Flexibilität bei der Versuchsplanung gewährleistet war. Das Ergebnis zeigte jedoch auch, dass die Minimierung der Inkubationszeit nicht beliebig vorangetrieben werden konnte, da nach 10minütiger Hybridisierung nur 32 ± 3 % der Signalstärke bei halbstündiger Inkubation detektiert wurden.

5.2.2.7 Auswirkung des *Photobleaching*-Effektes

Ein bekanntes Problem bei Detektion der Fluoreszenzsignale auf hybridisierten Sondenarrays mit Mikroarraysclannern stellt das *Photobleaching* dar, d.h. die Ausbleichung der Fluorophore bei intensiver Anregung [179]. Dadurch wird häufig bei Wiederholung der Scans eine deutliche Abnahme der Signalintensitäten eines Arrays beobachtet. Um diesen Effekt auch für die Detektion mit dem GMS418-Scanner zu untersuchen, wurden einzelne Arrays bei unterschiedlichen Einstellungen der Laserleistung (LP) und der Signalverstärkung (*gain*)

nacheinander jeweils fünfmal vermessen. Es zeigte sich, dass der *Photobleaching*-Effekt unabhängig davon war, ob mit 70 oder 100 % LP gescannt wurde. Insgesamt wurden nur relativ geringe Signalverluste von 0 bis maximal 5 % zwischen den einzelnen Messungen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher standardmäßig mit einer LP von 100 % bei einer Anpassung der Signalverstärkung zur Vermeidung von Signalsättigung gescannt und nicht umgekehrt, um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten. Die Auswirkungen des *Photobleachings* spielten hier insgesamt jedoch nur eine geringe Rolle, da die Objektträger üblicherweise nur einmal gescannt werden mussten. Nur in den Fällen, wo die *gain*-Einstellung im ersten Scan zu hoch gewählt worden war, wurde die Messung wiederholt. Die sich daraus ergebenden Abweichungen waren aber verhältnismäßig klein gegenüber dem relativ großen Fehler bei der Ergebnisbestimmung auf verschiedenen Arrays.

5.2.2.8 Analyse verschiedener Mischungen zweier *Template*-DNAs

In 5.2.1.6 wurde die Herstellung der PCR-Produkte M-1 bis M-7 aus Mischungen der *Template*-DNA von Rind und Huhn in unterschiedlichen Verhältnissen beschrieben. Nachdem für die geringsten Zumischungen von jeweils 1 % in der PAGE keine Amplifikate mehr nachgewiesen werden konnten, sollte nun untersucht werden, ob bei der konventionellen Chiphybridisierung der PCR-Produkte beide Spezies nach einer entsprechenden Verdünnung der *Template*-DNA noch detektiert werden konnten. Die Fluoreszenzsignale zeigten, dass beide Spezies auch bei 1%iger Zumischung noch eindeutig nachgewiesen wurden (Abb. 64). Für beide Komponenten wurde bei zunehmendem Anteil der *Template*-DNA im PCR-Ansatz die Steigerung der PCR-Ausbeute und damit der Signalstärke deutlich. Die nahezu unveränderten Signale beim Übergang von Probe M-3 zu M-4 sowie die Verhältnisse der Signalstärken beider Spezies bei vergleichbaren Probenzusammensetzungen sollten im Hinblick auf die Methodenungenauigkeit nicht überinterpretiert werden.

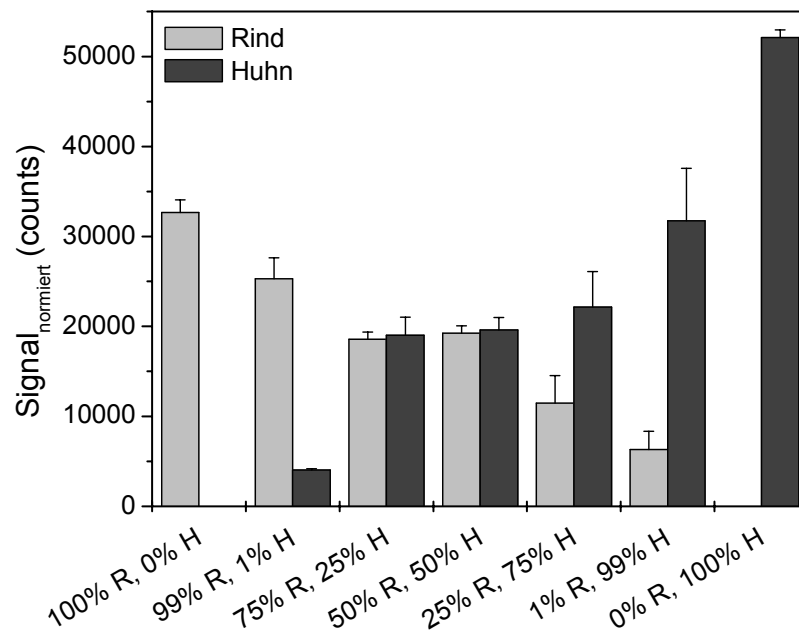


Abb. 64 Analyse der PCR-Produkte aus *Template*-Mischungen zweier Spezies in unterschiedlichen Verhältnissen durch konventionelle Chiphybridisierung

Hybridisierung einer Probenlösung aus PCR-Produkt und 0.5 nM Actin-51-Cy5-Target jeweils auf einem Meta-Array. Zusammensetzung der *Template*-Mischung bei den sieben hybridisierten PCR-Produkten M-1 bis M-7 auf der x-Achse. 65 % gain. Normierung der Signale durch Verhältnisse der Actin-Intensitäten auf den sieben Meta-Arrays und Bezug auf das maximale Actin-Signal. MW über n = 3 Spots in Array 1.

5.2.2.9 Analyse der zur Validierung hergestellten Mischproben

Um im Rahmen der Validierung die Nachweisgrenzen der Methode zur Tierartendifferenzierung mittels konventioneller Chiphybridisierung im Hinblick auf praktische Fragestellungen abschätzen zu können, wurden nicht nur Proben aus Mischungen auf Basis der *Template*-DNA-Menge untersucht (vgl. 5.2.2.8), sondern auch solche, bei denen bereits das Rohmaterial vor der DNA-Extraktion in definierten Mengen gemischt worden war (vgl. Tab. 3). Die damit erhaltenen PCR-Produkte wurden – wenn nicht anders vermerkt – jeweils auf einem Meta-Array unter dem Deckgläschen hybridisiert.

Die Analyse der Fleischproben umfasste den Nachweis 1 und 0.1%iger Zumischungen von Hühner- in Rindfleisch bzw. von Rind- in Schweinefleisch. Für den Nachweis geringer Mengen Hühnerfleisch in einer Probenmatrix aus Rindfleisch wurde demonstriert, dass auch 0.1%ige Zumischungen noch detektiert werden können (Abb. 65 B+C). Allerdings gelang der Nachweis hier nur für Probe V-5 als einem der beiden analysierten DNA-Extrakte einer Rindfleischprobe mit einem Anteil von 0.1 % Huhn, mit Probe V-6 wurde auch bei wiederholter Hybridisierung für die Huhn684-Sonde nur ein leicht erhöhtes Signal unterhalb des Schwellenwertes von 300 counts beobachtet. Diese unterschiedlichen Signalstärken der Proben V-5 und V-6, die sich auch auf die Intensitäten der anderen Signale beziehen, sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die DNA-Konzentration der Probe V-6 etwas

geringer war als die der Probe V-5. Bei der Bestimmung schwacher Rindbeimischungen in Schweinefleisch konnte dagegen in beiden Proben V-9 und V-10, deren DNA-Konzentrationen fast gleich groß waren, ein 0.1%iger Rind-Anteil nachgewiesen werden, wobei das normierte Rind684-Signal für V-10 mit 1057 counts in demselben Bereich lag wie bei Probe V-9 (Abb. 65 E). Die Ergebnisse zeigten, dass zumindest für die Detektion geringer Anteile von Hühnerfleisch bei 0.1 % der Bereich der Nachweisgrenze erreicht wurde, während für Rind wahrscheinlich auch noch etwas schwächere Zumischungen nachgewiesen werden könnten. Die Nachweisgrenzen beider Spezies liegen aber dennoch in einem ähnlichen Bereich.

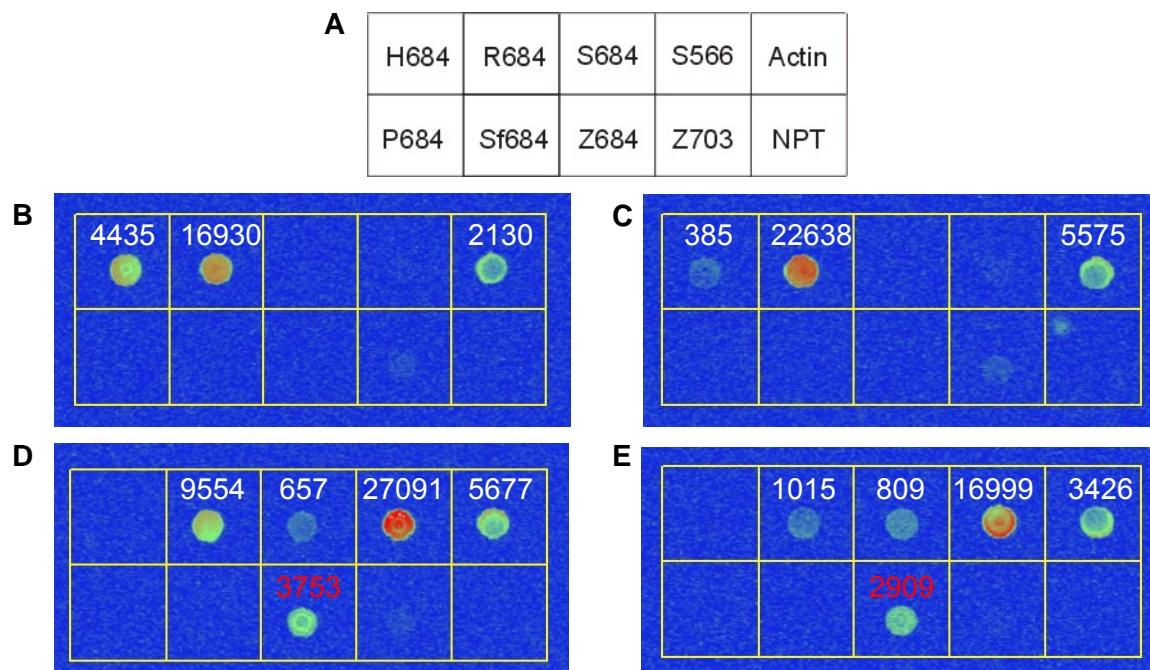


Abb. 65 Nachweis geringer Probenbestandteile im Bereich von 1 und 0.1 % in Mischproben zweier Spezies durch konventionelle Chiphybridisierung

Hybridisierung einer Probenlösung aus PCR-Produkt und 0.5 nM Actin-51-Cy5-Target. Fluoreszenzbilder der obersten beiden Reihen aus Array 1 in Falschfarben. **A:** Sondenbelegung, **B:** Probe V-3 (Rind + 1 % Huhn), **C:** Probe V-5 (Rind + 0.1 % Huhn), **D:** Probe V-7 (Schwein + 1 % Rind), **E:** Probe V-9 (Schwein + 0.1 % Rind). 75 % gain. MW über $n = 3$ Spots, SD und Werte < 300 counts nicht angegeben, Werte nicht normiert. Rot: bekannte Kreuzhybridisierung.

Für den Nachweis von Kuhmilch in Ziegenfeta ergab dagegen die Analyse der Probe V-2 eine etwas schlechtere Nachweisgrenze, da bei 5%iger Zumischung für die Rind684-Sonde mit 390 und 570 counts nach zweifacher Hybridisierung bereits nur noch Signale knapp oberhalb des Schwellenwertes erreicht wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache lässt sich darauf zurückführen, dass Milch- und Käseproben generell einen geringeren Gehalt an Gesamt-DNA aufweisen, wobei die DNA aufgrund der Probenprozessierung meist relativ stark degradiert vorliegt [106,129]. Entsprechend zeigten hier die PCR-Produkte bereits in der PAGE eine relativ schlechte PCR-Ausbeute (vgl. 5.2.1.7).

Bei Analyse aller Mischproben aus Tab. 3 wurden grundsätzlich für die Hauptbestandteile deutlich größere Signale erhalten als für die Nebenbestandteile (Abb. 65), so dass die konventionelle Chiphybridisierung zumindest eine semi-quantitative Aussage erlaubt. Bei Auswertung der detektierten Fluoreszenzsignale wurden je nach Probenzusammensetzung die bereits in Tab. 11 beschriebenen Kreuzhybridisierungen beobachtet. Die Ergebnisse für die Analyse aller zu Validierungszwecken vom CVUA Münster zur Verfügung gestellten Proben sind in Tab. 14 zusammengefasst. Weil in nahezu allen Mischproben auch die nur in geringem Anteil von bis zu 0.1 % enthaltenen Spezies durch die konventionelle Chiphybridisierung nachgewiesen werden konnten, hatte sich die Methode für die Bearbeitung praxisrelevanter Fragestellungen als geeignet erwiesen und sollte im weiteren Verlauf zur Analyse von Realproben eingesetzt werden.

Tab. 14 Analyse der Proben zur Validierung durch konventionelle Chiphybridisierung

A: Referenzanalytik des CVUA Münster, B: konventionelle Chiphybridisierung, n.n.: nicht nachgewiesen (vgl. 4.2.2), +: im Nachweis positiv.

Probennummer	Bezeichnung	Methode	R	S	H	P	Sf	Z
V-1	Ziegenfeta	A:						+
		B:						+
V-2	Ziegenfeta (zertifiz.) + 5 % Kuhmilch	A:	n.n.					+
		B:	+					+
V-3	Rind + 1 % Huhn	A:	+		+			
		B:	+		+			
V-4	Rind + 1 % Huhn	A:	+		+			
		B:	+		+			
V-5	Rind + 0.1 % Huhn	A:	+		+			
		B:	+		+			
V-6	Rind + 0.1 % Huhn	A:	+		+			
		B:	+		-			
V-7	Schwein + 1 % Rind	A:	+	+				
		B:	+	+				
V-8	Schwein + 1 % Rind	A:	+	+				
		B:	+	+				
V-9	Schwein + 0.1 % Rind	A:	+	+				
		B:	+	+				
V-10	Schwein + 0.1 % Rind	A:	+	+				
		B:	+	+				

5.2.2.10 Analyse der Realproben

Abschließend wurden die PCR-Produkte verschiedener Realproben, deren DNA-Extrakte am CVUA Münster durch Referenzmethoden untersucht worden waren, durch konventionelle Chiphybridisierung analysiert (vgl. Tab. 4). Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Proben

jeweils auf einem Meta-Array unter dem Deckgläschen hybridisiert. Das Actin-51-Cy5-Target wurde zwar auch hier als Hybridisierungskontrolle zugesetzt, für die Auswertung wurden hier aber ausschließlich die nicht-normierten Werte betrachtet, da alle Proben unabhängig voneinander bewertet wurden. Auch unter Berücksichtigung der möglichen Kreuzhybridisierungen (vgl. Tab. 11) konnten die Proben P-1 bis P-10 sowie P-23 und P-26, die jeweils nur eine Spezies enthielten, alle eindeutig identifiziert werden (Tab. 15). Die sehr schwachen Kreuzhybridisierungen von < 2-5 % lagen hier wie bei allen anderen untersuchten Proben üblicherweise unterhalb des Schwellenwertes von 300 counts. Bei Analyse der aus mehreren Spezies zusammengesetzten Fleischproben P-11 bis P-17 sowie P-23 bis P-26 zeigten nahezu alle Ergebnisse eine Übereinstimmung zur Referenzanalytik (Abb. 66).

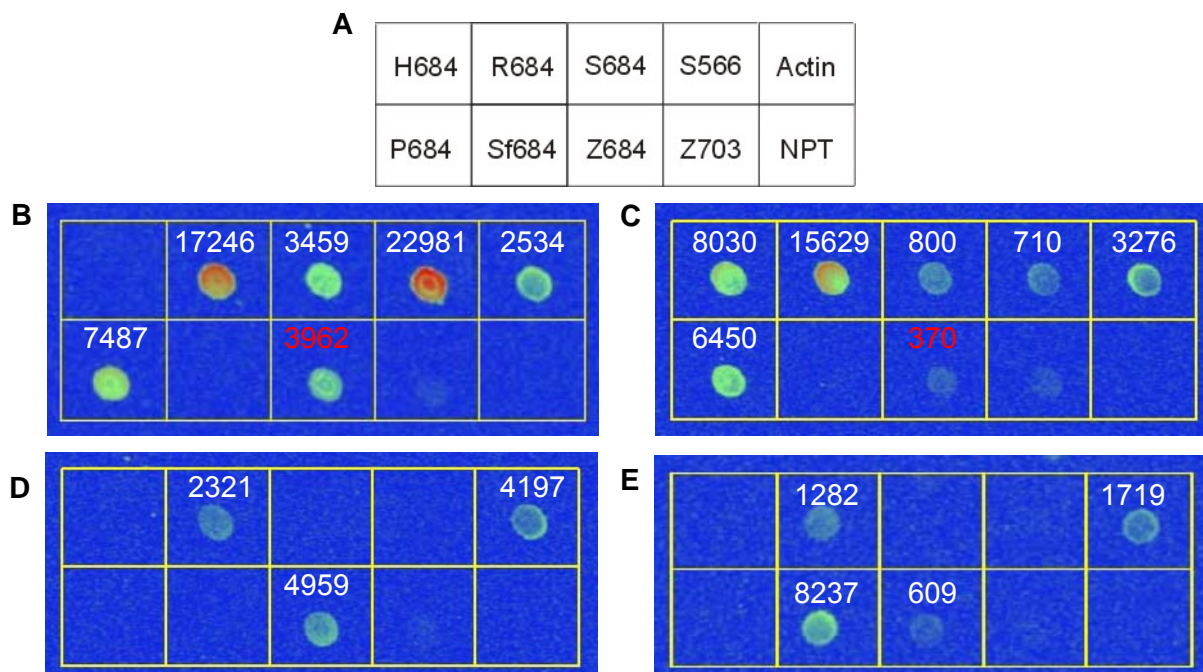


Abb. 66 Analyse verschiedener Realproben mit gemischter Zusammensetzung durch konventionelle Chiphybridisierung

Hybridisierung einer Probenlösung aus PCR-Produkt und 0.5 nM Actin-51-Cy5-Target. Fluoreszenzbilder der obersten beiden Reihen aus Array 1 in Falschfarben. **A:** Sondenbelegung, **B:** Probe P-17 (R+S+P), **C:** Probe P-24 (R+S+P+H), **D:** Probe P-20 (R+Z), **E:** Probe P-22 (R+Sf+Z). 65 bzw. 75 % gain. MW über n = 3 Spots, SD und Werte < 300 counts nicht angegeben, Werte nicht normiert. Rot: bekannte Kreuzhybridisierung.

Auch Proben, in denen drei oder sogar vier Spezies enthalten waren, konnten eindeutig charakterisiert werden (Abb. 66 B+C). Bei der Analyse der Putenbratwurst P-17 (Abb. 66 B) wurde z.B. neben einem intensiven Signal für die P684-Sonde auch eine starke Anbindung an der R684-Sonde beobachtet. Weiterhin wurde durch Anwesenheit der Spezies Schwein in der Probe wie erwartet eine Anbindung an den Sonden S566 und S684 von sehr unterschiedlicher Intensität neben einem deutlichen Signal an der Z684-Sonde durch Kreuzhybridisierung detektiert, während das Signal für die Actin-Sonde die positive Hybri-

disierungskontrolle anzeigte. Dementsprechend waren in der analysierten Probe Pute, Rind und Schwein enthalten. In der Brühwurst B (P-24) konnte durch ein intensives Signal an der H684-Sonde als weitere Spezies zusätzlich noch Huhn nachgewiesen werden (Abb. 66 C). Dabei war lediglich für die beiden Proben P-24 und P-25 aus dem BgVV-Ringversuch auch die genaue Probenzusammensetzung bekannt. Während für Probe P-25 aufgrund der Hybridisierungssignale Schweinefleisch als Hauptbestandteil mit ca. 83 % des Einwaagegewichtes neben Puten- (4 %) und Kalbsfleisch (1.4 %) als geringen Nebenbestandteilen bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), war das Schwein-Signal bei Analyse der Probe P-24 unerwartet niedrig (Abb. 66 C). Obwohl die Probe Schwein- ebenso wie Rindfleisch zu einem Anteil von 33 % enthielt neben Puten- und Hühnerfleisch zu je 17 %, lag das Schwein566-Signal mit 710 counts deutlich unter den Signalen der übrigen Spezies. Eventuell war die Amplifikation der *cytb*-Sequenzen aus Schwein durch die Anwesenheit der übrigen Spezies gestört worden, allerdings hatte sich die Amplifikation dieser Probe ohnehin aufgrund der geringen DNA-Konzentration als kompliziert erwiesen (vgl. 5.2.1.7).

Die einzige Ausnahme bei Analyse der Fleischproben bildete die Fleischwurst P-15, in der Pute neben Rind, Schwein und Huhn auch nach wiederholter Durchführung von PCR und Hybridisierung nicht nachgewiesen werden konnte. In einem Fall wurde dabei für die Pute684-Sonde zwar ein erhöhtes Signal von 263 counts detektiert, welches nicht auf Kreuzhybridisierung zurückgeführt werden konnte, allerdings konnte das Signal nicht als eindeutiger Nachweis gewertet werden, da der *Threshold* nicht erreicht wurde. Diese Tatsache spricht dafür, dass Pute in dieser Probe nur in einer sehr geringen Konzentration knapp unterhalb der Nachweisgrenze bei der konventionellen Chiphybridisierung enthalten war, die mit der sehr sensitiven tierartspezifischen PCR im Rahmen der Referenzanalytik noch nachgewiesen werden konnte.

Auch bei Analyse der fünf Käseproben P-18 bis P-22 ergab sich insgesamt eine relativ gute Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Referenzanalytik. In der als Schafskäse deklarierten Probe P-19 konnte lediglich Kuhmilch nachgewiesen werden, während in dem Ziegenkäse P-20 neben Ziege auch Rind identifiziert wurde (Abb. 66 D). Als kompliziert erwies sich dagegen der Nachweis der Spezies Ziege in dem Schafskäse, aus dem die DNA-Extrakte P-21 und P-22 stammten und für den in dieser Hinsicht auch die Referenzanalytik kein eindeutiges Ergebnis geliefert hatte. Da bei der konventionellen Chiphybridisierung das Schaf-PCR-Produkt eine schwache Kreuzhybridisierung mit der Ziege684-Sonde von deutlich unter 5 % zeigt, konnte nur nach Analyse von Probe P-22 Ziege als Bestandteil signifikant festgestellt werden aufgrund eines Ziege684-Signals von 609 counts, was in diesem Fall 7 % des Schaf684-Signals entsprach (Abb. 66 E). Für Probe P-21 konnte dagegen die Kreuzhybridisierung von Schaf-PCR-Produkt als einzige Ursache für das Z684-

Signal von 802 counts entsprechend einem Anteil am Sf684-Signal von nur 3 % nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zur Referenzanalytik wurde bei Analyse des Schafskäses P-18 auch nach wiederholter Durchführung von PCR und Hybridisierung Ziege nicht eindeutig, dagegen aber Schaf nachgewiesen. Das sehr schwache Signal an der Ziege684-Sonde zeigte bezogen auf das Schaf684-Signal einen Anteil von 3 bzw. 6 % und es konnte somit nicht ausgeschlossen werden, dass es lediglich auf Kreuzhybridisierung durch Schaf-PCR-Produkt zurückzuführen war. Die Ursache für diesen offensichtlichen Widerspruch zwischen den Ergebnissen der konventionellen Chiphybridisierung und der Referenzanalytik konnte bisher noch nicht geklärt werden. Um in dieser Fragestellung zusätzliche Daten sammeln zu können und Ansätze zur Klärung des Problems zu finden, hätte am CVUA Münster die DNA aus dem Probenmaterial erneut extrahiert und mit Hilfe der Referenzmethoden untersucht werden müssen.

Die Kreuzhybridisierung von Schwein-PCR-Produkt mit der Ziege684-Sonde erwies sich bei der Analyse der Realproben als unproblematisch, da nach den Ergebnissen der Referenzanalytik keine der Proben Bestandteile beider Spezies enthielt. Der zusammenfassende Vergleich der Ergebnisse bei der konventionellen Chiphybridisierung der *cytb*-PCR-Produkte aller Realproben mit den Ergebnissen der Referenzanalytik in Tab. 15 verdeutlicht die insgesamt sehr gute Übereinstimmung.

Tab. 15 Analyse der Realproben-PCR-Produkte durch konventionelle Chiphybridisierung

A: Referenzanalytik des CVUA Münster, B: konventionelle Chiphybridisierung, +: im Nachweis positiv, -: im Nachweis negativ, ?: keine eindeutige Aussage möglich. Felder ohne explizites Ergebnis: Spezies im ELISA negativ oder nicht getestet (A, vgl. 4.2.2) bzw. Spezies in Analyse negativ (B).

Probennummer	Bezeichnung	Methode	R	S	H	P	Sf	Z	Übereinstimmung?
P-1	Hähnchen-Döner	A:			+	-			ja
		B:			+	-			
P-2	Hähnchen-Döner	A:			+	-			ja
		B:			+	-			
P-3	Hähnchen-Döner	A:			+	-			ja
		B:			+	-			
P-4	Döner-Kebap	A:			+	-			ja
		B:			+	-			
P-5	Putenmedaillons	A:			-	+			ja
		B:			-	+			
P-6	Mettwurst	A:		+					ja
		B:		+					
P-7	Fleischwurst	A:		+					ja
		B:		+					
P-8	Rostbratwurst	A:		+					ja
		B:		+					
P-9	Würstchen	A:		+					ja
		B:		+					
P-10	Döner Kebap	A:	+						ja
		B:	+						
P-11	Lambratwurst	A:	+				+		ja
		B:	+				+		
P-12	Truthahnbrust gefüllt	A:			-	+			ja
		B:			-	+			
P-13	Thüringer Mett vom Schwein	A:	+	+	-	-			ja
		B:	+	+	-	-			
P-14	Hot Dog	A:	-	+	+	-			ja
		B:	-	+	+	-			
P-15	Fleischwurst	A:	+	+	+	+			nein
		B:	+	+	+	-			
P-16	Rostbratwurst	A:	-	+	-	+			ja
		B:	-	+	-	+			
P-17	Putenbratwurst	A:	+	+	-	+			ja
		B:	+	+	-	+			
P-18	Schafskäse	A:	+				-	+	nein
		B:	+				+	+	
P-19	Schafskäse	A:	+				-	-	ja
		B:	+				-	-	
P-20	Picodon (Ziegenkäse)	A:	+				-	+	ja
		B:	+				-	+	
P-21	Schafskäse (Extrakt a)	A:	+				+	+	ja
		B:	+				+	+	
P-22	Schafskäse (Extrakt b)	A:	+				+	+	B eindeutig
		B:	+				+	+	
P-23	Brühwurst A	A:		+					ja
		B:		+					
P-24	Brühwurst B	A:	+	+	+	+			ja
		B:	+	+	+	+			
P-25	Leberwurst A	A:	+	+	-	+			ja
		B:	+	+	-	+			
P-26	Leberwurst B	A:		+					ja
		B:		+					

5.2.3 Tierartendifferenzierung durch Realzeit-Hybridisierung

Mit dem Ziel, eine PCR-basierte Nachweismethode zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln durch Realzeit-Hybridisierungsanalyse zu entwickeln, waren bis zu diesem Punkt zunächst das Konsensus-PCR-System etabliert und die speziesspezifischen cytb-PCR-Produkte durch konventionelle Hybridisierung auf DNA-Chips als ausgewählter Vergleichsmethode analysiert worden. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse beschrieben, die sich bei der Hybridisierung der PCR-Produkte im DNA-Sensorchip und der Charakterisierung des Nachweises in Realzeit hinsichtlich verschiedener Aspekte ergaben.

5.2.3.1 Spezifität der Sonden

Im ersten Schritt wurden die cytb-PCR-Produkte aus den Referenzmaterialien der verschiedenen Spezies einzeln hybridisiert. Dabei wurde die Wechselwirkung mit allen zur Verfügung stehenden Sonden zur Tierartendifferenzierung (vgl. Anhang Tab. 23) sowie mit den Sonden NPT1-18-0mm und Actin-45-0mm, die als Negativ- oder Hybridisierungskontrollen verwendet werden sollten, untersucht. Die sehr gute Spezifität bei der Hybridisierung von Rind-PCR-Produkt (vgl. Abb. 44) wurde bereits im Rahmen der grundlagenorientierten Untersuchungen im DNA-Sensorchip in Abschnitt 5.1.5.3 demonstriert. Analog war auch der Nachweis der Spezies Huhn, Pute und Schaf mit den perfekt komplementären 20mer-Sonden sehr spezifisch möglich und es traten keine Kreuzhybridisierungen auf, ebenso wie bei Hybridisierung der PCR-Produkte von Mensch und Pferd. Lediglich bei Hybridisierung der PCR-Produkte von Schwein und Ziege wurden auch Anbindungen an nicht perfekt komplementären Fangsonden beobachtet. Abb. 67 B zeigt dazu das Steigungsbild einer Messung mit reinem Schwein-PCR-Produkt, die entsprechenden Messdaten finden sich in Tab. 16. Wie auch bei der konventionellen Chiphybridisierung (vgl. 5.2.2.1) war die Anbindung an der Schwein566-Sonde aufgrund der unterschiedlichen Sondereigenschaften deutlich stärker als an der Schwein684-Sonde. Das S684-Signal lag üblicherweise nur bei 1-10 % des S566-Signals. Analog wurde auch hier die Kreuzhybridisierung des Schwein-PCR-Produktes mit der Ziege684-Sonde beobachtet, welche im Mittel im Verhältnis zum S566-Signal stabil bei 6-8 % lag.

Sowohl bei der Hybridisierung von Schwein- als auch von Ziege-PCR-Produkt wurde zusätzlich eine unspezifische Anbindung an der Rind684anti-Sonde beobachtet, die bei Schwein weniger als 5 % des S566-Signals und bei Ziege zwischen 10-20 % des Z684-Signals betrug. Da die Sonde aber lediglich zur Detektion von Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkten konzipiert worden war, konnte sie bei der Bestimmung von Cy5-Primer-markierten PCR-Produkten vernachlässigt werden und wurde nicht weiter als Negativsonde eingesetzt.

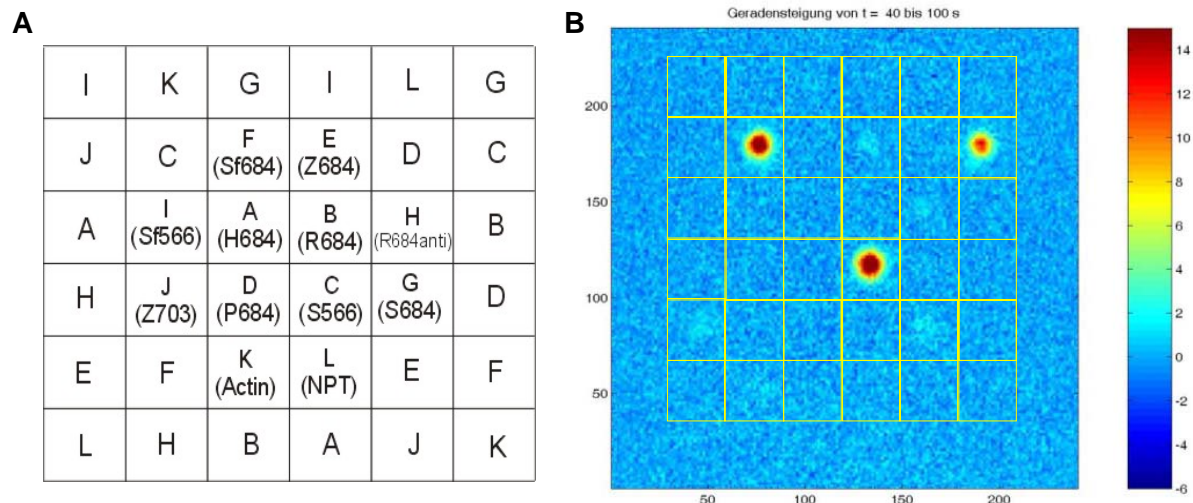


Abb. 67 Analyse von reinem Schwein-PCR-Produkt im DNA-Sensorchip

A: Belegung des Sondenarrays, **B:** Steigungsbild im Bereich 40-100 s für die Messung mit 10 µl PCR-Produkt (Konzentration wurde nicht bestimmt). Die Sondenspots mit sehr schwacher Anbindung sind bei der gewählten Falschfarbendarstellung nur sehr schwach zu erkennen und treten erst bei der Quantifizierung der Signalanstiege hervor (Tab. 16).

Tab. 16 Signalsteigungen auf den verschiedenen Sondenspots bei Hybridisierung von Schwein-PCR-Produkt (Abb. 67)

MW-Auswertung über $n = 3$ Spots in einer Messung, keine Ausleuchtungskorrektur, kursiv: < Schwellenwert von 0.2 counts/s, unterstrichen: Kreuzhybridisierung

Sonde	MW (counts/s)	SD (counts/s)	Sonde	MW (counts/s)	SD (counts/s)
Schwein566	7.97	1.96	Schaf684	0	0.03
Schwein684	0.24	0.07	Schaf566	0	0.09
Rind684	-0.02	0.03	Ziege684	<u>0.62</u>	0.11
Rind684anti	<u>0.24</u>	0.14	Ziege703	0.03	0.09
Huhn684	-0.11	0.07	Actin	-0.04	0.03
Pute684	-0.10	0.19	NPT1	-0.10	0.10

Bei der Detektion von Ziege-PCR-Produkt kam es außerdem wie bei der Hybridisierung unter dem Deckgläschen zu einer starken Anbindung an die nah verwandte Sequenz der Schaf566-Sonde mit nur zwei mismatches im Randbereich. Weil im Gegensatz zur konventionellen Chip-Hybridisierung aber keine zusätzliche Kreuzhybridisierung von Schwein-PCR-Produkt mit der Schaf566-Sonde auftrat, wurde diese für den Nachweis von Schaf und Ziege weiterhin im Sensorchip immobilisiert. An der Ziege703-Sonde, die ursprünglich als Alternative zur Ziege684-Sonde im Hinblick auf die Kreuzhybridisierung durch Schwein-PCR-Produkt entwickelt worden war, konnte bei Standardbedingungen wegen ihres niedrigen GC-Gehaltes keine Anbindung des Ziege-PCR-Produktes festgestellt werden (vgl. 5.2.2.3).

Die Messungen zur Realzeit-Hybridisierung der PCR-Produkte zeigten, dass für eine eindeutige Interpretation der Messergebnisse die Einführung eines Schwellenwertes von 0.2 counts/s sinnvoll war. Dieser wurde auf Basis der zweifachen Standardabweichung von Signalsteigungen mit geringer Intensität abgeleitet, so lag die mittlere Standardabweichung der niedrigen Signale in Tab. 16 z.B. bei 0.9 counts/s. Weil die gemittelten Signalsteigungen auf Sondenspots ohne Targetanbindung meist sogar im negativen Bereich lagen, wurde die Anbindung an allen Sondenspots mit Signalstärken oberhalb des Schwellenwertes als signifikant bewertet.

5.2.3.2 Vergleich der Hybridisierungseffizienzen

Mit dem Ziel, die Unterschiede zwischen den Nachweismöglichkeiten für die verschiedenen Spezies bei der Realzeit-Hybridisierung abschätzen zu können, wurden wie bei der konventionellen Chiphybridisierung (vgl. 5.2.2.5) die Hybridisierungseffizienzen der cytb-PCR-Produkte mit den jeweils perfekt komplementären Sonden miteinander verglichen.

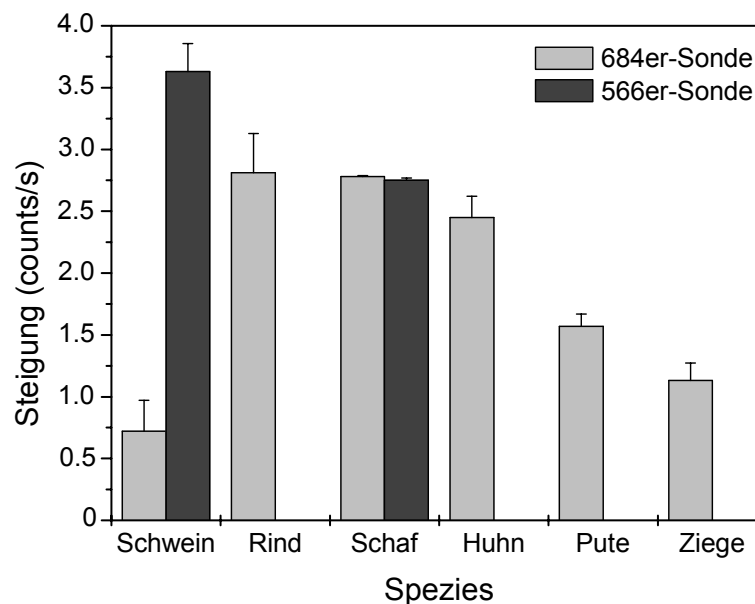


Abb. 68 Vergleich der Hybridisierungseffizienzen für die cytb-PCR-Produkte verschiedener Spezies auf den perfekt komplementären Sonden bei Realzeit-Hybridisierung

Hybridisierung von je 7 μ l der hinsichtlich ihrer Konzentrationen abgeglichenen PCR-Produkt-Pools pro Messung. Keine Ausleuchtungskorrektur, jeweils MW-Auswertung eines Sondenspots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über $n = 3$ Messungen.

Abb. 68 verdeutlicht noch einmal die Optimierung des Nachweises von Schwein durch Einsatz der Schwein566-Sonde (vgl. 5.2.3.1), so dass auf die Immobilisierung der Sonde Schwein684 verzichtet werden kann. Bei der Detektion des Schaf-PCR-Produktes wurden für die Sonden Schaf684 und Schaf566 trotz unterschiedlicher GC-Gehalte der Sondensequenzen (50 bzw. 60 %) vergleichbare Signalstärken erhalten. Bei der weiteren Bewertung

der Messergebnisse muss berücksichtigt werden, dass zum einen die Sondenspots nicht genau gleich ausgeleuchtet waren und dass die Daten zum anderen nicht nur mit dem statistischen Messfehler (Fehlerbalken in Abb. 68) behaftet sind. Abweichungen ergaben sich auch aufgrund des ungenauen Konzentrationsabgleichs der vermessenen PCR-Produktlösungen, weil die relative Quantifizierung der PCR-Produkt-Pools im ALFexpressTM Analysesystem nur eine Näherung darstellte (5.2.1.3). Dennoch kann man folgern, dass die Hybridisierungseffizienzen der verschiedenen Sonden nicht um Größenordnungen variierten. Beim Vergleich der Signalintensitäten auf den optimalen Sonden aller sechs Spezies wurde deutlich, dass die Hybridisierungseffizienzen für Huhn, Schaf und Rind ähnlich waren, während das Schwein-PCR-Produkt etwas besser hybridisierte und sowohl Pute- als auch Ziege-PCR-Produkt etwas schlechter angebunden haben. Die größte Abweichung trat dabei zwischen Ziege und Schwein auf, die sich in ihrer Hybridisierungseffizienz etwa um den Faktor 3 unterschieden.

5.2.3.3 Linearität der Kalibration

Um zu demonstrieren, dass auch bei der Realzeit-Hybridisierung von PCR-Produkten ein linearer Zusammenhang zwischen der Signalsteigung und der Konzentration an DNA-Target in der Messlösung besteht, wurden für die PCR-Produkte einzelner Spezies in separaten Messungen Verdünnungsreihen aufgenommen (Abb. 69).

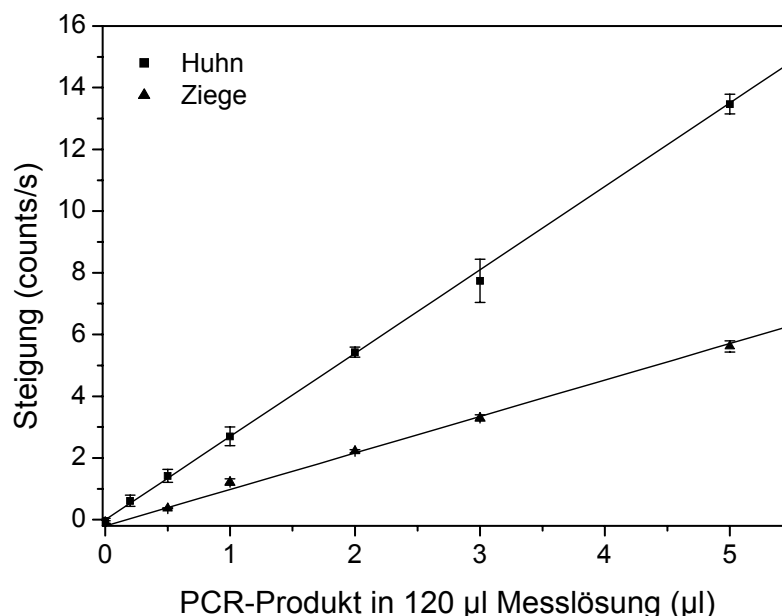


Abb. 69 Verdünnungsreihen für Huhn- und Ziege-PCR-Produkt-Pool im DNA-Sensorchip

Die Verdünnungsreihen wurden in getrennten Messungen aufgenommen. Pro Messung wurde das auf der x-Achse angegebene Volumen PCR-Produkt auf 120 µl Messlösung verdünnt. Keine Ausleuchtungskorrektur, jeweils MW-Auswertung der Sondenspots Huhn684 bzw. Ziege684 im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über $n = 3$ (Huhn) bzw. $n = 2$ (Ziege) Messungen.

Dabei wurde für die Detektion unterschiedlicher Volumina der PCR-Produkt-Pools von Huhn und Ziege jeweils ein linearer Bereich über mindestens eine Dekade bei Sensitivitäten von 2.70 ± 0.05 counts/(s* μ l) für Huhn und 1.18 ± 0.02 counts/(s* μ l) für Ziege erhalten. Da die Konzentrationen beider PCR-Produkt-Pools fast identisch waren (vgl. Tab. 9), spiegelt der Faktor von 2.3 zwischen den Sensitivitäten direkt das Verhältnis der Hybridisierungseffizienzen beider PCR-Produkte wider (vgl. 5.2.3.2). Die Nachweisgrenzen lagen bei 0.08 μ l für den Huhn-Pool und 0.34 μ l für den Ziege-Pool. Auch mit jeweils 5 μ l PCR-Produkt und entsprechend hohen Messwerten wurden noch streng lineare Signalanstiege beobachtet.

Parallel wurden unterschiedliche Volumina beider PCR-Produkt-Pools im PA-Gel aufgetragen (Abb. 70 A). Eine Auftragung der Signalsteigungen im Sensorchip gegen die hintergrundkorrigierte Bandenintensität in der PAGE bei gleichem PCR-Produkt-Volumen demonstriert die Korrelation zwischen den Signalen beider Nachweismethoden und zeigt auch, dass die volumenbezogenen Nachweisgrenzen für die PCR-Produkte in der PAGE etwa in dem gleichen Bereich lagen wie im DNA-Biosensor (Abb. 70 B).

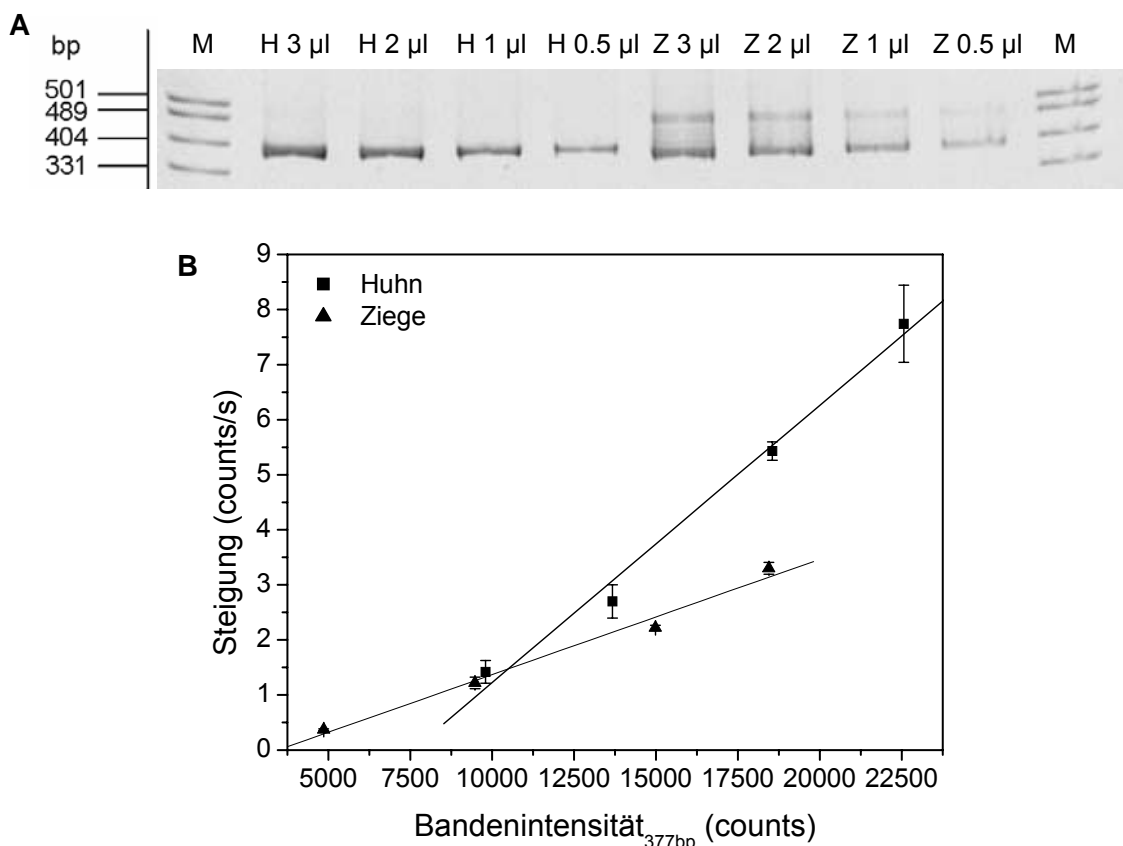


Abb. 70 Auftragung unterschiedlicher Volumina der PCR-Produkt-Pools von Huhn und Ziege im PA-Gel (A) und Korrelation der Bandenintensitäten mit den Hybridisierungssignalen im DNA-Biosensor (B)

A: Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, H: Huhn-PCR-Produkt-Pool, Z: Ziege-PCR-Produkt-Pool, **B:** Auftragung der Signalsteigungen (vgl. Abb. 69) gegen die hintergrundkorrigierten Bandenintensitäten für die Pool-PCR-Produkt-Volumina von 0.5, 1, 2 und 3 μ l. Die Bestimmung der Bandenintensitäten ist mit einem relativ großen statistischen Fehler behaftet, der aber nicht genauer abgeschätzt wurde.

Eine analoge Korrelation zwischen PAGE-Intensitäten und Sensorsignalen konnte auch für den Fall gezeigt werden, dass im Gel gleiche Volumina unterschiedlich konzentrierter PCR-Produkte aufgetragen und diese anschließend jeweils im Sensor hybridisiert wurden (Daten nicht gezeigt).

5.2.3.4 Hybridisierung von PCR-Produkt-Mischungen

Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der Realzeit-Hybridisierungsanalyse auf Mischproben in der Praxis ist die störungsfreie parallele Detektion der PCR-Produkte verschiedener Spezies. Diese wurde zunächst durch Hybridisierung von Mischungen zweier PCR-Produkte demonstriert. Dazu wurden bewusst solche PCR-Produkte ausgewählt, die bei gleichen Konzentrationen eine vergleichbare Hybridisierungseffizienz gezeigt hatten wie z.B. die PCR-Produkt-Pools von Huhn und Schaf (vgl. 5.2.1.3 und 5.2.3.2). In einem ersten Experiment wurden zunächst je 5 μ l beider Pools sowohl einzeln als auch in Mischung vermessen, wobei das Signal in Mischung für Schaf 100 % und für Huhn 88 % des Signals der Einzelmessung betrug (Abb. 71). Damit ließ sich eine grundsätzliche gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen PCR-Produkte bei paralleler Detektion ausschließen.

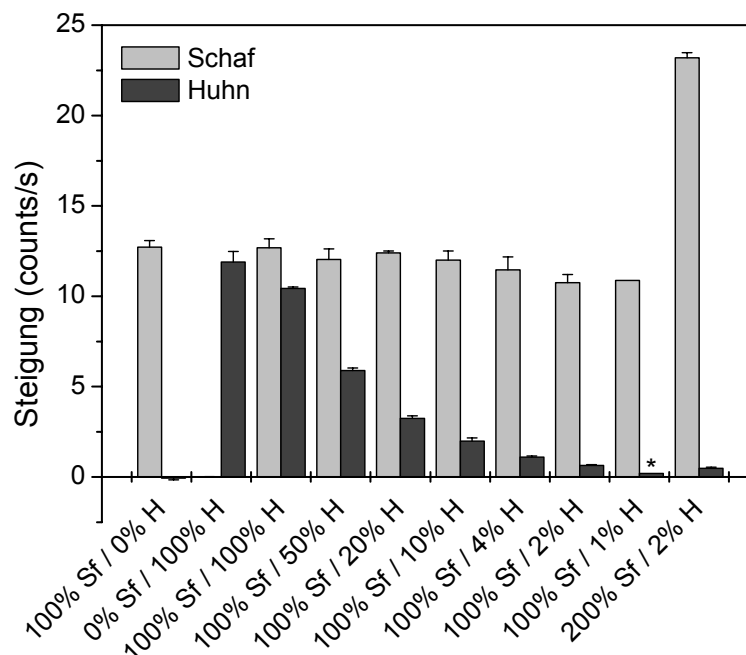


Abb. 71 Hybridisierung zweier PCR-Produkte einzeln und in Mischung bei unterschiedlicher Zusammensetzung im DNA-Sensorchip

Prozentuale Zusammensetzungen der Mischungen bezogen auf das eingesetzte Volumen der PCR-Produkt-Pools von Schaf (Sf) und Huhn (H) auf der x-Achse (100 % = 5 μ l). * = Steigung < 0.2 counts/s. Keine Ausleuchtungskorrektur, jeweils MW-Auswertung der Sondenspots Schaf684 bzw. Huhn684 im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über n = 3 Messungen.

Weiterhin wurden bei konstantem Anteil von 5 μl des Schaf-PCR-Produktes Mischungen vermessen, in denen die Zumischung des Huhn-PCR-Produktes schrittweise verringert wurde. Der Anteil der 0.2 N NaOH-Lösung beim Ansetzen der Messlösung betrug dabei für alle Messungen konstant 5 μl , um die Auswirkung einer pH-Wertänderung auf die Messergebnisse zu vermeiden. Ein Anteil von 2 % Huhn-Amplikon entsprechend einem PCR-Produkt-Volumen von 0.1 μl konnte hier noch detektiert werden, während der Messwert bei 1%iger Zumischung (0.05 μl) bereits unterhalb des Schwellenwertes lag. Der Nachweis von 1 % Huhn-PCR-Produkt vor einem Schaf-Hintergrund gelang jedoch nach Verdopplung des analysierten Volumens. Die bei Aufnahme einer Verdünnungsreihe für den separat vermessenen Huhn-PCR-Produkt-Pool erhaltene Nachweisgrenze konnte somit bei Messung in Mischung bestätigt werden (vgl. 5.2.3.3). Die leicht abnehmende Tendenz des Schaf-Signals bei konstantem Anteil von 5 μl lässt sich wahrscheinlich auf eine Alterung des Sensorchips zurückführen.

5.2.3.5 Verdünnung der *Template*-DNA

Um die Sensitivität der PCR und damit das Potential der Nachweismethode zur Detektion auch geringer Mengen *Template*-DNA zu demonstrieren, wurde die Pute-*Template*-DNA der Probe R-3 in verschiedenen Verdünnungen zur PCR eingesetzt. Die Analyse der PCR-Ansätze durch PAGE zeigte, dass auch mit einer 1:500-Verdünnung der *Template*-DNA entsprechend einer Konzentration von 55 pg DNA/ μl noch eine deutliche Bande bei 377 bp entstand (Abb. 72). Das Gel verdeutlicht zudem, dass die Primer-Dimer-Konzentration umso größer wurde, je geringer die *Template*-Konzentration war.

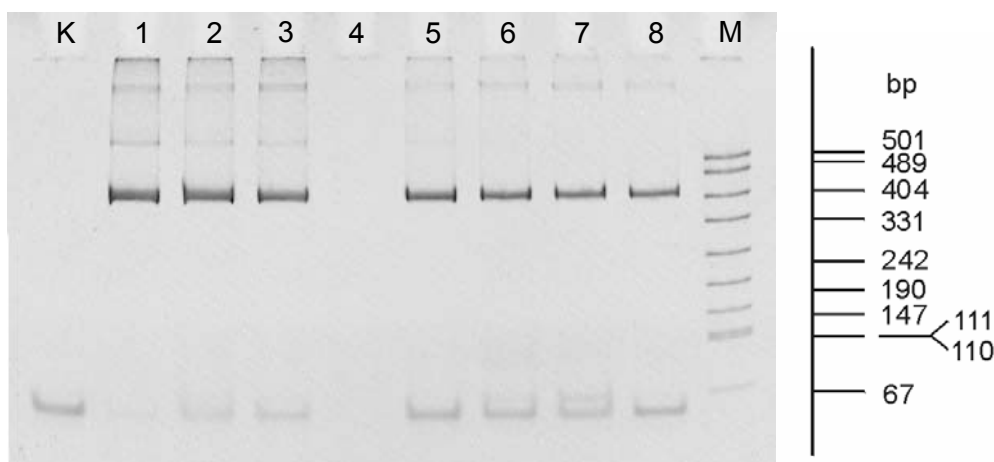


Abb. 72 Verdünnung der *Template*-DNA im PCR-Ansatz

Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, 1-8: Pute-*Template* (R-3) in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt, 1: unverdünnt, 2: 1:5, 3: 1:10, 4: 1:25, 5: 1:50, 6: 1:100, 7: 1:250, 8: 1:500, K: Reagenzienkontrolle der PCR. In Ansatz 4 ist die PCR ausgefallen.

Die genauere Analyse der einzelnen PCR-Ansätze durch Realzeit-Hybridisierung im Sensorchip bestätigte, dass auch bei höheren *Template*-Verdünnungen noch ausreichende PCR-Produkt-Konzentrationen für deutliche Signalanstiege erhalten wurden (Abb. 73). Dabei deutete sich für die größeren *Template*-Konzentrationen wie erwartet ein Übergang der PCR in ein Sättigungsniveau an. Das Experiment hat die große Empfindlichkeit der PCR veranschaulicht und gezeigt, dass geringe *Template*-Konzentrationen überproportional amplifiziert wurden, so dass für den Nachweis der einzelnen Spezies in Realproben geringe Nachweisgrenzen zu erwarten waren. Weil die Gesamt-DNA-Konzentration in Extrakten aus Realproben üblicherweise mindestens um den Faktor 100 größer ist als die geringste hier eingesetzte *Template*-Konzentration von 55 pg/μl (vgl. Tab. 4), sind nur die zu sehr geringem Anteil enthaltenen Spezies in entsprechenden Konzentrationen vertreten und sollten somit trotzdem noch nachweisbar sein.

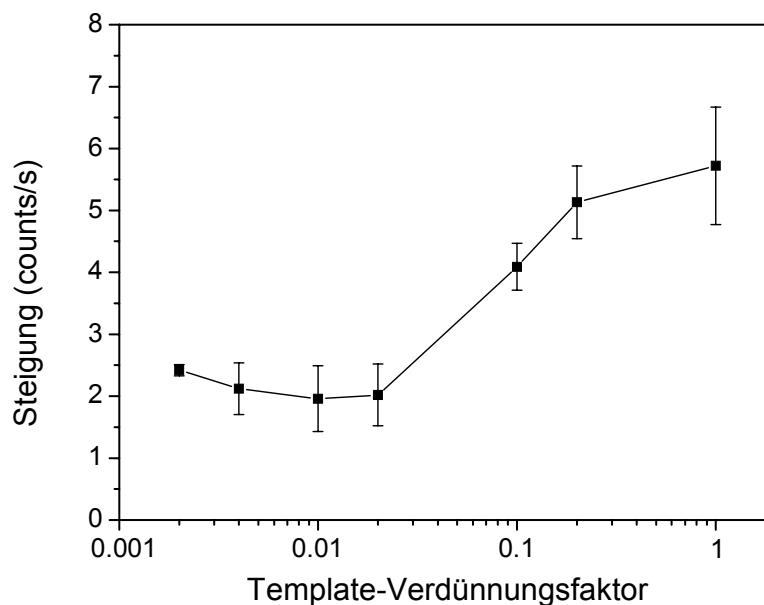


Abb. 73 Analyse von PCR-Produkten mit zunehmend verringerter *Template*-Konzentration im DNA-Sensorchip

Hybridisierung von je 5 μl der PCR-Produkte aus Pute-*Template* (R-3) in den verschiedenen Verdünnungen (vgl. Abb. 72). Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung eines Pute684-Sondenspots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über n = 3 Messungen.

5.2.3.6 Vergleich von Cy5-Primer- und Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkten

Mit dem Ziel, die Amplifikation der *cytb*-Sequenzen flexibler gestalten und auf zwei verschiedene Markierungsmethoden zurückgreifen zu können, wurde neben der standardmäßig angewendeten Cy5-Primer-Markierung auch der Fluorophoreinbau durch Cy5-dUTP getestet und die Detektion der verschiedenen PCR-Produkte gegenüber gestellt.

i) Variation der Cy5-dUTP-Markierung

Um optimale Bedingungen für die PCR bei Anwendung der Cy5-dUTP-Methode zu finden, wurde in Anlehnung an Ref. [180] für die Nukleotidbausteine dATP, dCTP und dGTP wie auch bei der Cy5-Primer-Markierung eine Konzentration von 200 μM gewählt, während die Menge des dTTPs um 50 % auf 100 μM reduziert wurde. In fünf parallelen Ansätzen wurde dann für die Amplifikation von Huhn-*Template*-DNA (R-1) die Cy5-dUTP-Konzentration im Bereich von 0 bis 50 μM variiert. Die Analyse der PCR-Produkte durch PAGE zeigte (Abb. 74 A), dass die Entstehung des 377bp-PCR-Produktes nicht durch die Anwesenheit des modifizierten Nukleotids inhibiert wurde. Dabei wurde mit zunehmender Cy5-dUTP-Konzentration im Ansatz eine Verbreiterung der 377bp-Bande beobachtet, die eventuell auf den verstärkten Einbau des sterisch anspruchsvollen Cy5-Moleküls und das dadurch verursachte ungleiche Laufverhalten der unterschiedlich stark markierten Produkte zurückzuführen ist. Ein Vergleich der Bandenintensitäten verdeutlicht, dass mit zunehmendem Cy5-dUTP-Anteil keine systematische Abnahme der PCR-Produkt-Ausbeute einherging (Abb. 74 B), welche zudem vergleichbar war zur Ausbeute einer PCR mit Cy5-Primer-Markierung unter analogen Bedingungen.

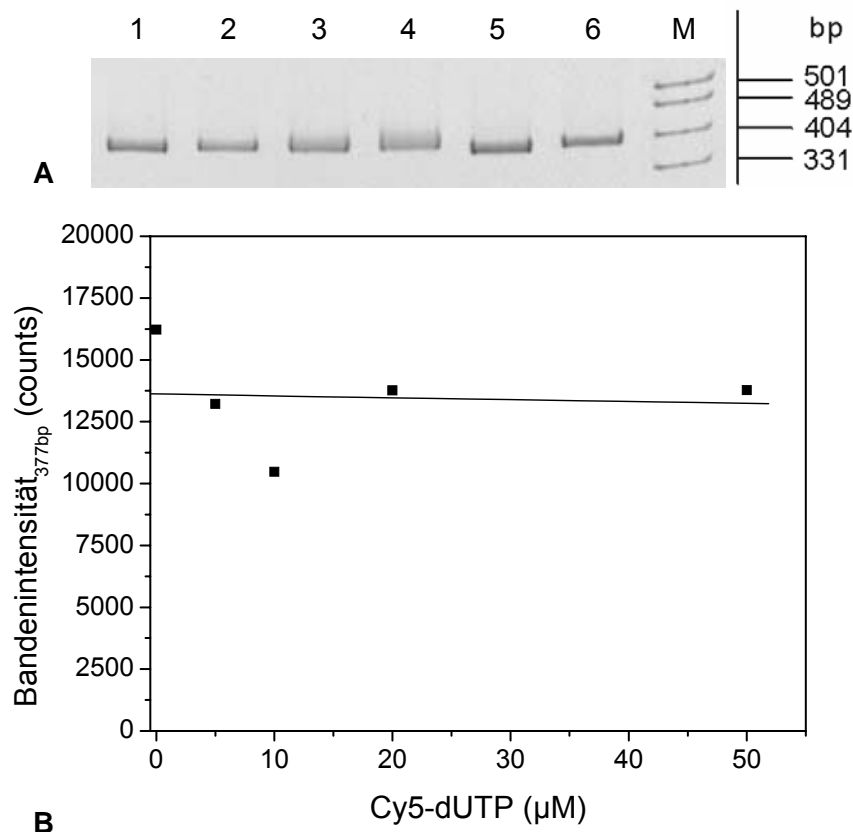


Abb. 74 Einfluss der Variation des Cy5-dUTP-Anteils auf die Ausbeute der PCR

A: Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, 1-6: PCR-Produkte aus Huhn-*Template* (R-1), 1: 5 μM Cy5-dUTP, 2: 10 μM Cy5-dUTP, 3: 20 μM Cy5-dUTP, 4: 50 μM Cy5-dUTP, 5: 0 μM Cy5-dUTP, 6: Standard-Cy5-Primer-Markierung, **B:** Auftragung der hintergrundkorrigierten Bandenintensitäten gegen die Cy5-dUTP-Konzentrationen für die Bahnen 1-5 in A. Die Bestimmung der Bandenintensitäten ist mit einem relativ großen statistischen Fehler behaftet, der aber nicht genauer abgeschätzt wurde.

Die Rohdaten der Analyse der verschiedenen PCR-Produkte im ALFexpress™ Analysesystem finden sich im Anhang (siehe 8.3.1). Für die Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkte zeigte sich zu Beginn der Trennung im niedermolekularen Bereich ein intensiver Peak, der durch unverbrauchtes Cy5-dUTP hervorgerufen wurde. Die Primer-Dimer-Banden waren dagegen verschwindend klein. Die 377bp-PCR-Produkte traten hier als überlappende Doppelbanden auf, eventuell verursacht dadurch, dass der hier ebenfalls Cy5-markierte *sense*-Strang an anderer Position im Gel lief als der *antisense*-Strang. Bei Auswertung der Flächenintegrale der 377bp-Doppelpeaks wurde eine lineare Zunahme des Fluoreszenzsignals bei steigender Cy5-dUTP-Konzentration beobachtet (Abb. 75). Aufgrund der nahezu konstanten PCR-Produkt-Ausbeute entspricht dies einem zunehmenden Markierungsgrad. Das unter den üblichen Cy5-Primerbedingungen hergestellte Huhn-PCR-Produkt zeigte im Gegensatz zu den Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkten wie erwartet nur einen definierten 377bp-Peak, dessen Flächenintegral deutlich geringer war als bei dem mit 50 μM Cy5-dUTP erzeugten PCR-Produkt.

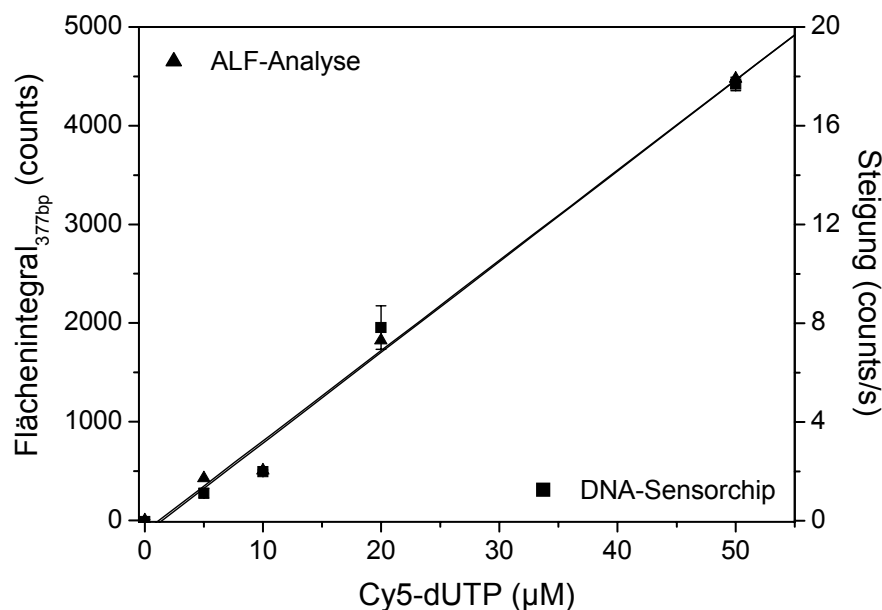


Abb. 75 Analyse des Einbaus von Cy5-dUTP in der *cytb*-PCR

Analyse der nicht-aufgereinigten PCR-Produkte aus Huhn-*Template* (R-1) mit den verschiedenen Cy5-dUTP-Konzentrationen (vgl. Abb. 74 A) im ALFexpress™ Analysesystem (linke Achse, vgl. 8.3.1) und im DNA-Sensorchip (rechte Achse, vgl. ii). Hybridisierung von je 4 μl der PCR-Produkte. Keine Korrektur, MW-Auswertung über $n = 2$ Huhn684-Sondenspots bei jeweils einer Messung. Durch die lokale Hintergrundkorrektur bei der MW-Auswertung wurden die negativen Signalsteigungen des Hintergrundes bei der Vermessung der nicht-aufgereinigten PCR-Produkte (vgl. Abb. 76 B) ausgeglichen.

ii) Analyse von Cy5-Primer- und Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkten im Sensorchip

Bei Realzeit-Hybridisierung der mit unterschiedlichen Cy5-dUTP-Konzentrationen hergestellten PCR-Produkte aus i) wurde der lineare Zusammenhang zwischen Fluoreszenzsignal und der Cy5-dUTP-Menge im Ansatz bis zu der höchsten Konzentration von 50 μM bestätigt

(Abb. 75). Während der Anbindung der nicht-aufgereinigten PCR-Produkte im Sensorchip wurde jedoch mit zunehmender Cy5-dUTP-Konzentrationen eine verstärkte unspezifische Anlagerung von Fluoreszenz auf der sensitiven Oberfläche beobachtet (Abb. 76 A). Besonders zu Beginn der Messungen stieg dabei die Hintergrundfluoreszenz sprunghaft an, woraufhin die unspezifisch gebundenen Komponenten im weiteren Verlauf der Messung langsam wieder abgelöst wurden (Abb. 76 E). Deshalb wurden bei Auswertung der Signalverläufe in den meisten Fällen sehr uneinheitliche Steigungsbilder mit teilweise negativen Hintergrundwerten erhalten (Abb. 76 B). Ursache für diese Beobachtungen ist die Tatsache, dass z.B. in einem PCR-Ansatz mit 20 μM Cy5-dUTP der Anteil der nicht eingebauten Fluorophore etwa um den Faktor 100 größer war als in einem Standard-PCR-Produkt mit Cy5-Primer-Markierung, wenn man davon ausgeht, dass der mit 400 nM eingesetzte Primer zur Hälfte umgesetzt worden war. Analoge Messergebnisse wurden auch in früheren Versuchen erhalten, bei denen die Hybridisierung eines Modell-Targets bewusst durch Zusatz eines 1000fachen Überschusses an Cy5-Oligo gestört wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Messdaten ließen sich zwar mit der Mittelwertmethode und der integrierten Hintergrundkorrektur noch sinnvoll auswerten (Abb. 75), allerdings wurde dennoch ein Vergleich vorgenommen zwischen der Hybridisierung von aufgereinigtem und nicht-aufgereinigtem Cy5-dUTP-markiertem PCR-Produkt. Dazu wurden 29 μl eines Pools aus Cy5-dUTP-PCR-Produkten mit Hilfe des MinEluteTM PCR Purification Kits aufgereinigt und in 30 μl TRIS-hydrochlorid (10 mM, pH 8.5) eluiert, so dass bei der Aufreinigung kein Volumeneffekt auftrat und durch Hybridisierung eine relative Quantifizierung von aufgereinigtem und nicht-aufgereinigtem Pool möglich war. Bei der Analyse beider Proben im Sensorchip wurde deutlich, dass sich das aufgereinigte PCR-Produkt ohne den störenden Cy5-dUTP-Hintergrund verhielt wie die bei Cy5-Primer-Markierung erhaltenen PCR-Produkte (Abb. 76 C+D). Das Signal für die aufgereinigte Probe war dabei allerdings aufgrund des Materialverlustes 21 % geringer als das der nicht-aufgereinigten Probe (Abb. 77).

Ein Vergleich der Signalstärken bei Hybridisierung von Cy5-dUTP- und Cy5-Primer-markierten PCR-Produkten ergab, dass für PCR-Produkte mit einer Cy5-dUTP-Konzentration von ca. 25 μM eine vergleichbare Signalintensität erhalten wird wie mit den nach Standardmethode hergestellten PCR-Produkten (Abb. 77). In weiteren PCR-Ansätzen mit Cy5-dUTP-Markierung wurde daher als Kompromiss zwischen maximalen Signalsteigungen und einem eingeschränkten Verbrauch des kostenintensiven Cy5-dUTPs mit einer Konzentration von 25 μM gearbeitet. Der Cy5-dUTP-Einbau hat sich damit grundsätzlich als eine geeignete, alternative Markierungsmethode erwiesen.

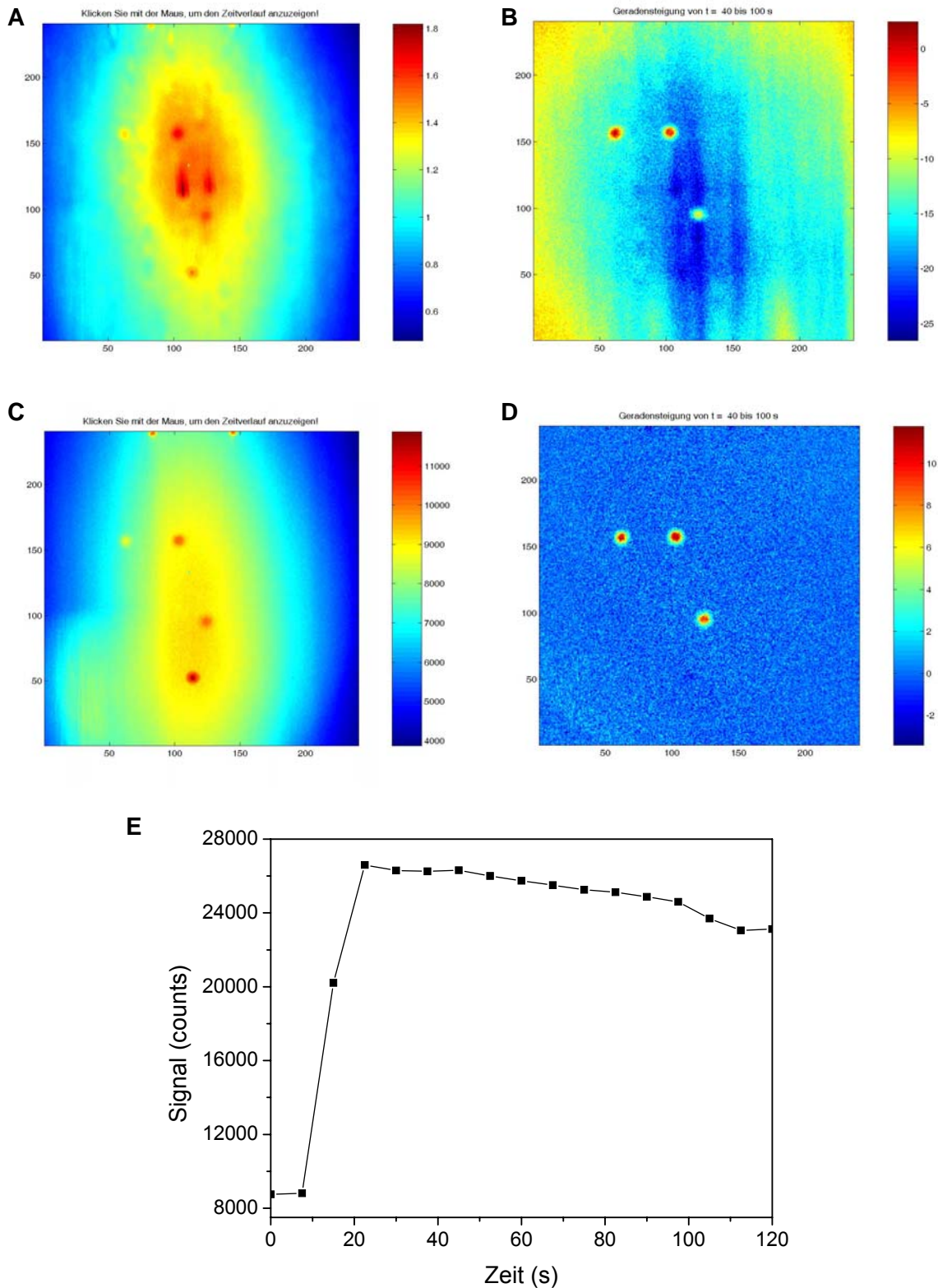


Abb. 76 Vergleich der Hybridisierung von aufgereinigten (C+D) und nicht-aufgereinigten (A+B) Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkten im DNA-Sensorchip

Die Reste von vier PCR-Ansätzen des Huhn-DNA-*Templates* (R-1) mit unterschiedlichen Cy5-dUTP-Konzentrationen wurden gepoolt und zur Hälfte aufgereinigt. Hybridisiert wurden jeweils 4 μ l des aufgereinigten und des nicht-aufgereinigten Cy5-dUTP-PCR-Produkt-Pools. **A+C**: Endbild nach 120 s, **B+D**: Steigungsbild im Bereich 40-100 s, **E**: Signalverlauf auf einem Pixel im Bereich der Hintergrundfluoreszenz bei der Hybridisierung von nicht-aufgereinigtem Cy5-dUTP-markiertem PCR-Produkt.

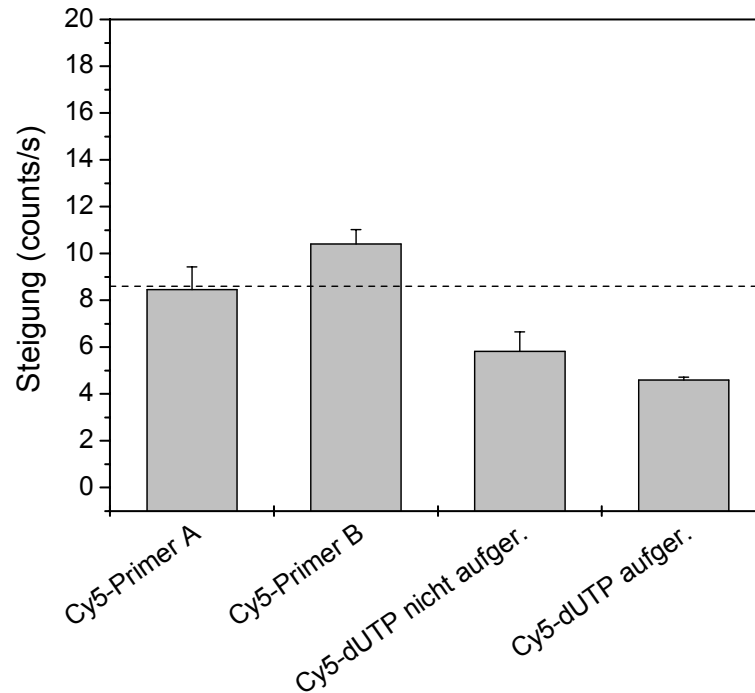


Abb. 77 Vergleich der Signalstärken im DNA-Sensorchip für unterschiedlich Cy5-markierte Huhn-PCR-Produkte

Template-DNA in allen Ansätzen: Huhn (R-1), jeweils 4 μ l PCR-Produkt vermessen. Proben: 2 verschiedene Ansätze mit Standard-Cy5-Primer-Markierung (A: n = 1, B: n = 3), Pool von Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkten aufgereinigt und nicht-aufgereinigt (n = 2). Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über n = 2 Huhn684-Sondenspots über angegebene Anzahl der Messungen. Gestrichelte Linie: extrapolierte Signalsteigung für ein mit 25 μ M Cy5-dUTP-markiertes PCR-Produkt (vgl. Abb. 75).

5.2.3.7 Charakterisierung der asymmetrischen PCR

Aufgrund des ausgeglichenen Primerverhältnisses bei der Amplifikation des 377bp großen Abschnittes des *cytb*-Gens unter Standardbedingungen wurde eigentlich die Entstehung doppelsträngiger PCR-Produkte erwartet, die erst nach vorangegangener Denaturierung im DNA-Sensorchip hybridisieren könnten. Interessanterweise wurden jedoch bei der Realzeit-hybridisierungsanalyse einzelner Amplifikate auch ohne Denaturierung deutliche Signalanstiege beobachtet. Weil der Denaturierungsschritt einen zusätzlichen zeitlichen Aufwand darstellt, wurden die PCR sowie die Notwendigkeit der Denaturierung systematisch untersucht. Dabei konnte durch Variation der Primerkonzentrationen und Analyse der entstandenen PCR-Produkte im DNA-Sensorchip verdeutlicht werden, dass unter den für die PCR gewählten Standardbedingungen eine asymmetrische Produktverteilung erhalten wurde.

i) Variation des Primerverhältnisses bei Cy5-dUTP-Markierung

Bei konstanter Konzentration des *antisense*-Primers *cytb*779 wurde zunächst bei der Amplifikation von Rind-*Template*-DNA (R-4) und Cy5-dUTP-Markierung der PCR-Produkte

der Anteil des cytb403-Primers von 60:10 bis 1:10 in vier Schritten variiert (Abb. 78). In den entstandenen PCR-Produkten lagen sowohl die *antisense*- als auch die *sense*-Stränge Cy5-markiert vor. Die Analyse der PCR-Produkte durch PAGE zeigte, dass die Intensität der 377bp-Banden der Proben A-C nahezu konstant blieb, während bei Verringerung der cytb403-Konzentration auf nur noch 1 pmol/Ansatz eine deutlich schwächere 377bp-Bande auftrat. Ursache dafür ist die Tatsache, dass in D aufgrund der reduzierten cytb403-Primermenge in den meisten der 35 Zyklen nur eine lineare Amplifikation stattfand, während in den Ansätzen A-C die Konzentrationen beider Primer ausreichend groß waren für eine zunächst exponentielle Vermehrung der eingesetzten DNA. Besonders für diese Proben wurden in der PAGE nur verschwommene 377bp-Banden erhalten, wobei die bei ALF-Analyse der vier PCR-Produkte aufgenommenen Signalpeaks bei 377 bp ebenfalls verbreitert waren (Abb. 79). Wie bereits in 5.2.3.6 erwähnt, ist eine mögliche Ursache dafür der unterschiedliche Markierungsgrad der amplifizierten DNA-Fragmente, der zu Änderungen der Beweglichkeit im Gel führen kann. Im Gegensatz zu der ersten Analyse Cy5-dUTP-markierter PCR-Produkte im ALFexpress™ Analysesystem (vgl. 8.3.1) ergaben sich hier jedoch keine definierten Doppelpicks, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass in den beiden Amplifikationen unterschiedliche DNA-*Templates* eingesetzt worden waren. Möglich ist auch, dass die verbreiterten Peaks bei Analyse der Produkte A-D aus einer Überlappung zweier eng benachbarter Peaks von *sense*- und *antisense*-Strang hervorgingen. Die Intensitäten der 377bp-Peaks im ALF bestätigten die bereits in der PAGE beobachtete Tendenz, dass sich eine verringerte cytb403-Konzentration negativ auf die Entstehung von Cy5-markiertem PCR-Produkt auswirkte. Ein Vergleich der Bandenintensitäten der Proben A und D ergab, dass der Anteil des Signals von Produkt D im PA-Gel bei 36 %, in der ALF-Analyse dagegen nur bei 9 % lag, so dass unter den Bedingungen einer linearen Amplifikation offensichtlich überproportional weniger Cy5-dUTP eingebaut wurde als bei ausreichender Konzentration beider Primer.

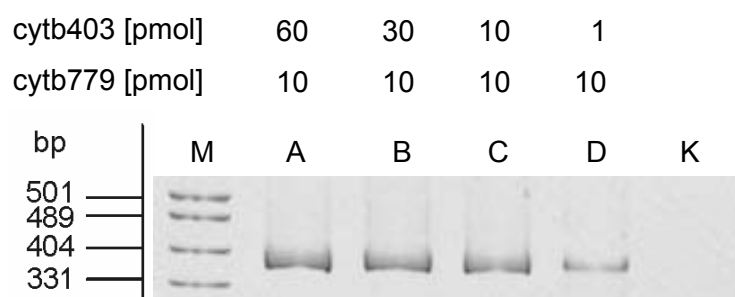


Abb. 78 Variation des Primerverhältnisses bei Cy5-dUTP-Markierung

Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, A-D: Rind-*Template* (R-4) bei Cy5-dUTP-Markierung mit unterschiedlichen Primerverhältnissen amplifiziert, K: Reagenzienkontrolle der PCR (cytb403/cytb779 10:10).

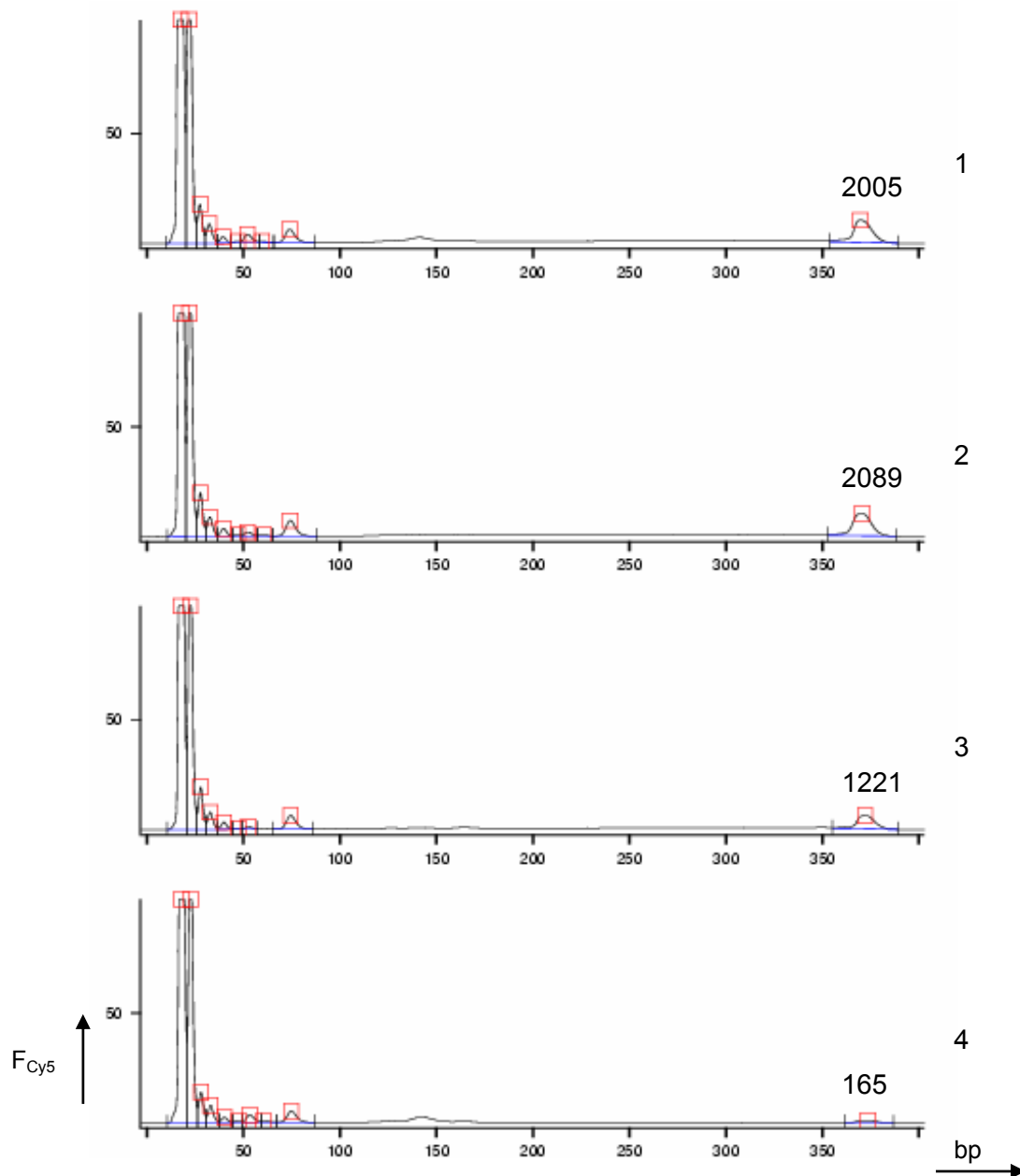


Abb. 79 Analyse Cy5-dUTP-markierter PCR-Produkte mit unterschiedlichem Primerverhältnis im ALFexpress™ Analysesystem

1-4: PCR-Produkte aus Rind-*Template* (R-4) in gleicher Verdünnung aufgetragen, 1: cytb403/cytb779 60:10, 2: cytb403/cytb779 30:10, 3: cytb403/cytb779 10:10, 4: cytb403/cytb779 1:10. Fluoreszenzsignal F_{Cy5} angegeben im Verhältnis (%) zur Intensität des gesättigten Signals, an den 377bp-Peaks sind die Flächenintegrale (in counts) vermerkt.

Eine aufschlussreichere Analyse der PCR-Produkte A-D wurde jedoch erst durch Hybridisierung der Proben im DNA-Sensorchip möglich. Neben der üblicherweise verwendeten Rind684-Sonde, an die der aus dem Primer cytb779 entstandene *antisense*-Strang bindet, war zu diesem Zweck auch die Rind684anti-Sonde immobilisiert worden, die komplementär zu dem aus dem Primer cytb403 entstehenden *sense*-Strang ist. Die Proben wurden ohne vorangegangene Aufreinigung sowohl mit als auch ohne alkalische Denaturierung vermessen (Abb. 80). Bei Auswertung der Hybridisierung mit nicht-denaturiertem PCR-

Produkt zeigte sich, dass bei einem Primerverhältnis von 1:10 in Probe D wie erwartet im Wesentlichen der *antisense*-Strang entstanden war, aufgrund der hauptsächlich linearen Amplifikation allerdings nur in einer relativ geringen Konzentration. Weil aufgrund der geringen *cytb403*-Konzentration kaum *sense*-Strang entstanden war und entsprechend fast kein doppelsträngiges PCR-Produkt vorlag, blieben die Signalanstiege für beide SONDENSEQUENZEN auch nach vorangegangener Denaturierung nahezu unverändert.

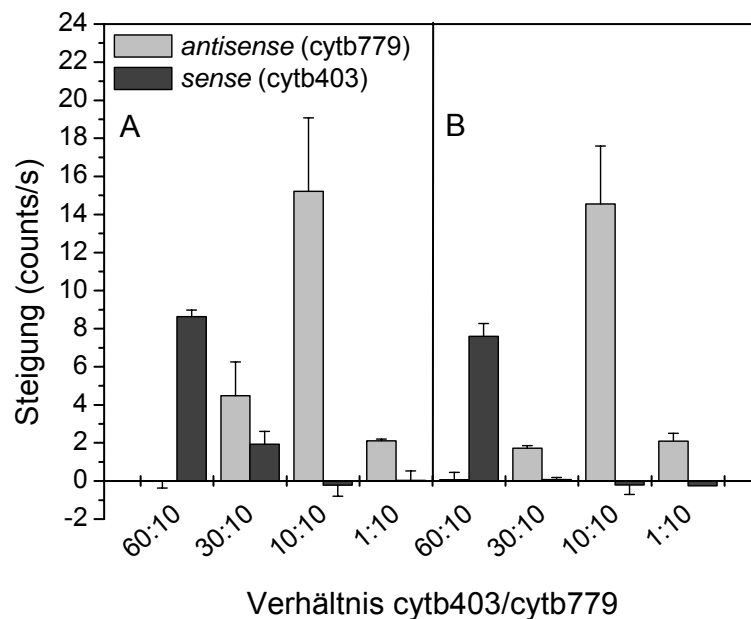


Abb. 80 Analyse Cy5-dUTP-markierter PCR-Produkte mit unterschiedlichem Primerverhältnis im DNA-Sensorchip

Template-DNA in allen Ansätzen: Rind (R-4), jeweils 6 µl PCR-Produkt vermessen. Hybridisierung des *antisense*-Stranges (entstanden aus Primer *cytb779*) auf Sonde Rind684 und des *sense*-Stranges (entstanden aus Primer *cytb403*) auf Sonde R684anti. **A**: mit Denaturierung, **B**: ohne Denaturierung. Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über je n = 2 Sondensspots in einer Messung.

Bei Erhöhung des *cytb403*-Anteils im PCR-Ansatz auf ein Primerverhältnis von 10:10 wurde ein starker Anstieg der Konzentration des *antisense*-Stranges beobachtet, wobei die Reaktion offensichtlich nach wie vor stark asymmetrisch verlaufen war, weil dieser ohne vorangegangene Denaturierung detektierbar war. Im Unterschied zu Ansatz D lag hier jedoch eine Kombination aus exponentieller Vermehrung und einer linearen Amplifikation während der letzten Zyklen der Reaktion nach Verbrauch des *cytb403*-Primers vor. Dass der während des exponentiellen Verlaufes gebildete *sense*-Strang auch nach vorangegangener Denaturierung nicht detektiert werden konnte, ist auf einen Konkurrenzeffekt des überschüssigen *antisense*-Stranges zurückzuführen.

Durch eine weitere Erhöhung der *cytb403*-Konzentration auf ein Verhältnis von 30:10 in Probe B wurden nahezu symmetrische PCR-Bedingungen angenähert. Ohne Denaturierung wurde nur noch ein relativ schwaches Signal des in geringem Überschuss vorliegenden *antisense*-Stranges detektiert, während das in erster Linie entstandene doppelsträngige

PCR-Produkt erst nach alkalischer Denaturierung durch die beiden Sonden detektiert wurde. Dabei zeigt ein Vergleich der Hybridisierung mit und ohne Denaturierung deutlich, dass sich das Signal des *antisense*-Stranges additiv verhielt.

In Probe A mit einem Primerverhältnis von 60:10 hat sich dann der asymmetrische PCR-Verlauf umgekehrt. Es lag auch hier eine Kombination aus exponentieller und linearer Vermehrung vor, allerdings mit einem Überschuss des *sense*-Stranges, der ohne Denaturierung detektiert werden konnte und auch nach Denaturierung die Hybridisierung des *antisense*-Stranges durch Konkurrenz unterdrückte.

Für ein maximales Signal der Rind684-Sonde hatten sich damit die PCR-Standardbedingungen von je 10 pmol Primer im Ansatz aufgrund der Kombination aus exponentieller und linearer Amplifikation als optimal erwiesen.

ii) Variation des Primerverhältnisses bei Cy5-Primer-Markierung

Um die Erkenntnisse bezüglich der PCR-Produktverteilung bei Variation des Primerverhältnisses aus i) zu bestätigen, wurde ein analoger Versuch durchgeführt, in dem die Cy5-Markierung nicht über den Cy5-dUTP-Baustein, sondern über einen Cy5-markierten Primer eingeführt wurde. Entsprechend wurde hier die Konzentration des Primers Cy5cytb779 konstant gehalten und der Anteil des cytb403-Primers von 60:10 bis 1:10 in sechs Schritten variiert. Im Gegensatz zur Markierung über den Einbau von Cy5-dUTP lagen in diesem Fall in den entstandenen PCR-Produkten nur die *antisense*-Stränge Cy5-markiert vor. Die Analyse der PCR-Produkte durch PAGE bestätigte das Ergebnis des analogen Experiments mit Cy5-dUTP-Markierung aus i) (Abb. 81). Demnach war die Intensität der 377bp-Banden der Proben A-C nahezu konstant, während bei Verringerung der cytb403-Konzentration ausgehend von Ansatz D eine abnehmende Bandenstärke beobachtet wurde. Das Produkt F mit 1/10 der Menge an cytb403 konnte nur noch sehr schwach im PA-Gel nachgewiesen werden. Ursache dafür war hier ebenfalls die Tatsache, dass bei abnehmendem cytb403-Anteil die exponentielle Vermehrung immer mehr durch eine lineare Amplifikation abgelöst wurde.



Abb. 81 Variation des Primerverhältnisses bei Cy5-Primer-Markierung

Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, A-F: Rind-*Template* (R-4) bei Cy5-Primer-Markierung mit unterschiedlichen Primerverhältnissen amplifiziert, K: Reagenzienkontrolle der PCR (cytb403/ cytb779 10:10).

Bei der ALF-Analyse wurde nur der Cy5-markierte *antisense*-Strang in den verschiedenen PCR-Produkten detektiert (Abb. 82).

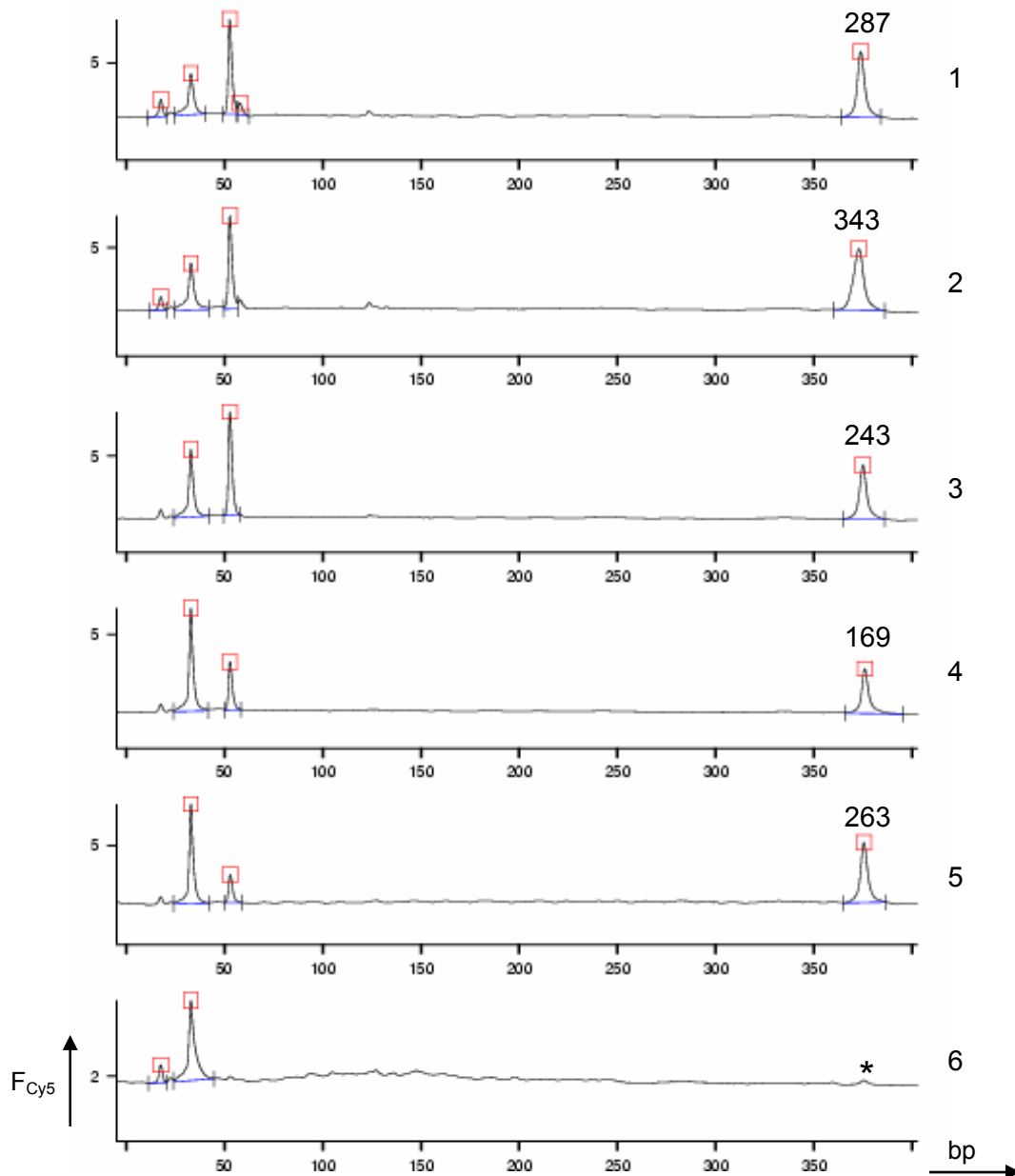


Abb. 82 Analyse Cy5-Primer-markierter PCR-Produkte mit unterschiedlichem Primerverhältnis im ALFexpress™ Analysesystem

1-6: PCR-Produkte aus Rind-*Template* (R-4) in gleicher Verdünnung aufgetragen, 1: cytb403/Cy5cytb779 60:10, 2: cytb403/Cy5cytb779 40:10, 3: cytb403/Cy5cytb779 20:10, 4: cytb403/Cy5cytb779 10:10, 5: cytb403/Cy5cytb779 5:10, 6: cytb403/Cy5cytb779 1:10. Fluoreszenzsignal F_{Cy5} angegeben im Verhältnis (%) zur Intensität des gesättigten Signals, an den 377bp-Peaks sind die Flächenintegrale (in counts) vermerkt (*: < Detektionsgrenze).

Die Signalintensitäten der schmalen 377bp-Peaks zeigten im Rahmen der Methodengenauigkeit, dass die Konzentration des *antisense*-Stranges aufgrund der konstanten Konzentration des Cy5cytb779-Primers bei Verringerung der cytb403-Menge im Ansatz bis zu einem Verhältnis von 5:10 nicht systematisch beeinflusst wurde. Erst in Probe F mit 1 pmol cytb403

war die Amplifikation soweit eingeschränkt, dass die geringe Konzentration des entstandenen *antisense*-Stranges im ALF nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache, dass ein Rückgang der Bandenintensität in der PAGE schon bei Probe D, im ALF dagegen erst bei Probe F beobachtet wurde, beruht darauf, dass im PA-Gel hauptsächlich die dsDNA, im ALF aber nur der einzelsträngige *antisense*-Strang zum Signal beigetragen haben. Bei Auswertung der ALF-Daten wurde auf Grundlage der beiden Peaks im niedermolekularen Bereich außerdem deutlich, dass die Konzentration des Cy5cytb779-Primers konstant blieb, während die Primer-Dimer-Konzentration ausgehend von Probe C mit sinkender cytb403-Konzentration wie erwartet abnahm.

Bei der Hybridisierung der PCR-Produkte im DNA-Sensorchip wurden die Proben wiederum sowohl mit als auch ohne alkalische Denaturierung vermessen. Bei den Messungen ohne Denaturierung (Abb. 83 B) zeigte sich an der den *antisense*-Strang detektierenden Rind684-Sonde auch hier, dass bei einem Primerverhältnis von 1:10 nur eine schwache lineare Amplifikation des *antisense*-Stranges erreicht worden war. In den Proben D und E mit 10 bzw. 5 pmol cytb403 führte die asymmetrische PCR dagegen zu einem deutlich höheren Signal für die Rind684-Sonde, das durch Kombination von exponentieller und linearer Vermehrung entstanden war. Obwohl nach den Ergebnissen der ALF-Analyse die Konzentration des *antisense*-Stranges bei einer weiteren Erhöhung der cytb403-Menge im PCR-Ansatz nahezu konstant blieb, wurde wie erwartet für die Proben A-C im Sensorchip ein deutlicher Rückgang des Fluoreszenzsignals beobachtet, weil der *antisense*-Strang effektiv mit dem zunehmend im Überschuss vorliegenden *sense*-Strang hybridisierte.

Ausgehend von den PCR-Produkten mit einem deutlichen Cy5cytb779-Überschuss bis zu einem Primerverhältnis von 20:10 ergab sich bei der Hybridisierung der PCR-Produkte im Sensorchip ein vergleichbares Ergebnis für die Messungen mit und ohne Denaturierung, das jeweils auch das Verhalten aus i) bestätigte. Bei einer weiteren Zunahme des cytb403-Anteils zeigten die entstandenen, zunehmend doppelsträngigen PCR-Produkte mit einem Überschuss des *sense*-Stranges aber ein abweichendes Verhalten. So wurde hier z.B. im Gegensatz zu den Ergebnissen aus i) (Abb. 80) nach vorangegangener Denaturierung in Probe A das Signal des Cy5-*antisense*-Stranges an der Rind684-Sonde nicht vollständig durch Konkurrenz unterdrückt. Außerdem wurde nach Denaturierung der Proben A-C unerwartet ein Signal an der Rind684anti-Sonde beobachtet, die eigentlich den *sense*-Strang detektieren soll (Abb. 83 A). Da dieser jedoch nur unmarkiert in den Proben A-F vorlag, kann der für die Rind684anti-Sonde beobachtete Signalanstieg nur durch den *antisense*-Strang hervorgerufen worden sein. Dabei konnte eine Kreuzhybridisierung des *antisense*-Stranges nicht die Ursache sein, weil die Signale sonst auch für die Proben mit den anderen Primerverhältnissen hätten beobachtet werden müssen. Die PAGE zeigte außerdem, dass neben dem 377bp-PCR-Produkt keine weiteren, unspezifisch amplifizierten DNA-Fragmente

entstanden waren, abgesehen von den Primer-Dimern, die aber z.B. ebenfalls in Probe D vorlagen und dort nicht zu einer Anbindung an der Rind684anti-Sonde geführt haben.

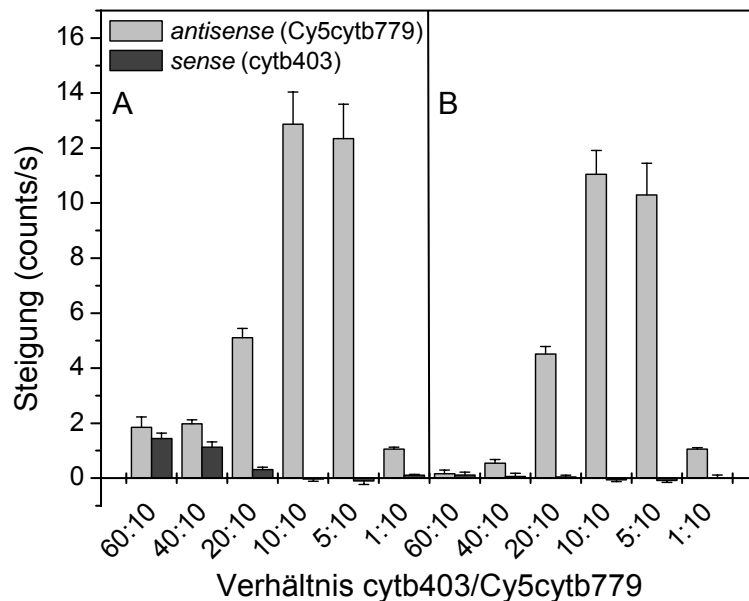


Abb. 83 Analyse Cy5-Primer-markierter PCR-Produkte mit unterschiedlichem Primerverhältnis im DNA-Sensorchip

Template-DNA in allen Ansätzen: Rind (R-4), jeweils 4 µl PCR-Produkt vermessen. Hybridisierung des *antisense*-Stranges (entstanden aus Primer Cy5cytb779) auf Sonde Rind684 und des *sense*-Stranges (entstanden aus Primer cytb403) auf Sonde R684anti. **A:** mit Denaturierung, **B:** ohne Denaturierung. Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über je n = 2 Sondenspots in n = 2 Messungen.

Eine mögliche Ursache für die Entstehung der Fluoreszenzanbindung an der Rind684anti-Sonde ist die in Abb. 84 dargestellte Ausbildung eines *Sandwich*-Hybrids. Im Falle einer asymmetrischen PCR-Produkt-Verteilung mit einem Überschuss des unmarkierten *sense*-Stranges hybridisierte ein Teil davon mit der komplementären Sonde Rind684anti, während andere *sense*-Stränge durch Bindung der markierten *antisense*-Stränge das Signal an der Rind684-Sonde unterdrückten. Weil die Sondensequenzen im zentralen Bereich der PCR-Produkte binden, konnte der ebenfalls in Lösung vorliegende freie Cy5cytb779-Primer direkt mit dem komplementären, freien 3'-Ende des an der Fangsonde gebundenen *sense*-Stranges hybridisieren und dadurch das Fluoreszenzsignal hervorrufen. Dieser „*Sandwich*-Aufbau“ würde auch erklären, warum das Signal an der Rind684anti-Sonde von Probe C zu Probe A mit zunehmendem Überschuss des *sense*-Stranges größer wurde. Eine analoge Bindung des Cy5cytb779-Primers an das Hybrid auf der Rind684-Sonde war nicht möglich, weil der Primer die gleiche Orientierung aufweist wie der ohnehin markierte *antisense*-Strang.

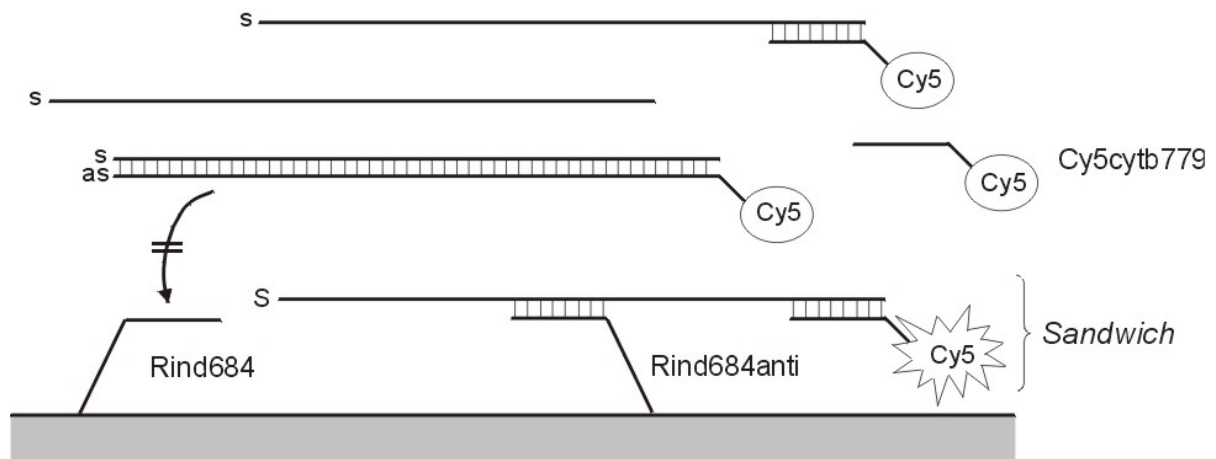


Abb. 84 Sandwich-Aufbau als Erklärungsansatz für das Signal auf der Rind684anti-Sonde bei Hybridisierung Cy5-Primer-markierter PCR-Produkte im DNA-Sensorchip

Der unmarkierte *sense*-Strang (s) liegt durch die asymmetrische Reaktionsführung der PCR bei erhöhter *cytb403*-Konzentration im Überschuss vor (as: *antisense*-Strang).

iii) Variation der Primergesamtmenge

Bei optimiertem und konstantem Primerverhältnis wurde anschließend untersucht, ob eine Veränderung der Primergesamtmenge im PCR-Ansatz einen Einfluss auf die asymmetrische Verteilung der PCR-Produkte und die Ausbeute der Reaktion hatte. Dazu wurde Huhn-*Template*-DNA (R-1) amplifiziert und die Menge jedes Primers im Bereich von 10-80 pmol je Ansatz in vier Schritten gesteigert (Abb. 85). Die Auswertung der 377bp-Bandenintensitäten in der PAGE zeigte, dass bei zunehmender Konzentration beider Primer keine signifikante Erhöhung der Ausbeute an dsDNA auftrat. Die ALF-Analyse der Cy5-markierten Einzelstränge in den vier Proben ergab tendenziell eine Zunahme des Fluoreszenzsignals bei 377 bp von A nach C (vgl. 8.3.2), allerdings wurde hier eventuell auch aufgrund der Ungenauigkeit der Bestimmungsmethode kein einheitlicher Anstieg des Signals beobachtet. Wie schon in den PCR-Produkten aus i) und ii) waren auch hier in den Proben A-D bei Variation der Primerbedingungen keine zusätzlichen DNA-Fragmente entstanden.

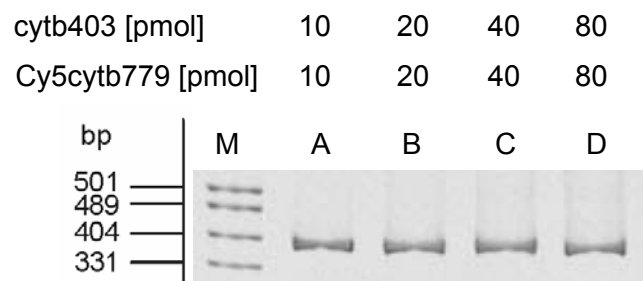


Abb. 85 Variation der Primerkonzentration bei konstantem Primerverhältnis

Ethidiumbromid gefärbtes PA-Gel, M: pUC19-Marker, A-D: Huhn-*Template* (R-1) bei unterschiedlichen Mengen der Primer *cytb403* und Cy5*cytb779* im Ansatz amplifiziert.

Die Hybridisierung des Cy5-markierten *antisense*-Stranges in den vier PCR-Produkten mit der Sonde Huhn684 im DNA-Biosensor wurde sowohl mit als auch ohne vorangegangene alkalische Denaturierung untersucht (Abb. 86). Dabei ergaben sich grundsätzlich keine Unterschiede für die Messergebnisse mit und ohne Denaturierung, wobei der Wert, welcher für Probe A nach alkalischer Vorbehandlung erhalten wurde, als Ausreißer gewertet werden konnte (vgl. iii). Allerdings wurde eine Zunahme des Signals bei ansteigender Konzentration der Primer beobachtet.

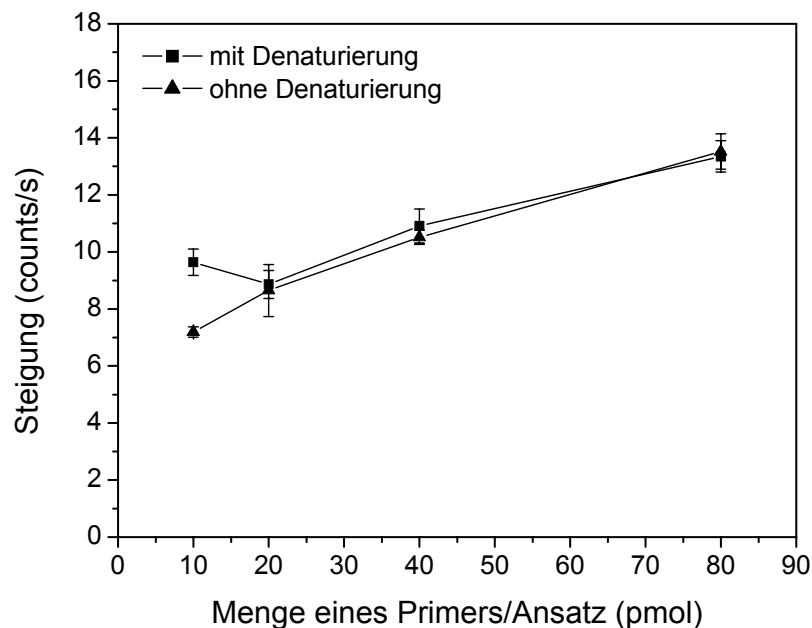


Abb. 86 Einfluss der Primerkonzentration auf die Hybridisierung des Cy5-markierten *antisense*-Stranges im DNA-Sensorchip bei konstantem Primerverhältnis

Template-DNA in allen Ansätzen: Huhn (R-1), Primer: cytb403 und Cy5cytb779, jeweils 2 μ l PCR-Produkt vermessen. Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über $n = 2$ Huhn684-Sonden-spots in $n = 2$ Messungen.

Die asymmetrische Verteilung der PCR-Produkt-Zusammensetzungen wurde insofern durch Erhöhung der Primergesamtmenge nicht beeinflusst, als dass in allen Proben der *antisense*-Strang im absoluten Überschuss gegenüber dem *sense*-Strang vorgelegen haben muss. Weil die Hybridisierungssignale sowie die Intensitäten der ALF-Peaks bei Vergrößerung der Primerkonzentrationen zunahm und die Gesamtmenge an dsDNA laut PAGE-Analyse gleichzeitig konstant blieb, muss die lineare Amplifikation des *antisense*-Stranges in den letzten Zyklen der PCR mit zunehmender Primermenge sogar noch verstärkt worden sein. Damit konnte gezeigt werden, dass durch eine größere Primergesamtmenge das Potential der Nachweismethode zusätzlich verbessert werden kann. Die Gewinne an Signalintensität lagen jedoch nicht im Bereich von Größenordnungen, so hat die um Faktor 8 vergrößerte Primerkonzentration nur einen um Faktor 1.9 erhöhten Signalanstieg bewirkt. Um den Verbrauch des teuren Cy5-markierten cytb779-Primers einzuschränken, wurde in dieser Arbeit deshalb mit jeweils 10 pmol Primer/Ansatz gearbeitet.

iii) Einfluss des Denaturierungsschrittes

Nachdem in i) und ii) die alkalische Denaturierung nahezu keine Auswirkung auf die Hybridisierung der unter Standardbedingungen hergestellten Rind-PCR-Produkte mit 10 pmol je Primer im Ansatz hatte, wurde das Ergebnis auch für die Messung nach thermischer Denaturierung sowie für die PCR-Produkte anderer Spezies bestätigt. Abb. 87 zeigt, dass die Signalsteigung mit Huhn-PCR-Produkt unabhängig davon war, ob mit alkalischer, thermischer, kombinierter oder ganz ohne Denaturierung gemessen wurde.

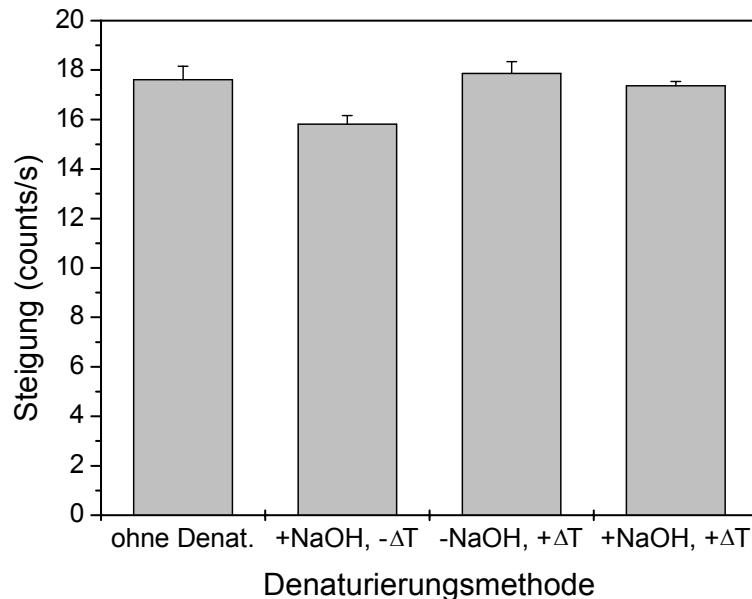


Abb. 87 Auswirkung der Denaturierung auf die Hybridisierung von Huhn-PCR-Produkt

Hybridisierung von je 5 μ l Huhn-PCR-Produkt-Pool. +NaOH: alkalisch denaturiert, + ΔT : thermisch denaturiert. Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über einen Huhn684-Sondenspot in $n = 3$ Messungen.

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für das Pute-PCR-Produkt erhalten (Daten nicht gezeigt). Mit einem 166bp-PCR-Produkt aus dem *Salmonella*-invA-Gen konnte dagegen demonstriert werden, dass in einer Probe mit hauptsächlich doppelsträngigem Produkt, d.h. symmetrischer Verteilung zwischen *sense*- und *antisense*-Strang, die Denaturierung eine deutlich positive Auswirkung auf das Hybridisierungssignal hatte (Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wurde allerdings dennoch zunächst standardmäßig vor der Hybridisierung alkalisch denaturiert, weil ohne ausführlichere Untersuchung nicht für alle Spezies und Probenzusammensetzungen vorausgesetzt werden konnte, dass tatsächlich immer ein großer Überschuss des *antisense*-Stranges entstanden war. Zudem bedeutete die alkalische Denaturierung nur einen geringfügigen zeitlichen Mehraufwand.

5.2.3.8 Analyse verschiedener Mischungen zweier *Template*-DNAs

Nachdem durch die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Experimente die Eigenschaften der *cytb*-PCR mittels PAGE sowie Analyse im ALF und im DNA-Sensorchip näher untersucht worden waren, sollten im weiteren Verlauf zusätzliche Versuche zum Nachweis verschiedener Spezies in Mischung durch Realzeit-Hybridisierung durchgeführt werden. Bereits in 5.2.3.4 ist die Analyse von Mischungen auf Amplikonebene beschrieben worden. Im nächsten Schritt wurden nun die PCR-Produkte M-1 bis M-7 hybridisiert, die aus Mischungen der *Template*-DNA von Rind und Huhn in unterschiedlichen Verhältnissen hergestellt worden waren (vgl. 5.2.1.6). Der Nachweis beider Spezies auch bei 1%iger Zumischung war möglich (Abb. 88). Für beide Komponenten wurde bei zunehmendem Anteil der *Template*-DNA im PCR-Ansatz die Steigerung der Menge an entstandenem PCR-Produkt und damit der Signalstärke auf der jeweiligen Sonde deutlich.

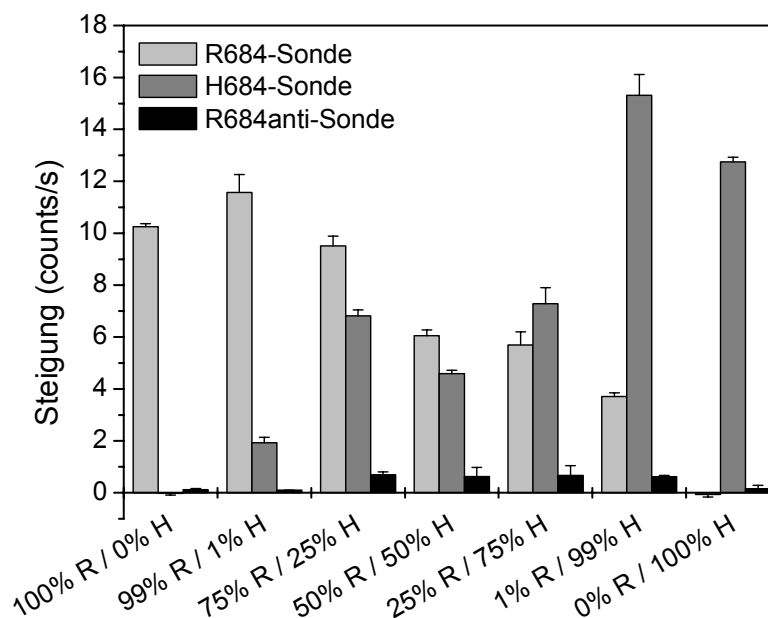


Abb. 88 Analyse der PCR-Produkte aus *Template*-Mischungen zweier Spezies in unterschiedlichen Verhältnissen durch Realzeit-Hybridisierung

Hybridisierung von je 4 μ l PCR-Produkt. Zusammensetzung der *Template*-Mischung bei den sieben hybridisierten PCR-Produkten M-1 bis M-7 auf der x-Achse. Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über je einen Sondenspot in $n = 3$ Messungen.

Damit konnte das Ergebnis der konventionellen Chiphybridisierung bestätigt werden (vgl. 5.2.2.8). Auch das unerwartet hohe Huhn-Signal für Probe M-3 war bereits bei der Hybridisierung dieses PCR-Ansatzes unter dem Deckgläschen aufgetreten. Die Ursache für diesen Ausreißer ist daher nicht bei der Hybridisierung zu suchen, sondern bei der PCR, die nicht in jedem Reaktionsgefäß mit genau derselben Effizienz ablief.

Da auf dem verwendeten Sondenarray aus den Versuchen zur asymmetrischen Steuerung der PCR noch die R684anti-Sonde immobilisiert war, wurde bei der Hybridisierung der PCR-

Produkt-Mischungen ein interessantes Verhalten beobachtet. Obwohl der *sense*-Strang des Rind-PCR-Produktes nicht Cy5-markiert war, wurde mit den Proben M-3 bis M-6 auch ein Signalanstieg für die Rind684anti-Sonde beobachtet. Eine mögliche Ursache dafür ist die Ausbildung von Heteroduplex-DNA zwischen dem Rind-*sense*- und dem Huhn-*antisense*-Strang (und umgekehrt) aufgrund großer interspezifisch sequenzkonservierter Bereiche in den beiden 377bp-Fragmenten (Abb. 89). Durch die parallele Hybridisierung des Rind-*sense*-Stranges mit der Rind684anti-Sonde wurde dort aufgrund des gekoppelten Fluorophors am 5'-Ende des Huhn-*antisense*-Stranges im Heteroduplex ein Signalanstieg detektiert. Die Theorie des Heteroduplexphänomens steht im Einklang damit, dass das Rind684anti-Signal nur in den Proben auftrat, in denen Rind in Mischung mit einer anderen Spezies in ausreichender Konzentration vorlag. Es wurde demnach auch nicht detektiert bei Hybridisierung des reinen Huhn-PCR-Produktes.

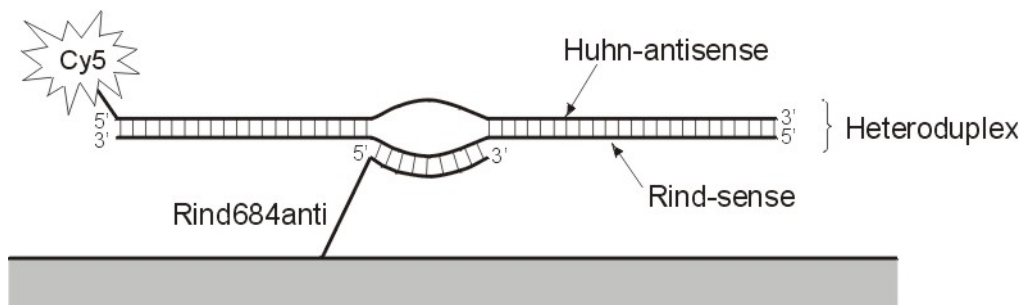


Abb. 89 Heteroduplexphänomen als Erklärungsansatz für das Signal auf der Rind684anti-Sonde bei Realzeit-Hybridisierung von Rind-PCR-Produkt in Mischung

5.2.3.9 Analyse der zur Validierung hergestellten Mischproben

Um die Nachweisgrenzen der Methode zur Tierartendifferenzierung mittels Realzeit-Hybridisierung im Hinblick auf praktische Fragestellungen abschätzen zu können, wurden auch hier die DNA-Extrakte der am CVUA Münster aus Rohmaterial hergestellten Mischproben aus Tab. 3 analysiert, die zuvor bereits konventionell auf DNA-Chips hybridisiert worden waren (vgl. 5.2.2.9). Von den entsprechenden PCR-Produkten wurden – wenn nicht anders vermerkt – in jeweils einer Messung 4 µl hybridisiert. Dadurch konnten sowohl Rindanteile in Schweinefleisch von 0.1 und 1 % als auch 1%ige Huhnzumischungen in einer Probenmatrix aus Rindfleisch eindeutig mit Signalsteigungen oberhalb des Schwellenwertes von 0.2 counts/s nachgewiesen werden (Abb. 90). Lediglich zum Nachweis von 0.1%igen Huhnanteilen in Rindfleisch musste das PCR-Produkt-Volumen in der Messlösung auf 25 µl vergrößert werden, weil mit 4 bzw. 10 µl PCR-Produkt der Proben V-5 und V-6 für die Huhn684-Sonde nur Signale unterhalb des Schwellenwertes detektiert werden konnten. Dementsprechend lag für den Nachweis von Huhn bei Einsatz von 4 µl PCR-Produkt die Nachweisgrenze zwischen 0.1 und 1 %.

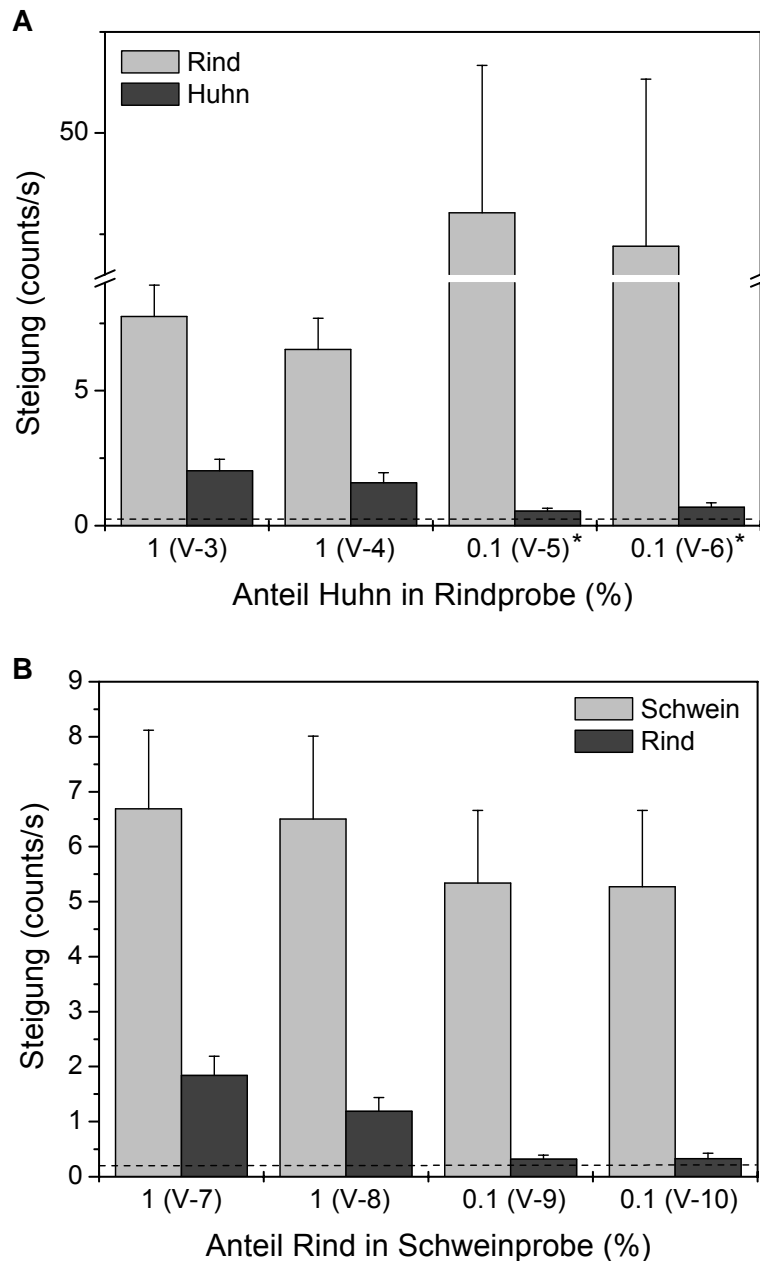


Abb. 90 Nachweis geringer Anteile von Huhn in Rindfleisch (A) sowie von Rind in Schweinefleisch (B) durch Analyse der PCR-Produkte im DNA-Sensorchip

Je Messung wurden 4 μ l PCR-Produkt hybridisiert (*: 25 μ l). Sonden: Rind684, Huhn684 und Schwein566. Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung über je $n = 3$ Sondenspots in einer Messung. - - - - : Schwellenwert 0.2 counts/s.

Die Ergebnisse für die Messungen mit je 25 μ l der Proben V-5 und V-6 demonstrieren den großen dynamischen Bereich der Detektionsmethode über fast zwei Dekaden mit Signalen von 0.54 bzw. 0.68 counts/s für die Huhn-684- und 46.05 bzw. 44.40 counts/s für die Rind-684-Sonde (Abb. 90 A). Dabei beruhen auch die sehr großen Signalsteigungen für die Sonde Rind684 ausschließlich auf streng linearen Signalverläufen. Wie schon bei der Analyse der Mischungen auf *Template*-DNA-Basis im Sensorchip (vgl. 5.2.3.8) konnte außerdem gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Nachweismethode trotz der PCR zumindest immer

semi-quantitative Aussagen über die Probenzusammensetzung lieferten. So lagen bei einem Standardvolumen von 4 µl PCR-Produkt die Signalsteigungen für die Hauptbestandteile der Proben in der Regel im Bereich von 6-8 counts/s, während für die Nebenbestandteile immer nur Signale von ≤ 2 counts/s erreicht wurden.

Auch in Probe V-2 konnte der 5%ige Anteil von Kuhmilch in Ziegenfeta eindeutig nachgewiesen werden. Dabei wurde das Ergebnis der konventionellen Chiphybridisierung bestätigt, gemäß dem die Nachweisgrenze für diese Probe etwas schlechter war, weil das Signal von 0.77 counts/s für die Rind684-Sonde bereits in der Nähe der Nachweisgrenze lag (Daten nicht gezeigt).

Bei Auswertung aller für die Proben aus Tab. 3 detektierten Signalsteigungen wurde immer die für die jeweilige Probenzusammensetzung typische Kreuzhybridisierung beobachtet (vgl. 5.2.3.1). Bei Analyse der Proben V-1 und V-2 aus Ziegenfeta trat wie erwartet auch eine deutliche Anbindung an der Schaf566-Sonde auf, die auf das kreuzhybridisierende Ziege-PCR-Produkt zurückzuführen war, während die Anwesenheit von Schaf in der Probe aufgrund der fehlenden Anbindung an der Schaf684-Sonde ausgeschlossen werden konnte. Kreuzhybridisierung wurde außerdem mit allen Proben außer V-5 und V-6 an der Rind684anti-Sonde erhalten, die sich in allen Fällen erklären ließ entweder durch die bekannte unspezifische Hybridisierung von Schwein- bzw. Ziege-PCR-Produkt oder durch das Heteroduplexphänomen bei Anwesenheit von Rind in Mischung mit einer ausreichend konzentrierten anderen Komponente.

Durch den parallelen Nachweis verschiedener Spezies in Mischproben auch in geringen Anteilen von bis zu 0.1 % hatte sich die Analyse der PCR-Produkte durch Realzeit-Hybridisierung im DNA-Sensorchip als geeignet erwiesen für die Bearbeitung praxisrelevanter Fragestellungen und sollte im weiteren Verlauf zur Analyse von Realproben eingesetzt werden.

5.2.3.10 Analyse der Realproben

Abschließend wurden die PCR-Produkte der DNA-Extrakte typischer Realproben aus dem Routinebetrieb des CVUA Münster (Tab. 4) durch Hybridisierung im DNA-Sensorchip analysiert, nachdem diese zuvor bereits konventionell unter dem Deckgläschen hybridisiert worden waren (vgl. 5.2.2.10). Wenn nicht anders vermerkt, wurden bei der Messung in Realzeit von jeder Probe einmal 4 µl hybridisiert, wobei aufgrund der Regenerierbarkeit der Sensorchips für die gesamten 26 Proben nur zwei Sensorchips verbraucht wurden.

Unter Berücksichtigung der in 5.2.3.1 beschriebenen Kreuzhybridisierung von Schwein-PCR-Produkt mit der Ziege684-Sonde konnten in den Proben P-1 bis P-10 sowie P-23 und P-26 mit jeweils nur einer enthaltenen Spezies alle diese eindeutig identifiziert werden. Bei Analyse der vier Huhn-Proben P-1 bis P-4 mit vergleichbaren Konzentrationen der DNA-

Extrakte lagen die Signalsteigungen für die Huhn684-Sonde alle im Bereich zwischen 13.44 und 16.33 counts/s (Abb. 91 B). Durch Bildung des Mittelwertes über die $n = 3$ Sondenspots im Array ergab sich ohne Korrektur des Ausleuchtungsprofils bei jeder Messung ein Variationskoeffizient von 18 %, womit sich die gute Reproduzierbarkeit der Methode bestätigte.

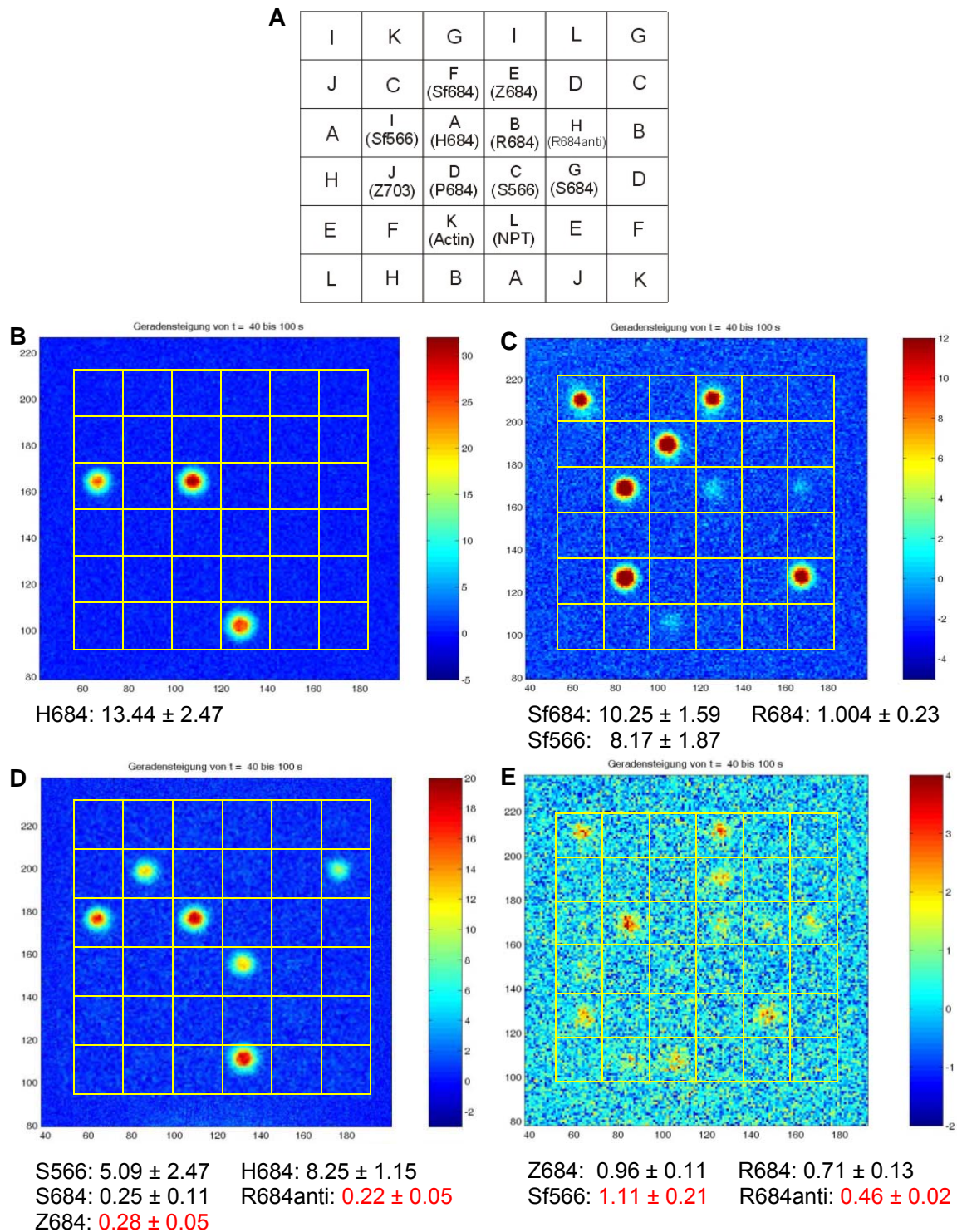


Abb. 91 Analyse verschiedener Realproben-PCR-Produkte im DNA-Sensorchip

Je Messung wurden 4 μ l PCR-Produkt hybridisiert. Dargestellt sind die Steigungsbilder im Bereich 40-100 s. **A:** Sondenbelegung, **B:** Probe P-1 (H), **C:** Probe P-11 (Sf+R), **D:** Probe P-14 (S+H), **E:** Probe P-20 (Z+R). Steigungswerte in counts/s angegeben, bestimmt durch MW-Auswertung über $n = 3$ Spots, Werte < 0.2 counts/s nicht angegeben. Rot: bekannte Kreuzhybridisierung.

Für die Pute-Probe P-5 wurde dagegen eine deutlich schwächere Signalsteigung von nur 1.92 ± 0.25 counts/s mit der Pute684-Sonde erhalten, was auf die im Verhältnis geringere DNA-Konzentration der Probe sowie die schlechtere Hybridisierungseffizienz im Vergleich zu Huhn zurückzuführen ist. Analog zu den Huhn-Proben wurden auch für die vier Schweinhaltigen Proben sehr ähnliche Ergebnisse erhalten (Daten nicht gezeigt).

Bei Analyse der aus mehreren Spezies zusammengesetzten Fleischproben P-11 bis P-17 sowie P-23 bis P-26 zeigten wie schon bei der konventionellen Chiphybridisierung (vgl. 5.2.2.10) nahezu alle Ergebnisse eine Übereinstimmung zur Referenzanalytik. Exemplarisch sind die Analyseergebnisse für eine Lambratwurst (P-11) und ein Hot Dog (P-14) in Abb. 91 C+D sowie für Leberwurst A (P-25) in Abb. 92 gezeigt. Die Messwerte für den Nachweis von Rind neben Schaf in der Lambratwurst belegen dabei die semi-quantitative Aussage der Nachweismethode, weil für Schaf als Hauptbestandteil ein intensives Signal von 10.25 ± 1.59 counts/s erhalten wurde, während Rind als Nebenbestandteil ein deutlich geringeres Signal von 1.00 ± 0.23 counts/s ergab. Auch der Nachweis von drei oder vier verschiedenen Spezies in einer Probe war durch die Hybridisierung im Sensorchip möglich, so konnten in der Brühwurst B (P-24) mit 8 μ l des schwach konzentrierten PCR-Produktes Schwein, Rind, Huhn und Pute bestimmt werden (Daten nicht gezeigt), wobei die Signalintensitäten für die Sonden der verschiedenen Spezies in diesem Fall in relativ guter Übereinstimmung standen mit der Probenzusammensetzung (vgl. 5.2.2.10). Wie bei der konventionellen Chiphybridisierung konnte in der Leberwurst A (P-25) Schwein als Hauptbestandteil neben Beimengungen von Puten- und Kalbsfleisch bestätigt werden (Abb. 92).

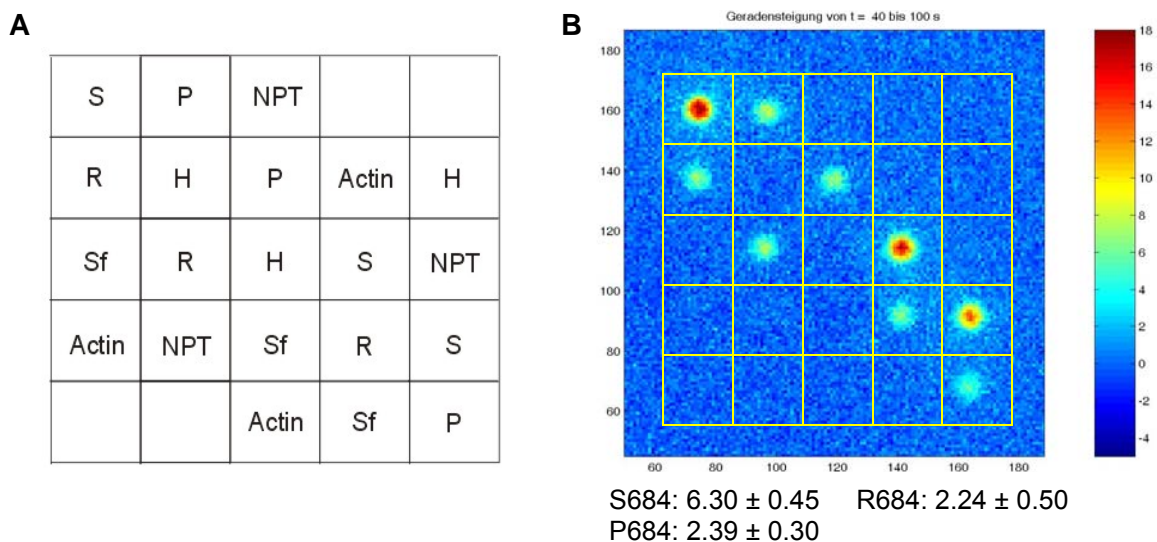


Abb. 92 Nachweis von Schwein, Rind und Pute in der Leberwurst A (P-25) durch Hybridisierungsanalyse des 377bp-cytb-PCR-Produktes im DNA-Sensorchip

A: Sondenbelegung (S: S684, P: Pute684, R: R684, H: H684, Sf: Sf684, Actin: Actin-45-0mm, NPT: NPT1-18-0mm), **B:** Es wurden 8 μ l PCR-Produkt hybridisiert, ein Nachweis aller Spezies wäre aber auch noch mit 4 μ l PCR-Produkt möglich gewesen (analog bei P-24). Steigungsbild im Bereich 40-100 s. Steigungswerte in counts/s angegeben, bestimmt durch MW-Auswertung über $n = 3$ Spots, Werte < 0.2 counts/s nicht angegeben. Intensives Signal auch auf der nicht-optimierten S684-Sonde. Die S566-Sonde war in diesem Array noch nicht integriert.

Auch bei Analyse der fünf Käseproben P-18 bis P-22 ergab sich insgesamt eine gute Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Referenzanalytik. Abb. 91 E zeigt, dass z.B. in dem Ziegenkäse P-20 neben Ziege auch Rind identifiziert wurde. Wie erwartet trat dabei auch eine Anbindung von Ziege an der Schaf566-Sonde auf. Die größere Unschärfe des Falschfarbenbildes im Vergleich zu den anderen Steigungsbildern in Abb. 91 ergab sich dadurch, dass insgesamt kleinere Steigungen beobachtet wurden und die Skalierung deshalb nur einen kleineren Bereich umfasste, wodurch das Signalrauschen deutlicher hervortrat. Die in der Regel geringeren Signalintensitäten bei der Analyse von Käseproben sind wie bereits erwähnt auf die durch die komplexe Probenmatrix eingeschränkte PCR-Effizienz zurückzuführen (vgl. 5.2.1.7 und 5.2.2.9). Für Ziege ergab sich zusätzlich eine im Vergleich zu den anderen Spezies etwas schlechtere PCR-Effizienz (vgl. 5.2.1.5).

Beim Nachweis von Ziegenanteilen in dem Schafskäse, aus dem die DNA-Extrakte P-21 und P-22 gewonnen worden waren, lieferte die Analyse der PCR-Produkte durch Realzeit-Hybridisierung ein eindeutigeres Ergebnis als die Referenzanalytik und die konventionelle Chip-hybridisierung. Zwar mussten zur endgültigen Identifikation von Ziege in beiden Proben jeweils die PCR-Produkt-Volumina vergrößert werden, aber so wurden schließlich in dem ersten Extrakt (P-21) mit 25 µl PCR-Produkt ein Ziege684-Signal von 0.36 ± 0.11 counts/s und in dem zweiten Extrakt P-22 mit 10 µl ein Z684-Signal von 0.23 ± 0.14 counts/s detektiert. Der Vorteil gegenüber der konventionellen Chiphybridisierung ergab sich hier dadurch, dass keine Kreuzhybridisierung von Schaf auf der Ziege684-Sonde auftrat (vgl. 5.2.2.10).

Die bei Hybridisierung der Realproben-PCR-Produkte im Sensorchip aufgetretenen Signale auf der Rind684anti-Sonde (Abb. 91 D+E) ließen sich in nahezu allen Fällen auf die Kreuzhybridisierung durch Schwein und Ziege oder auf das Heteroduplexphänomen von Rind in Mischung mit anderen Spezies zurückführen, konnten allerdings für die eigentliche Bestimmung der verschiedenen Spezies ohnehin vernachlässigt werden.

Die einzigen problematischen Fälle stellten wie bereits bei der Hybridisierung unter dem Deckgläschen die Proben P-15 und P-18 dar (Tab. 17). In der Fleischwurst P-15 konnte auch nach Vergrößerung des PCR-Produkt-Volumens auf der Sonde Pute684 kein Signal oberhalb des Hintergrundrauschens detektiert werden. Analog wurde im Schafskäse P-18 auch mit viel PCR-Produkt kein erhöhtes Signal auf der Ziege684-Sonde, dagegen aber eine intensive Anbindung an beiden Schafsonden beobachtet. Die Ursachen für diese bei beiden Chipmethoden vom erwarteten Ergebnis abweichenden Beobachtungen lagen daher wahrscheinlich im ersten Fall bei der deutlich höheren Sensitivität der tierartspezifischen PCR sowie dem Ergebnis der Referenzanalytik an sich im Fall von Probe P-18 (vgl. 5.2.2.10).

Die insgesamt sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse bei der Analyse der cytb-PCR-Produkte im DNA-Sensorchip mit den Ergebnissen der Referenzanalytik zeigt die Zusammenfassung für alle untersuchten Realproben in Tab. 17.

Tab. 17 Analyse der Realproben-PCR-Produkte im DNA-Sensorchip

A: Referenzanalytik des CVUA Münster, B: Realzeit-Hybridisierung, +: im Nachweis positiv, -: im Nachweis negativ, ?: keine eindeutige Aussage möglich. Felder ohne explizites Ergebnis: Spezies im ELISA negativ oder nicht getestet (A, vgl. 4.2.2) bzw. Spezies in Analyse negativ (B).

Probennummer	Bezeichnung	Methode	R	S	H	P	Sf	Z	µl	Übereinstimmung?	
P-1	Hähnchen-Döner	A:			+	-			4	ja	
		B:			+	-					
P-2	Hähnchen-Döner	A:			+	-			4	ja	
		B:			+	-					
P-3	Hähnchen-Döner	A:			+	-			4	ja	
		B:			+	-					
P-4	Döner-Kebap	A:			+	-			4	ja	
		B:			+	-					
P-5	Putenmedaillons	A:			-	+			4	ja	
		B:			-	+					
P-6	Mettwurst	A:		+					4	ja	
		B:		+							
P-7	Fleischwurst	A:		+					4	ja	
		B:		+							
P-8	Rostbratwurst	A:		+					4	ja	
		B:		+							
P-9	Würstchen	A:		+					4	ja	
		B:		+							
P-10	Döner Kebap	A:	+						4	ja	
		B:	+								
P-11	Lammbratwurst	A:	+					+	4	ja	
		B:	+					+			
P-12	Truthahnbrust gefüllt	A:			-	+			4	ja	
		B:			-	+					
P-13	Thüringer Mett vom Schwein	A:	+	+	-	-			4	ja	
		B:	+	+	-	-					
P-14	Hot Dog	A:	-	+	+	-			4	ja	
		B:	-	+	+	-					
P-15	Fleischwurst	A:	+	+	+	+			4	nein	
		B:	+	+	+	-					
P-16	Rostbratwurst	A:	-	+	-	+			4	ja	
		B:	-	+	-	+					
P-17	Putenbratwurst	A:	+	+	-	+			4	ja	
		B:	+	+	-	+					
P-18	Schafskäse	A:	+					-	+	4	nein
		B:	+					+	+		
P-19	Schafskäse	A:	+					-	-	4	ja
		B:	+					-	-		
P-20	Picodon	A:	+					-	+	4	ja
		B:	+					-	+		
P-21	Schafskäse (Extrakt a)	A:	+					+	+	25	B eindeutig
		B:	+					+	+		
P-22	Schafskäse (Extrakt b)	A:	+					+	+	10	B eindeutig
		B:	+					+	+		
P-23	Brühwurst A	A:		+					13	ja	
		B:		+							
P-24	Brühwurst B	A:	+	+	+	+			8	ja	
		B:	+	+	+	+					
P-25	Leberwurst A	A:	+	+	-	+			8	ja	
		B:	+	+	-	+					
P-26	Leberwurst B	A:		+					13	ja	
		B:		+							

5.3 Detektion von Mikroorganismen durch Realzeit-Hybridisierung

Die Vorteile bei der Hybridisierungsanalyse im DNA-Sensorchip sollten auch vor dem Hintergrund einer weiteren anwendungsorientierten Fragestellung verdeutlicht werden. Dazu sollte grundsätzlich der Nachweis sulfatreduzierender Prokaryonten mit einem in der Arbeitsgruppe von Prof. Schleifer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München) für die konventionelle Chip-hybridisierung entwickelten Sondenset vom SRP-PhyloChip auf den DNA-Sensorchip übertragen werden (vgl. 3.3.3). Das hierarchische Detektionsprinzip beruht auf der Amplifikation der 16S rRNA mit universellen, unmarkierten Primern und der anschließenden Markierung mit Hilfe von Dekanukleotid-*Random*-Primern und Cy5-dUTP, wodurch sich PCR-Produkte von variierender Größe und unterschiedlichem Markierungsgrad ergeben (Abb. 93). Diese werden durch Hybridisierung mit dem 132 Oligonukleotidsequenzen umfassenden Sonden-set charakterisiert, das nach dem Mehrfachsondenkonzept entwickelt wurde.

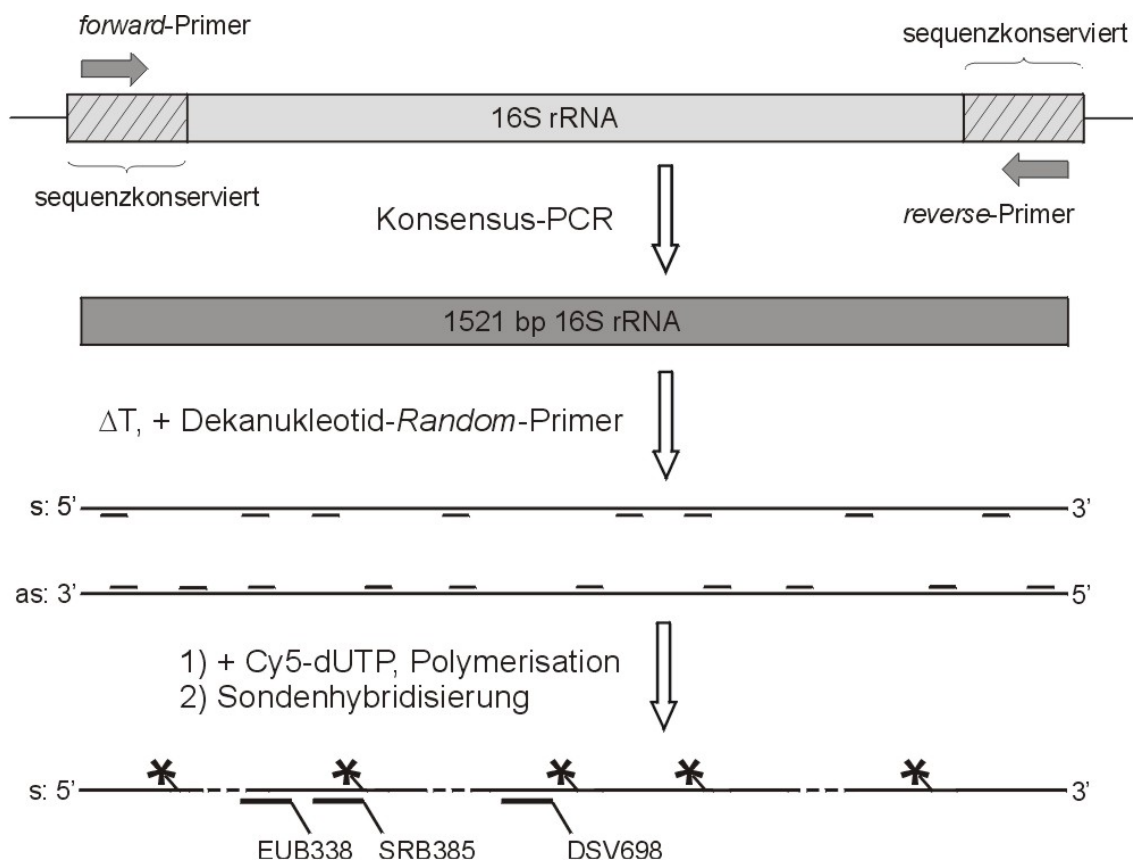


Abb. 93 Schema des Nachweises der sulfatreduzierenden Prokaryonten

Die gestrichelten Linien deuten an, dass die PCR-Produkte in unterschiedlichen Fragmentgrößen vorliegen. Für eine ausführlichere Beschreibung der PCR vgl. 4.3.2.2. Für Sequenzinformationen zu den Sonden EUB338, SRB3385 und DSV698 vgl. Anhang Tab. 24.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in grundlegenden Versuchen zur Charakterisierung der Fragestellung die Wechselwirkungen der nah verwandten Target- und Sondenoligonukleotide aus den Systemen *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* betrachtet

(vgl. Anhang Tab. 24). Die eingesetzten Sondensequenzen lagen dabei im Bereich der Positionen 385 und 698 der 16S rRNA und entsprechend konnte z.B. durch die Hybridisierung der pm-Targets Halop385-Cy5 und Halop698-Cy5 der Nachweis der Spezies *Dsv. halophilus* simuliert werden. Im Anschluss an die Hybridisierung der Oligonukleotid-Targets sollte die Tauglichkeit der Methode für die praktische Anwendung durch Hybridisierung von PCR-Produkten aus den entsprechenden Reinkulturen demonstriert werden.

5.3.1.1 Charakterisierung von CEL-Glasobjektträgern

Da sich die Aldehyd-aktivierten CSS-SilylatedTM-Glasobjektträger von CEL Associates (Pearland, USA) bei den Versuchen zur Mikroorganismen-Detektion durch konventionelle Chip-hybridisierung im Arbeitskreis von Prof. Schleifer (TU München) bewährt hatten [173], sollten sie auch für die Anwendung im Sensorsystem eingesetzt werden. Das evaneszente Feld ließ sich dabei unter gleichen Geräteeinstellungen wie für die Standard-Sigma-Objektträger erzeugen und auf den CEL-Objektträgern zeigten sich nach Hybridisierung des immobilisierten Sondenarrays Steigungsbilder ähnlicher Qualität mit homogenen Sondenspots (Abb. 94). Von allen in dieser Arbeit getesteten voraktivierten Glasobjektträgern gehörten die CEL-Produkte damit zu den wenigen, die im DNA-Sensorchip eingesetzt werden konnten (vgl. 5.1.1.6).

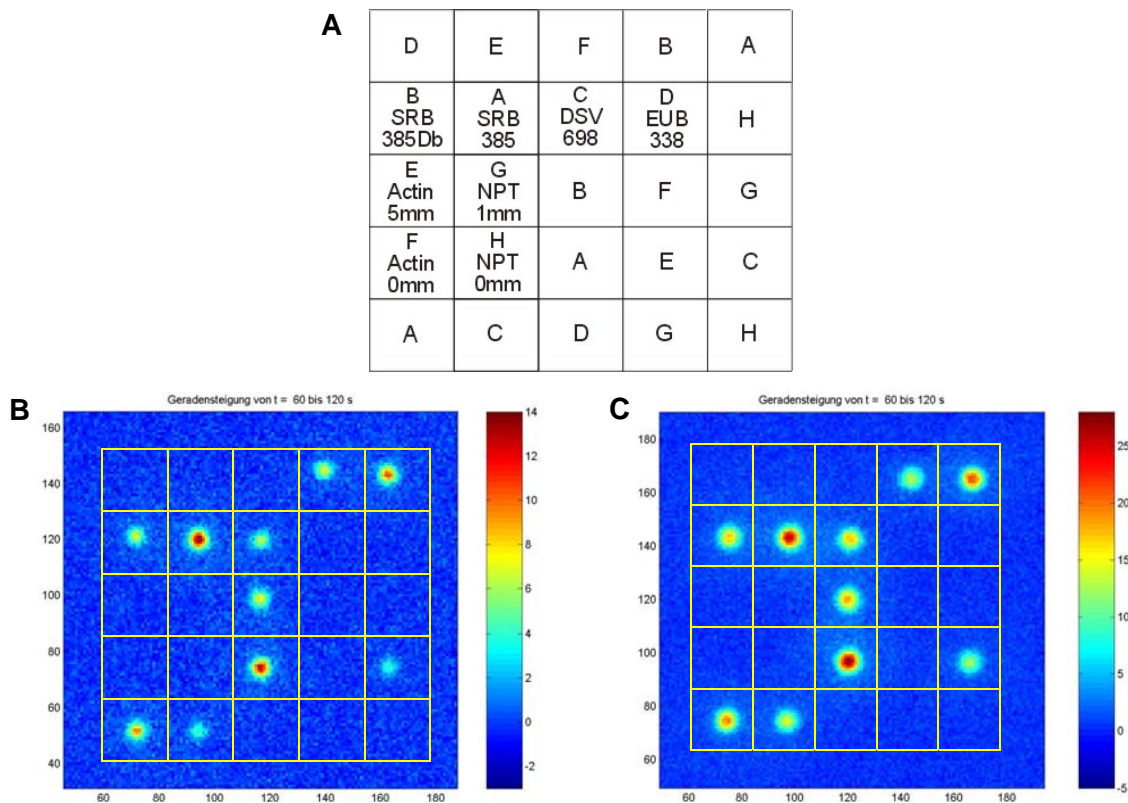


Abb. 94 Realzeit-Hybridisierung auf CEL-(B) und Standard-Sigma-Objektträgern (C)

A: Sondenbelegung, **B+C:** Steigungsbilder (60-120 s) nach Hybridisierung einer Targetlösung aus Halop385-Cy5- und Halop698-Cy5-Target (je 0.5 nM), Diskussion der Signalintensitäten in 5.3.1.2.

Bevor die CEL-Objektträger in weiteren Versuchen zur Mikroorganismen-Detektion eingesetzt werden konnten, mussten sie hinsichtlich verschiedener Eigenschaften ausführlicher mit den Standard-Sigma-Objektträgern verglichen werden. Bei wiederholter Hybridisierung nach vorangegangener Regeneration unter Standardbedingungen ergab sich über $n = 18$ Messungen auch für die CEL-Objektträger eine gute Arbeitsstabilität mit einer über $n = 5$ Spots gemittelten Drift von -0.10 ± 0.03 counts/s pro Messung ($< 1\%$ pro Messung), wobei der letzte Messwert im Mittel noch $79 \pm 4\%$ des ersten Wertes betrug (Daten nicht gezeigt). Über alle Messungen ergab sich ein Variationskoeffizient von $8.0 \pm 0.8\%$. Die Arbeitsstabilität der CEL-Objektträger war damit vergleichbar mit den Eigenschaften der Standard-Sigma-Objektträger, die eine Drift von -0.07 ± 0.01 counts/s pro Messung gezeigt hatten (vgl. 5.1.2.1).

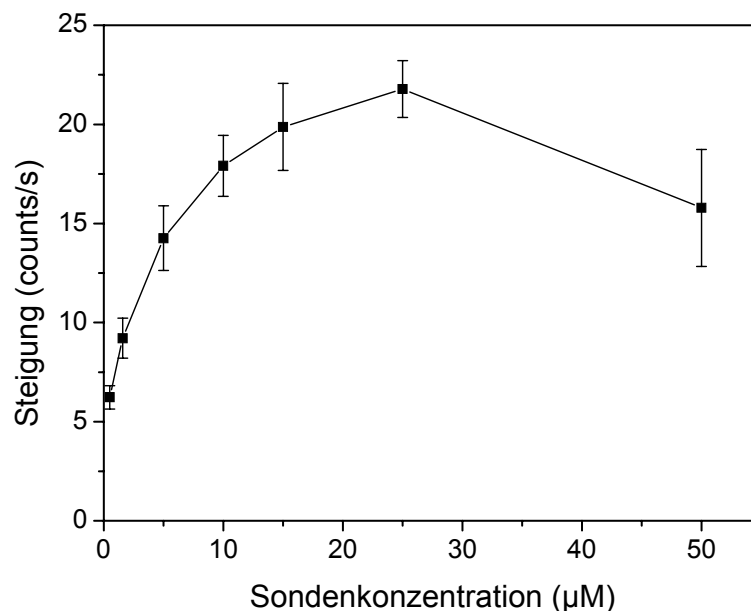


Abb. 95 Optimierung der Fangsondenkonzentration bei Immobilisierung auf CEL-Objektträgern

Sonde Actin-45-0mm, Target Actin-51-Cy5 0.5 nM, keine Ausleuchtungskorrektur, MAX-Auswertung über $n = 4$ Spots und $n = 3$ Messungen.

Die Optimierung der Sondenkonzentration bei Immobilisierung der aminomodifizierten Oligonukleotide auf den Aldehyd-aktivierten CEL-Objektträgern zeigte, dass das Sättigungsniveau der Signale im Gegensatz zu den sonst verwendeten Standard-Sigma-Objektträgern erst bei höheren Konzentrationen erreicht wurde. Zudem war bei einer weiteren Vergrößerung der Sondenkonzentration ein Hook-Effekt zu beobachten (Abb. 95). Als Kompromiss zwischen dem Signaloptimum und dem relativ großen Verbrauch der Sondenlösung wurde daher standardmäßig mit einer Sondenkonzentration von 20 µM gearbeitet. Ein Vergleich der bei identischen Dispensierparametern auf CEL- und Standard-Sigma-Objektträgern erhaltenen

Sondenspots zeigte, dass der Spotdurchmesser auf den CEL-Objektträgern mit ca. 180 μm um 20-30 % kleiner war als auf den Standard-Sigma-Objektträgern.

Sowohl bezüglich der Eigenfluoreszenz als auch hinsichtlich der unspezifischen Hintergrundanbindung wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Standard-Sigma- und CEL-Objektträgern nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Durch die Kalibration des 38mer-Oligonukleotid-Targets Asphe-385-Cy5 auf der perfekt komplementären SRB385Db-Sonde konnte demonstriert werden, dass die Sensitivität des Nachweises auf den CEL-Objektträgern etwa 50 % geringer war als auf den Standard-Sigma-Objektträgern (Abb. 96). Während auf dem Sigma-Objektträger eine Sensitivität von 10.3 ± 0.4 counts/(s*nM) bei einer Nachweisgrenze von 19 pM erreicht wurde, lag die Nachweisgrenze auf dem CEL-Objektträger bei 37 pM mit einer Sensitivität von 4.4 ± 0.1 counts/(s*nM). Ein analoges Ergebnis wurde für die Kalibration des Halop385-Targets auf der pm-Sonde SRB385 erhalten.

In allen weiteren Versuchen zur Mikroorganismen-Detektion wurden sowohl CEL- als auch Standard-Sigma-Objektträger eingesetzt, da die CEL-Objektträger zunächst nur in beschränkter Stückzahl zur Verfügung standen.

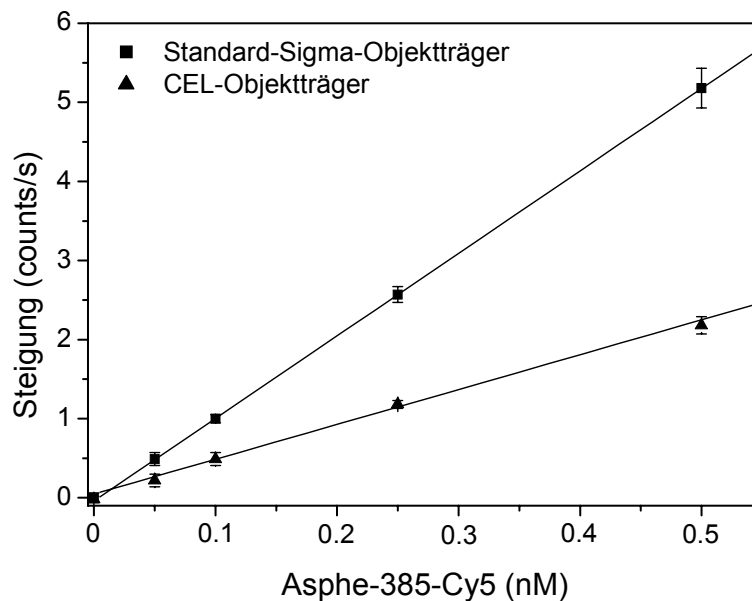


Abb. 96 Kalibration für das Asphe-385-Cy5-Target auf Standard-Sigma- und CEL-Objektträgern

Sonde: SRB385Db, keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung eines Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über $n = 3$ Messungen.

5.3.1.2 Sondenspezifität bei Standardbedingungen

Um die Spezifität des Nachweises der drei verschiedenen Spezies *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* mit den zur Verfügung stehenden Sonden SRB385,

SRB385DB und DSV698 abzuschätzen, wurden zunächst unter Standardbedingungen bei RT und 50 % FA im Hybridisierungspuffer in separaten Messungen für die verschiedenen Spezies jeweils die beiden Targetsequenzen der Positionen 385 und 698 in Mischung hybridisiert. Dadurch wurde die Situation bei Messung einer markierten Realprobe von einer definierten bakteriellen Spezies simuliert (vgl. Abb. 93). Abb. 94 zeigt exemplarisch das Ergebnis nach der Hybridisierung einer Mischung aus Halop385-Cy5- und Halop698-Cy5-Target. Die Sonden EUB338, Actin-45-0mm, Actin-45-5mm, NPT1-18-0mm und NPT1-18-1mm waren in diesem Fall als Negativsonden immobilisiert worden und wiesen auch keine Signale auf. Die Ergebnisse für die Analyse der verschiedenen Targetsequenzen der drei Spezies sind zusammenfassend in Abb. 97 dargestellt.

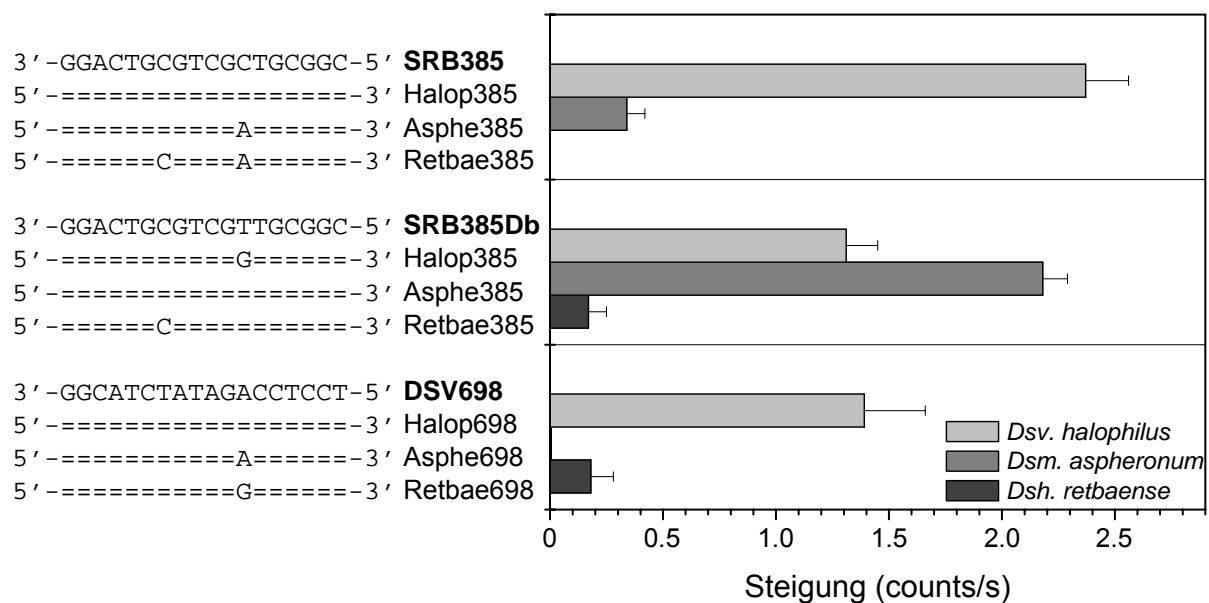


Abb. 97 Spezifität der Sonden SRB385, SRB385Db und DSV698 beim Nachweis der Targetsequenzen aus *Dsv. halophilus*, *Dsm. asperonum* und *Dsh. retbaense*

Hybridisierung der Cy5-markierten 38mer-Oligonukleotid-Targetsequenzen (je 0.5 nM) auf den verschiedenen Sondensequenzen (fett gedruckt) bei Standardbedingungen, speziespezifische Targets jeweils in Mischung. CEL-Objekträger, keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung eines Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über n = 3 Messungen.

Für die Hybridisierung der Targets Halop385-Cy5 und Asphe385-Cy5 mit den jeweils perfekt komplementären Sonden SRB385 bzw. SRB385Db wurden nahezu gleich große Signalsteigerungen detektiert, was auf die große Ähnlichkeit beider 18mer-Hybridisierungssequenzen mit nur einer unterschiedlichen Basenpaarung zurückzuführen ist. Bei der pm-Hybridisierung des Halop698-Cy5-Targets mit der DSV698-Sonde wurde dagegen ein deutlich geringeres Signal erhalten, wobei die Hybridisierungssequenz hier mit 50 % einen deutlich geringeren GC-Gehalt aufwies als das Halophilus-Target mit 78 % und das Asperonum-Target mit 70 %. Die Diskriminierung von einem bzw. zwei mismatches in der Hybridisierungssequenz war an der SRB385- sowie an der DSV698-Sonde deutlich erkennbar, so wurden bei Hybridisierung der mismatch-Targets gar keine Anbindung oder z.B. für das Asphe385-Cy5-

Target an der SRB385-Sonde nur noch 14 % des pm-Halop385-Cy5-Signals detektiert. Die verschiedenen Basenfehlpaarungen wirkten sich also nicht ganz einheitlich auf die Hybridisierungseffizienz aus. Das zeigten auch die Signale für die SRB385Db-Sonde. Dort wurde der mismatch des Retbae385-Cy5-Targets im Verhältnis zum pm-Asphe385-Cy5-Target zwar ebenfalls eindeutig nachgewiesen, die zentrale Basenfehlpaarung des Halop385-Cy5-Targets führte allerdings nur zu einem Signalverlust von 45 % gegenüber der pm-Hybridisierung. Der nur hier vorliegende G-T-mismatch wurde also im Gegensatz zu den anderen aufgetretenen Basenfehlpaarungen relativ gut toleriert. Die Hybridisierung des Halop385-Cy5-Targets mit der SRB385Db-Sonde wird auch in Abb. 94 deutlich.

5.3.1.3 Variation des Formamidanteils im Hybridisierungspuffer

Die Spezifität der Hybridisierung ist abhängig von den gewählten Stringenzbedingungen, die im Wesentlichen beeinflusst werden können durch die Temperatur und den Formamidanteil im Hybridisierungspuffer (vgl. 3.1.1.3). Um die Wechselwirkungen der *Dsv. halophilus*-Targets Halop385-Cy5 und Halop698-Cy5 mit dem immobilisierten Sondenset näher zu charakterisieren und eventuell eine bessere Diskriminierung des GT-mismatches zwischen dem Halop385-Cy5-Target und der SRB385Db-Sonde (vgl. 5.3.1.2) zu erreichen, wurde deshalb zunächst bei RT der Formamidgehalt des Hybridisierungspuffers variiert (Abb. 98). Dabei zeigte sich interessanterweise für die Wechselwirkung des Halop385-Cy5-Targets sowohl mit der pm- als auch mit der 1mm-Sonde bei steigendem Formamidgehalt zunächst ein Anstieg der Signalintensität. Dieser aktivierende Einfluss von Formamid auf die Hybridisierungseffizienz bei der Analyse im DNA-Sensorchip wurde bereits früher für andere Sequenzen beobachtet [79,181]. Während bei Formamidgehalten von ≤ 40 % keine Differenzierung zwischen pm- und 1mm-Hybridisierung des Halop385-Cy5-Targets möglich war und die Hybridisierungseffizienz für beide Systeme deutlich zurückging, konnte der G-T-mismatch bei höheren Formamidanteilen zunehmend diskriminiert werden, weil z.B. bei einem Anteil von 60 % das Optimum der 1mm-Hybridisierung bereits deutlich überschritten und gleichzeitig die Anbindung an der pm-SRB385-Sonde bei RT trotz des erniedrigten Schmelzpunktes noch nicht beeinträchtigt war.

Für die Hybridisierung des Halop698-Cy5-Targets mit der DSV698-Sonde wurde dagegen im Vergleich zum Halop385-System der typischerweise bei der Bestimmung von Schmelzkurven beobachtete Signalabfall erhalten, weil sich für diese Wechselwirkung aufgrund des geringeren GC-Gehaltes ein niedrigerer T_m -Wert ergab, so dass das Optimum der Hybridisierungseffizienz bei Standardbedingungen (50 % FA) bereits überschritten war. Bei einem Formamidgehalt von 60 % im Hybridisierungspuffer lag die Schmelztemperatur des Systems schließlich sogar unterhalb von RT, so dass gar keine Anbindung mehr zu beobachten war. Die Tatsache, dass andererseits die Signalsteigungen für das Halop698-Cy5-Target unter

weniger stringenten Bedingungen deutlich höher waren als für das Halop385-System, zeigte, dass die Schmelztemperatur alleine keine Rückschlüsse auf die Hybridisierungseffizienz erlaubt, vielmehr haben auch andere Faktoren wie z.B. die Bildung von Sekundärstrukturen einen Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften einer Hybridisierungssequenz.

Ein analoger Versuch zum Vergleich der Bindungsstärken der Targets Halop698-Cy5 und Asphe698-Cy5 mit der DSV698-Sonde bei verschiedenen Formamidkonzentrationen im Puffer zeigte, dass die Diskriminierung des A-A-mismatches bei Anbindung des Asphe698-Cy5-Targets von $\ll 10\%$ des Halop698-Signals bei Standardbedingungen (vgl. Abb. 97) auf bis zu $> 90\%$ Kreuzhybridisierung zunahm durch Verringerung des Formamidgehaltes auf 30% (Daten nicht gezeigt).

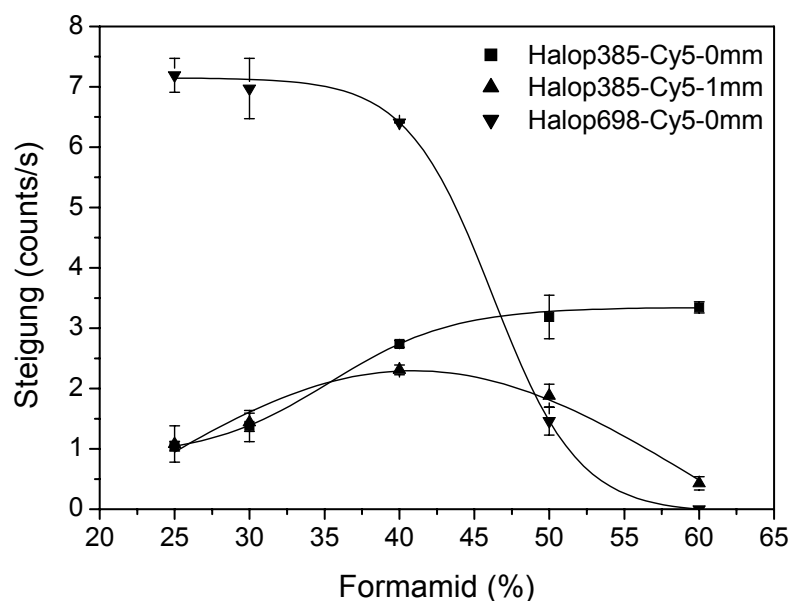


Abb. 98 Auswirkung der Variation des Formamidanteils bei konstanter Temperatur auf die Hybridisierungseffizienz der *Dsv. halophilus*-Targets

Sonden: SRB385, SRB385Db und DSV698, Targets in Mischung je 1 nM, Formamidanteil (% (v/v)) im Hybridisierungspuffer bei sonst konstanter Zusammensetzung angegeben. CEL-Objektträger, Messungen bei RT (21°C), keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung eines Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über $n = 2$ Messungen.

5.3.1.4 Variation des Formamidanteils bei verschiedenen Temperaturen

Die Stringenzabhängigkeit der Signalstärken bei Hybridisierung der *Dsv. halophilus*-Targets wurde zusätzlich auch durch Variation der Temperatur untersucht. Das in Abb. 98 für RT beschriebene Experiment wurde dazu auch bei 34 und 40°C durchgeführt. In Abb. 99 sind die Ergebnisse für die drei verschiedenen Sonden SRB385, SRB385Db und DSV698 separat dargestellt. In allen drei Fällen wurde deutlich, dass sich das Hybridisierungsoptimum mit steigender Temperatur zu geringeren Formamidanteilen verschob.

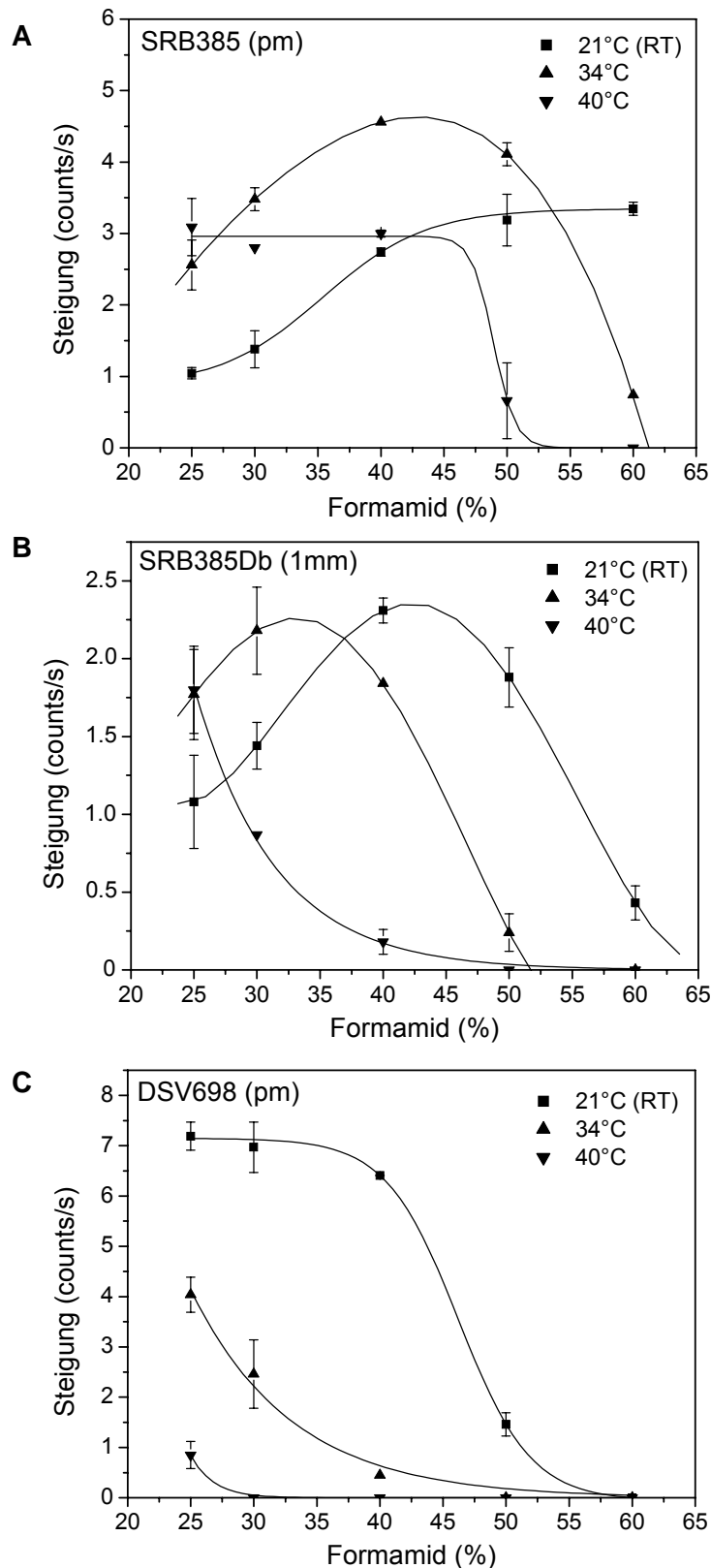


Abb. 99 Auswirkung der Stringenzvariation auf die Hybridisierung der *Dsv. halophilus*-Targets mit verschiedenen Sondensequenzen

A: Halop385-Cy5 mit Sonde SRB385 (pm), **B:** Halop385-Cy5 mit Sonde SRB385Db (1mm), **C:** Halop698-Cy5 mit Sonde DSV698 (pm). Hybridisierung der Targets in Mischung je 1 nM, Formamidanteil (% (v/v)) im Hybridisierungspuffer bei sonst konstanter Zusammensetzung angegeben. Messungen bei 21, 34 bzw. 40°C jeweils auf demselben, insgesamt also auf drei verschiedenen CEL-Objektträgern. Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung eines Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über $n = 2$ Messungen.

Für die pm-Anbindung des Halop385-Cy5-Targets an der SRB385-Sonde zeigte sich z.B., dass bei einem Formamidgehalt von 60 % der T_m -Wert des Systems zwischen 21 und 34°C lag, da bei 34°C bereits ein deutlicher Signalrückgang bis hin zum vollständigen Ausbleiben des Signals bei 40°C zu beobachten war (Abb. 99 A). Ein Vergleich der Signalsteigungen des Halop385-Cy5-Targets an der pm-SRB385- sowie der 1mm-SRB385Db-Sonde bei den unterschiedlichen Bedingungen zeigte, dass für eine ausreichende Diskriminierung des G-T-mismatches bei verschiedenen Temperaturen der Formamidgehalt des Puffers angepasst werden muss. Während die Kreuzhybridisierung bei 21°C und 60 % FA bei 13 % lag (Abb. 98), wurde nämlich eine Kreuzhybridisierung in ähnlicher Größenordnung von je 6 % bei 34°C und 50 % FA sowie 40°C und 40 % FA beobachtet. Auf Grundlage der zahlreichen bei der Stringenzvariation gewonnenen Daten können die Hybridisierungsbedingungen für eine optimale pm/mm-Differenzierung dementsprechend beliebig angepasst werden.

Das Verhalten des Halop698-Cy5-Targets bei der Hybridisierung mit der DSV698-Sonde (Abb. 99 C) bestätigte wiederum den im Vergleich zum Halop385-System deutlich niedrigeren Schmelzpunkt (vgl. 5.3.1.3), so konnten nur bei 21°C und geringem Formamidgehalt maximale Signale beobachtet werden, während bei 34°C und einem Formamidanteil von 25 % schon ein Rückgang der Hybridisierungseffizienz durch eine Annäherung des T_m -Wertes auftrat. Entsprechend hätten bei 34 und 40°C in diesem Fall noch geringere Formamidanteile gewählt werden müssen, um hohe Signale zu erhalten.

Abweichungen zwischen den Signalintensitäten der Hybridisierungsoptima bei den verschiedenen Temperaturen, wie z.B. in Abb. 99 A, können sich zum einen dadurch ergeben haben, dass die Messungen auf unterschiedlichen Objektträgern durchgeführt wurden. Zum anderen liegt bei jeder Hybridisierung eine Kombination aus aktivierenden und hemmenden Wechselwirkungen vor, so dass unterschiedliche Ergebnisse bei den verschiedenen Stringenzbedingungen grundsätzlich möglich sind.

5.3.1.5 Stringentes Waschen zur mismatch-Diskriminierung

Die bisherigen Ergebnisse zur Detektion der Targetsequenzen von *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* in der Assoziationsphase haben gezeigt, dass aufgrund der nicht optimal aufeinander abgestimmten Hybridisierungseigenschaften der Sonden ein Kompromiss gefunden werden musste zwischen hoher Signalintensität (Sensitivität) und Spezifität. Diese Tatsache gilt umso mehr für die geplante Analyse einer noch größeren Zahl unterschiedlicher SRP-Referenzorganismen durch Hybridisierung im DNA-Biosensor mit dem an der TU München entwickelten Sondenstet (vgl. 3.3.3). Um die dabei auftretenden Kreuzhybridisierungen zu identifizieren und eine eindeutige Charakterisierung der analysierten Probe zu gewährleisten, ermöglicht das Sensorsystem die Durchführung eines stringenten Waschschrittes im Anschluss an die Assoziationsphase. Im Gegensatz zur Beobachtung

des Dissoziationsverlaufes im Rahmen der Messungen zur Bestimmung der kinetischen Konstanten (vgl. 5.1.4) wurde dafür die Assoziation weiterhin bei hoher Sondenkonzentration verfolgt, woraufhin die Dissoziation in direktem Anschluss in Hybridisierungspuffer mit einem größeren Formamidanteil als bei der Assoziation und entsprechend höherer Stringenz beobachtet wurde.

Für die Anbindung der Targets Halop385-Cy5 und Halop698-Cy5 an den Sonden SRB385, SRB385Db und DSV698 konnte z.B. bei RT demonstriert werden, dass nach Assoziation in Puffer mit 40 % FA – also Bedingungen, die auch eine effiziente Hybridisierung des Halop698-Cy5-Targets erlauben – durch einen stringenten Waschschrift in 60%igem FA-Puffer eine Differenzierung zwischen der pm-Hybridisierung an der SRB385-Sonde und dem G-T-mismatch an der SRB385Db-Sonde möglich wurde (Abb. 100). Während das SRB385-Signal nur geringfügig schwächer wurde, nahm das SRB385Db-Signal sofort deutlich ab. Dabei wurde nur ein Niveau knapp oberhalb des Ausgangswertes vor der Assoziation erreicht, weil unter den vorliegenden Bedingungen noch keine vollständige Denaturierung stattfand. Wie nach Abb. 99 C erwartet, wurde das Halop698-Cy5-Target durch die Stringenzerhöhung vollständig abgelöst.

- A:** 3' -GGACTGCGTCGCTGCGGC-5' SRB385
5' ------3' Halop385-Cy5
- B:** 3' -GGACTGCGTCGTTGCGGC-5' SRB385Db
5' ------G-----3' Halop385-Cy5
- C:** 3' -GGCATCTATAGACCTCCT-5' DSV698
5' ------3' Halop698-Cy5

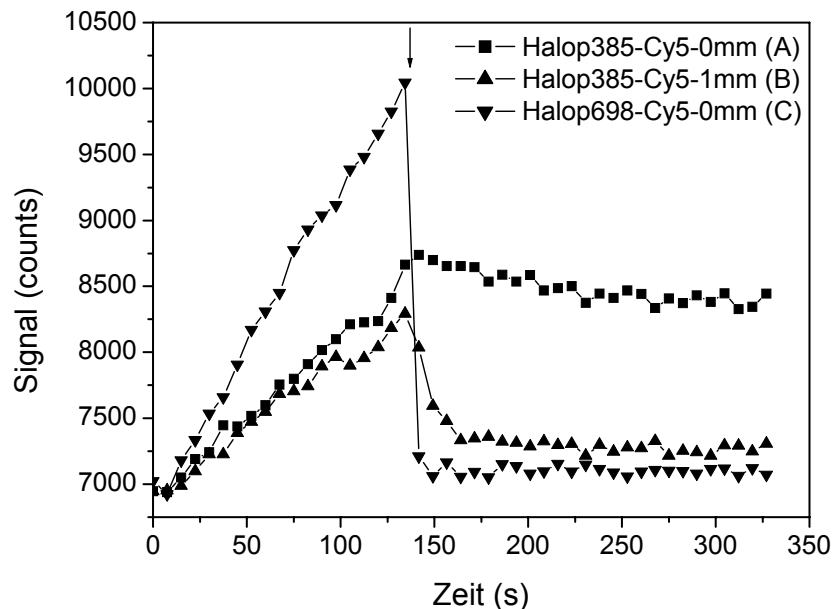


Abb. 100 Auswirkung eines stringenten Waschschriftes auf die Wechselwirkungen der *Dsv. halophilus*-Targets mit den Sonden SRB385 (A), SRB385Db (B) und DSV698 (C)

Hybridisierung der Targets Halop385-Cy5 und Halop698-Cy5 in Mischung (je 1 nM) in 40%igem FA-Puffer. ↓ = Beginn der Dissoziation in reinem, 60%igem FA-Puffer. CEL-Objektträger, Messungen bei RT (21°C). Aufgetragen ist jeweils der Signalverlauf auf dem intensivsten Pixel innerhalb des Sonden-spots.

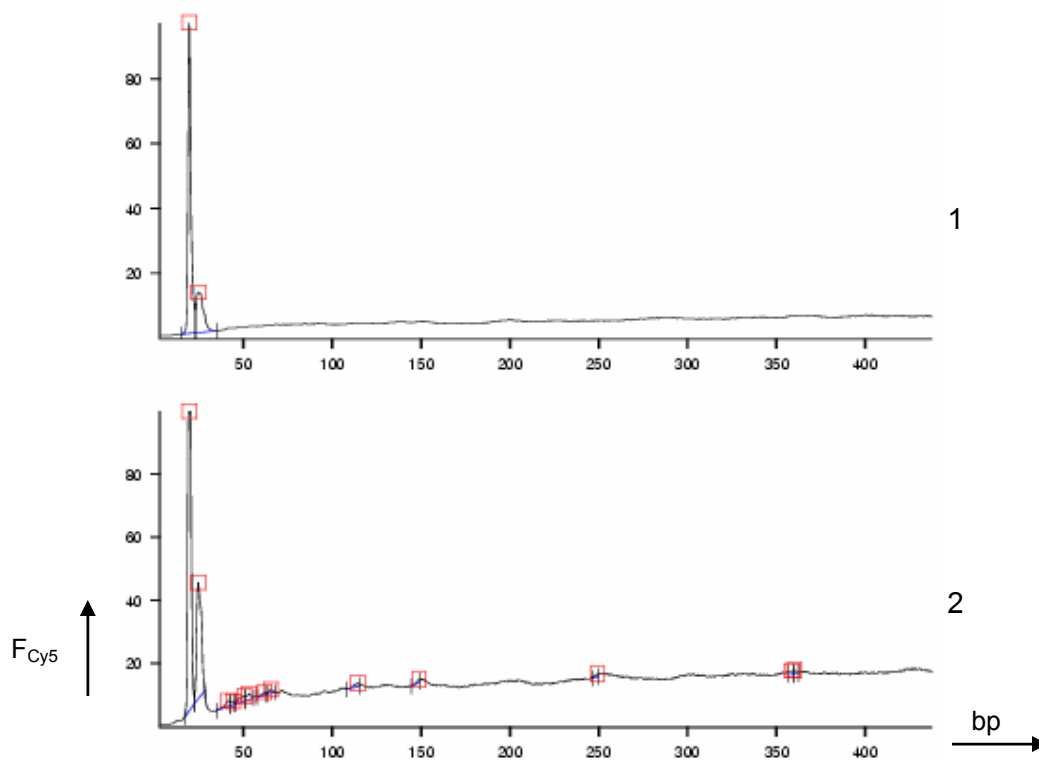
Die Tauglichkeit des stringenten Waschschrittes zur mm-Differenzierung konnte auch bei höheren Temperaturen und entsprechend verringerten Formamidgehalten des Puffers verdeutlicht werden (Daten nicht gezeigt).

5.3.1.6 Analyse von PCR-Produkten

Für den nächsten Schritt im Rahmen der Evaluierung des Realzeit-Konzeptes zur Mikroorganismen-Detektion standen die nach der *Random-Primer*-Methode markierten PCR-Produkte der 16S rRNA (vgl. Abb. 93) zur Verfügung.

i) Charakterisierung der PCR-Produkte am ALFexpress™ Analysesystem

Die Analyse der PCR-Produkte aus den drei verschiedenen Reinkulturen im ALF bestätigte, dass sich bei der angewendeten PCR-Methode eine statistische Produktverteilung mit unterschiedlichen Markierungsgraden und Größen der DNA-Fragmente ergab. Die detektierten Fluoreszenzsignale finden sich in Abb. 101. Trotz Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem QIAquick™ nucleotide removal Kit wurde in allen drei Fällen noch der typische Cy5-dCTP-Peak gefunden. Im Vergleich zu den Proben von *Dsm. asperonum* und *Dsh. retbaense* wies das Produkt von *Dsv. halophilus* einen etwas geringeren Markierungsgrad der DNA auf.



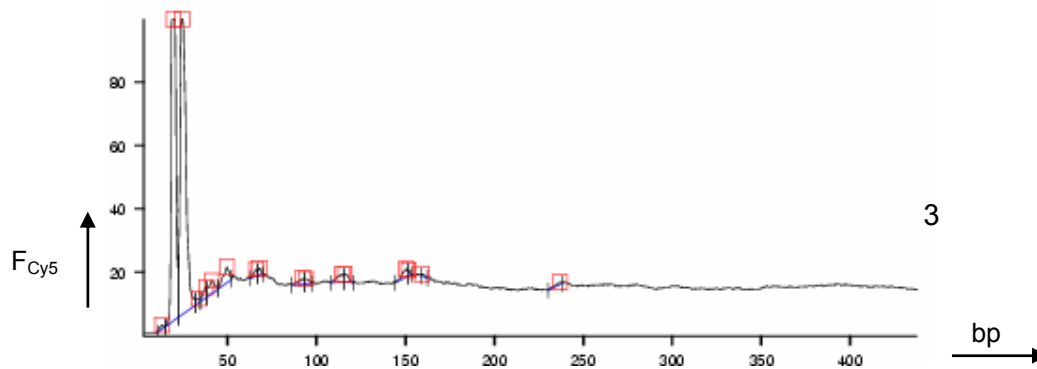


Abb. 101 Analyse der nach der *Random-Primer*-Methode markierten PCR-Produkte zur Mikroorganismen-Detektion im ALFexpress™ Analysesystem

1-3: PCR-Produkte aus Reinkulturen der Spezies *Dsv. halophilus* (1), *Dsm. retbaense* (2) und *Dsh. aspheronum* (3) in gleicher Verdünnung aufgetragen. Fluoreszenzsignal F_{Cy5} angegeben im Verhältnis (%) zur Intensität des gesättigten Signals.

ii) Hybridisierung der PCR-Produkte im DNA-Biosensor

Die Verdünnungen der PCR-Produkte im Hybridisierungspuffer wurden vor jeder Messung thermisch denaturiert. Bei der Hybridisierung ohne vorangegangene Denaturierung ergab sich ein Signalverlust von ca. 35 %, weil bei der *Random-Primer*-Markierung beide Stränge des Konsensus-PCR-Produktes markiert wurden. Bei Detektion der PCR-Produkte zum Mikroorganismen-Nachweis konnte im Übrigen kein Unterschied im Verhalten des Sensorsystems verglichen mit der Hybridisierung der PCR-Produkte zur Tierartendifferenzierung festgestellt werden. Die Regenerierbarkeit des Systems war nicht eingeschränkt und es wurden lineare Signalanstiege sowie ein linearer Zusammenhang zwischen dem eingesetzten PCR-Produkt-Volumen und der Signalsteigerung beobachtet (Abb. 102). Dabei waren die systemgegebenen Nachweisgrenzen ausreichend, um auch mit geringen Volumina der PCR-Produkte deutliche Signale zu erhalten, wie z.B. bei Hybridisierung von 0,8 μ l *Dsv. halophilus*-Probe mit den drei pm-Sonden SRB385, DSV698 und EUB338. Die komplexe Zusammensetzung der PCR-Produkte mit dem großen Hintergrund an fluoreszenzmarkiertem DNA-Material beeinträchtigte die Funktionalität des Sensors nicht. Auch die Konzentration des in den Proben noch vorhandenen Cy5-dCTPs war nach der vorangegangenen Aufreinigung ausreichend gering, so dass es nicht zu störenden, unspezifischen Signalen führte (vgl. 5.2.3.6).

Das Verhalten der Modell-Targetsequenzen von den drei analysierten SRP-Spezies auf den Sonden SRB385, SRB385Db und DSV698 konnte bei Hybridisierung der PCR-Produkte bestätigt werden (Abb. 103). Auch hier wurde nur der G-T-mismatch bei Anbindung von *Dsv. halophilus*-Probe an SRB385Db mit 65 % des pm-Signals für SRB385 bzw. 25 % des *Dsm. aspheronum*-Signals für SRB385Db sehr schlecht diskriminiert. Das Verhältnis der Signale für Sonde EUB338 an einer anderen Position der amplifizierten 16S rRNA (vgl. Abb. 93), die als übergeordnete Sonde des hierarchischen Hybridisierungskonzeptes nicht zwi-

schen den drei Spezies differenziert, sondern alle Eubakterien erkennt, bestätigte das Ergebnis der ALF-Analyse, nach dem die *Dsv. halophilus*-Probe deutlich schwächer konzentriert bzw. markiert war als die Proben der beiden anderen Spezies.

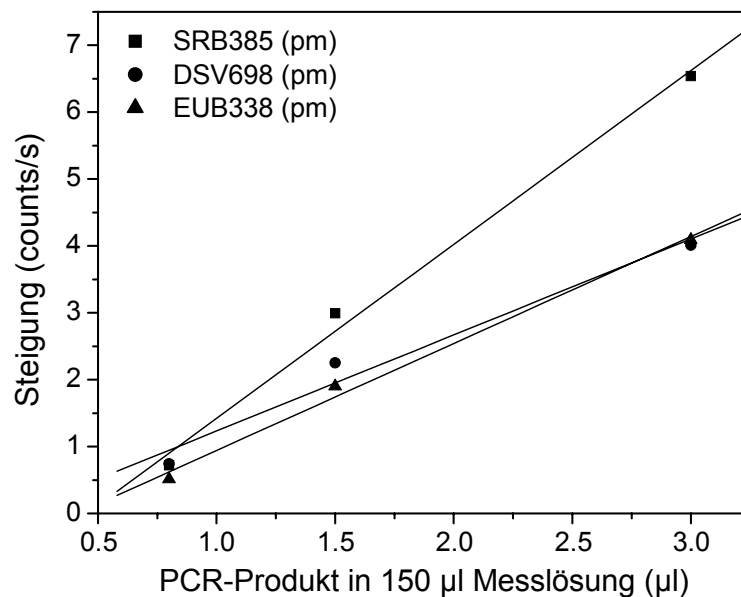


Abb. 102 Verdünnungsreihe für das PCR-Produkt von *Dsv. halophilus* im DNA-Sensorchip

Verdünnung des auf der x-Achse angegebenen PCR-Produkt-Volumens auf 150 µl Messlösung, thermische Denaturierung. Hybridisierung mit drei verschiedenen pm-Sonden. Keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung der einzelnen Sondenspots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über $n = 1$ Messung.

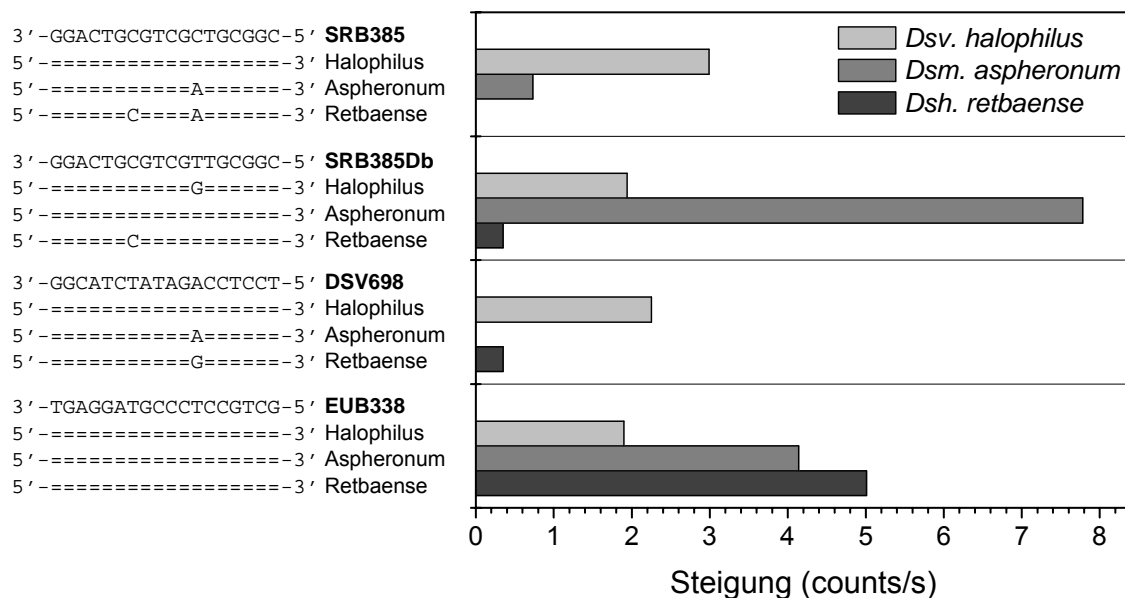


Abb. 103 Signalsteigungen für die Sonden SRB385, SRB385Db, DSV698 und EUB338 bei Hybridisierung der PCR-Produkte aus den Reinkulturen der Spezies *Dsv. halophilus*, *Dsm. asperonum* und *Dsh. retbaense*

Einzelne Hybridisierung von je 1.5 µl der durch *Random*-Primer-Markierung entstandenen PCR-Produkte mit den verschiedenen Sondensequenzen (fett gedruckt). Standard-Sigma-Objektträger, keine Ausleuchtungskorrektur, MW-Auswertung eines Spots im zentralen, relativ homogen ausgeleuchteten Bereich des Arrays über eine Messung.

6 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, auf der Grundlage eines Evaneszent-Feld-DNA-Biosensors zahlreiche DNA-DNA-Wechselwirkungen durch Hybridisierung in Realzeit hinsichtlich verschiedener grundlegender Aspekte zu charakterisieren und die Anwendbarkeit der simultanen Detektionsmethode für praktische Fragestellungen zu demonstrieren. Die hohe Spezifität der Hybridisierungsanalyse konnte genutzt werden, um eine schnelle und zuverlässige PCR-basierte Methode zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln zu etablieren, während vor dem Hintergrund der Mikroorganismendetektion das Potential zur Detektion einzelner mismatches verdeutlicht und ein neuer Ansatz zur Diskriminierung solcher Basenfehlpaarungen mit nur geringer Auswirkung auf die Bindungsstärke aufgezeigt wurde. Im Folgenden werden im ersten Abschnitt zunächst vorrangig die grundlagenorientierten Ergebnisse der Realzeit-Hybridisierung diskutiert. Daraufhin wird am Beispiel der Tierartendifferenzierung u.a. auf den Unterschied zwischen der Hybridisierung im DNA-Sensorchip und auf DNA-Chips als angewendeter Vergleichsmethode eingegangen und schließlich der Nachweis der sulfatreduzierenden Prokaryonten (SRPs) diskutiert.

6.1 Grundlagen

Immobilisierung

Weil für eine uneingeschränkte und reproduzierbare Hybridisierung der fluorophormarkierten Target-DNA die effektive Immobilisierung der komplementären Sonden-DNA auf der Oberfläche des Sensorchips eine der wichtigsten Voraussetzungen darstellt, wurden zu Beginn verschiedene Parameter der Sondenimmobilisierung untersucht. Die hier angewendete Standardmethode zur kovalenten Anbindung der aminomodifizierten Sondenoligonukleotide auf der isothiocyanataktivierten Glasoberfläche erwies sich dabei als sehr zuverlässig. Sie kombiniert den von Cras *et al.* [175] optimierten Waschschrift der blanken Glasobjektträger, welcher durch die Exposition der freien Hydroxylgruppen auf der Glasoberfläche die Bildung einer einheitlichen und reproduzierbaren Monolayerschicht bei der Silanisierung ermöglicht, mit dem von Beier und Hoheisel [102] getesteten Aktivierungsreagenz Phenylendiisothiocyanat. Dieses bindet als bifunktionaler Linker die aminomodifizierte DNA an die aminofunktionalisierte Silanschicht des Glases. Die dadurch erreichte gute Zugänglichkeit der Sondenoligonukleotide wurde hier noch verstärkt durch den Einbau von T8-Spacern, deren positiver Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz im DNA-Sensorchip von Schult [79] bereits für eine 18mer-Sonde demonstriert wurde. Für die konventionelle Chiphybridisierung haben außerdem Shchepinov *et al.* [182] gezeigt, dass polymere Spacermoleküle die sterische Behinderung der Sondenoligonukleotide untereinander verringern können. Die nach der

Standardimmobilisierungsmethode erhaltenen Sondenspots wurden in dieser Arbeit lediglich durch eine qualitative Bewertung hinsichtlich Homogenität und Größe charakterisiert. Auf eine aufwendige Bestimmung der Belegungsdichte durch Immobilisierung radioaktiv markierter Sondenmoleküle wurde verzichtet, weil für die Hybridisierung im DNA-Sensorchip nicht die absolute Zahl freier Bindungsstellen, sondern vielmehr ein ausreichender Überschuss der Fangsonden-DNA gegenüber den Targetmolekülen entscheidend ist. Eine optimierte Sondenbelegung, die sich auch für die Hybridisierung unter dem Deckgläschen als geeignet erwies, wurde durch Dispensieren weniger Nanoliter der DNA-Lösung schon bei einer im Vergleich zu anderen beschriebenen DNA-Biosensorsystemen oder DNA-Mikroarrayanwendungen relativ geringen Sondenkonzentration von 5 μM erreicht. Die Herstellung der Sondenarrays nach der hier beschriebenen Standardmethode bietet damit den Vorteil eines sehr begrenzten und kostengünstigen Verbrauchs der DNA-Fangsonden. Die Sondenkonzentration sollte allerdings grundsätzlich bei der Immobilisierung im Arrayformat nicht beliebig groß gewählt werden, weil erfahrungsgemäß die Hybridisierungseffizienz abnimmt, wenn die Belegungsdichte der immobilisierten Sondenmoleküle zu groß wird [182,183]. Ein analoger Effekt wurde auch bei der Optimierung der Fangsondenkonzentration auf den CEL-Objektträgern beobachtet (vgl. 5.3.1.1).

Um im Rahmen der Entwicklung und Optimierung der Realzeit-Hybridisierung im DNA-Sensorchip den Anschluss an das sich rasant entwickelnde Gebiet der DNA-Mikroarrays und die damit verbundene intensive Forschung besonders im Bereich der Immobilisierungstechniken halten zu können, wurde das Sensorsystem für die Verwendung von Glasobjektträgern im Standardformat angepasst. Zunächst war der Einsatz spezieller Chips (28 mm x 22 mm x 1 mm) aus BK7-Glas vorgesehen gewesen. Wenn auch die Versuche zur Lagerstabilität zeigten, dass bei Anwendung der Standardimmobilisierungsmethode ein gewisser zeitlicher Freiraum hinsichtlich des Herstellungsprozesses sowie der letztendlichen Verwendung gegeben ist, ist das Verfahren insgesamt jedoch mit einem sehr hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden. Die alternative Verwendung käuflicher voraktivierter Glasobjektträger bietet dem Anwender dagegen eine viel größere Flexibilität. Betrachtet man dabei ausschließlich die Materialkosten, liegt der Vorteil zwar auf der Seite der nach der hier beschriebenen Standardmethode immobilisierten Glasobjektträger, für die sich ein Preis von ca. 1 €/Stck. ergibt, während z.B. die voraktivierten Produkte Easyspot[®] von Biocat ca. 10 €/Stck. und CSS-Silylated[™] von CEL Associates ca. 2 €/Stck. ohne Berücksichtigung der zusätzlich benötigten Chemikalien kosten. Werden aber auch die Personalkosten für die Herstellung der immobilisierten DNA-Sondenarrays berücksichtigt, ist die Verwendung voraktivierter Glasobjektträger finanziell günstiger – zumindest solange wie die Herstellung einer Charge eine relativ kleine Anzahl von ca. 10 Objektträgern umfasst –, weil der zeitliche Arbeitsaufwand einer kompletten Sondenimmobilisierung dabei mit durchschnittlich 5 h nur

etwa halb so groß ist wie bei der Standardmethode. Allerdings zeigten die Tests der verschiedenen voraktivierten Substrate, dass in diesem Bereich auch zahlreiche Produkte von schlechter Qualität angeboten werden. Bei Verwendung der PicoSlides™ trat z.B. eine starke unspezifische Anbindung der Target-DNA auf der Oberfläche auf, während diese mit der hier angewendeten Standardmethode, die grundsätzlich auf derselben Kopplungschemie beruht, nach Optimierung des Deaktivierungsschrittes verhindert werden konnte. Zwar muss grundsätzlich berücksichtigt werden, dass die voraktivierten Glasobjektträger nicht für die Anwendung im DNA-Sensorchip, sondern für die konventionelle Chiphybridisierung konzipiert wurden. Die inhomogene Spotform bei Immobilisierung auf den CMT-GAPS™-Objektträgern von Corning wurde z.B. aber auch von Dolan *et al.* [184] für die Anwendung bei der konventionellen Chiphybridisierung beschrieben. Dennoch zeigten die Untersuchungen mit den voraktivierten Glasobjektträgern, dass einige Produkte eine echte Alternative für die Hybridisierung im DNA-Sensorchip darstellen. Auf den verschiedenen Oberflächen wird eine maximale Signalintensität allerdings erst bei unterschiedlichen Sondenkonzentrationen erreicht, wie auch der Einsatz der CEL-Objektträger im Rahmen der Mikroorganismendetektion zeigte. Auf den Easyspot®-Objektträgern könnte so z.B. wahrscheinlich durch eine Variation der Sondenkonzentration auch noch ein größeres Detektionspotential erreicht werden als bei den hier durchgeführten, grundlegenden Tests mit einer Standardkonzentration von 5 µM.

Für die Realzeitdetektion der DNA-Hybridisierung in planaren Biosensorsystemen sind in der Literatur verschiedene Immobilisierungsmethoden beschrieben worden. Budach *et al.* [66] erzeugten ebenfalls mittels eines Dispensers orts aufgelöst verschiedene Sondenspots auf einem Glaträger mit einer wellenleitenden Monoschicht aus Ta₂O₅. Die Anbindung aminomodifizierter Sonden auf der zuvor epoxysilanisierten Oberfläche für die Detektion der fluorophormarkierten Targets im evaneszenten Feld führte zu Spotdurchmessern von 300 µm. Zahlreiche Systeme nutzen dagegen unabhängig von dem gewählten Substratmaterial die starke Biotin-Avidin-Wechselwirkung zur Immobilisierung der Sonden-DNA. Weil Kunststoff als Basismaterial für Einweg-Sensorchips deutlich günstiger ist als Glas, wurde z.B. am ICB ein Evaneszent-Feld-DNA-Biosensorsystem mit einem Durchflusschip aus PMMA entwickelt, auf dessen Streptavidin-beschichteter Oberfläche die biotinylierten Sondenoligonukleotide orts aufgelöst immobilisiert wurden [76-78]. Tolley *et al.* [70] nutzten dasselbe Konzept bei der Fluoreszenzdetektion auf der Oberfläche eines planaren Wellenleiters aus Polystyrol. Schuderer *et al.* [67] erreichten in einem ähnlichen fluoreszenzbasierten Sensorsystem eine orts aufgelöste Immobilisierung der biotinylierten Sonden auf einer Avidin-beschichteten Glasoberfläche dadurch, dass die verschiedenen SONDENSEQUENZEN in separaten, parallel angeordneten Fließkanälen aufgetragen wurden. Die unspezifische Bindung von DNA wurde anschließend durch Adsorption von BSA an die Oberfläche verhindert. Die Biotin-

Streptavidin-Wechselwirkung bildet auch die Grundlage zahlreicher Anwendungen zur Hybridisierungsanalyse, die für das direkt optische SPR-Sensorsystem BIAcore beschrieben wurden [48-53]. So werden Streptavidin-beschichtete Sensorchips auf Goldbasis vom Hersteller angeboten und können im Gerät leicht ganzflächig mit biotinylierten Sonden belegt werden. Nelson *et al.* [54] berichteten von der orts aufgelösten Immobilisierung thiolmodifizierter DNA-Sonden auf einer aminofunktionalisierten Goldoberfläche in einem alternativen SPR-Sensorsystem. Dabei wurde ein Array quadratischer $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ -Spots photolithographisch erzeugt und die aktivierte Oberfläche schließlich durch Bindung von Polyethylenglykol gegen die unspezifische Anlagerung von DNA geschützt.

Charakterisierung und Optimierung der Hybridisierung

Die Messungen zur Reproduzierbarkeit der Hybridisierung in Realzeit zeigten, dass die Anbindung sowohl von Target-Oligonukleotiden als auch von PCR-Produkten an die immobilisierten Fangsonden durch einen alkalischen Waschschrift regenerierbar ist. Aufgrund der guten Arbeitsstabilität über mindestens 20 Messungen können ganze Messreihen in einem Sensorchip durchgeführt werden. Lediglich bei längerer Exposition der alkalischen Lösung im Fließkanal wurde ein deutlicher Rückgang der Signalstabilität beobachtet, was eventuell auf eine Ablösung der Fangsondemoleküle von der Oberfläche durch einen Angriff der nukleophilen Hydroxyl-Ionen an reaktiven Zentren auf der chemisch modifizierten Chipoberfläche zurückzuführen ist. Eine ähnlich gute Regenerierbarkeit wie im DNA-Sensorchip wurde auch für andere DNA-Biosensoren beschrieben, so beobachteten z.B. Schuderer *et al.* [67] bei Regenerierung mit 50 mM NaOH in 10 Messzyklen nur einen geringfügigen Signalabfall. Feriotto *et al.* [53] berichteten sogar, dass sie nach Sondenimmobilisierung auf ihren Streptavidin-beschichteten Sensorchips von BIAcore mindestens 70 Messungen durchführen konnten, wenn nach jeder Hybridisierung ebenfalls mit 50 mM NaOH regeneriert wurde. Diese grundsätzlich relativ gute Reproduzierbarkeit der Hybridisierungssignale bei aufeinander folgenden Messungen in DNA-Biosensoren beruht darauf, dass meist nur verhältnismäßig kurze Bindungsphasen in Realzeit beobachtet werden, in denen die Lösung üblicherweise in Bewegung gehalten wird und sich dadurch homogen auf der Oberfläche verteilt. Bei der konventionellen Hybridisierung auf DNA-Chips erfolgt die Hybridisierung dagegen meist unter der stehenden Lösung über einen deutlich längeren Zeitraum, und bis zur Auswertung des Experimentes am Mikroarrayscanner werden die hybridisierten Sondenarrays sogar im trockenen Zustand gelagert. Dadurch können sich zusätzliche, irreversible Wechselwirkungen auf der Chipoberfläche ausbilden, so dass eine vollständige Regenerierung im Anschluss normalerweise nicht mehr möglich ist.

Ein besonderer Vorteil hat sich bei der Hybridisierung im DNA-Sensorchip zusätzlich durch die gute Reproduzierbarkeit zwischen den Messsignalen auch bei Verwendung verschie-

dener Sensorchips ergeben. Im Gegensatz dazu stehen die relativ großen Schwankungen, die bei der konventionellen Chiphybridisierung sowohl innerhalb eines Arrays als auch beim Vergleich mehrerer Arrays auftraten, aber typisch für diese Technologie sind. Cho und Tiedje [185] berichten von ähnlichen Abweichungen. Sie erhielten über mehrere Spots innerhalb eines Arrays einen Variationskoeffizienten von ca. 25 % und zwischen den Mittelwerten verschiedener Arrays eine Abweichung von ca. 50 %. Mit 10-15 % intra- bzw. 30 % inter-Array-Variabilität erhielten Bodrossy *et al.* [160] etwas bessere Werte. Die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zumindest bei Hybridisierung der stehenden Lösung unter dem Deckgläschen oder in Hybridisierungskammern durch eine inhomogene Targetverteilung auf der Oberfläche stellt einen grundsätzlichen Nachteil der Methode dar, allerdings kommen heute zunehmend Geräte auf den Markt, die eine Durchmischung der Probenlösung bei automatisierter, reproduzierbarer Durchführung der Hybridisierung ermöglichen [97]. Die meisten Anwender erheben aber dennoch kaum statistische Daten aufgrund der aufwendigen Versuchsdurchführung und –auswertung und wegen der hohen Materialkosten für die einzelnen Arrays. Wie die Versuche zeigten, sollte vor dem Vergleich der Ergebnisse verschiedener Hybridisierungsexperimente besonders bei Anwendung von *high-density*-Mikroarrays immer zunächst eine Normalisierung der Daten erfolgen, um dadurch Faktoren wie die inhomogene Verteilung der Probenlösung, Ungleichmäßigkeiten der Chipoberfläche oder Abweichungen beim Scannen der Fluoreszenzintensitäten auszugleichen. Verschiedene algorithmische Ansätze für die Normalisierung beschreiben Holloway *et al.* [97].

Bei der Hybridisierung im DNA-Sensorchip ergaben sich zwar auch Inhomogenitäten bei der Anregung der oberflächengebundenen Fluorophore, diese waren jedoch auf das besondere Ausleuchtungsprofil im Bereich der Anregungsoptik des Auslesegerätes zurückzuführen und relativ gut reproduzierbar. Dieses Phänomen stellt somit nur ein charakteristisches Problem der in dieser Arbeit verwendeten Geräteversion dar und könnte durch eine weitere Optimierung des Auslesegerätes minimiert werden (Frank Wienhausen, ICB, persönliche Mitteilung). Es wurden zudem Methoden zur Korrektur des Ausleuchtungsprofils entwickelt, deren Anwendung bei Bearbeitung vieler Fragestellungen jedoch nicht zwingend notwendig war, weil häufig der Vergleich der Signalintensitäten auf einem bestimmten Sondenspot bei verschiedenen Messungen im Vordergrund stand und nicht der quantitative Vergleich der Messwerte auf verschiedenen Spots innerhalb eines Arrays. Ein Ansatz zur Co-Immobilisierung zweier verschiedener DNA-Sondensequenzen in einem Spot wie bei der spotinternen Korrekturmethode wurde auch von Cho und Tiedje [185] beschrieben. Sie nutzten bei der konventionellen Chiphybridisierung die parallele Hybridisierung der Cy5-markierten Target-DNA sowie eines Cy3-markierten Referenz-PCR-Produktes an Sondenspots bestehend aus Mischungen der individuellen Zielsequenz und einer Referenzsonde, um durch

Bildung des Verhältnisses beider Fluoreszenzsignale die Daten zu normalisieren und eine Quantifizierung zu ermöglichen. Immobilisiert wurden dabei 500-900 bp große DNA-Fragmente, wodurch im Gegensatz zu Oligonukleotidsondenarrays die unterschiedlichen Hybridisierungseffizienzen verschiedener SONDENSEQUENZEN ausgeglichen wurden.

Zur Auswertung der Messungen im DNA-Sensorchip erfolgte die Quantifizierung der Signalanstiege in dieser Arbeit zunächst durch die Bestimmung des maximalen Wertes für jeden einzelnen SONDENSLOT. Dabei ergab sich jedoch besonders bei schwacher Anbindung ein Problem durch das natürliche Rauschen der Signalintensitäten im Steigungsbild. Ein deutlicher Fortschritt konnte deswegen durch die Anpassung der Auswertesoftware an den Mittelwert erzielt werden, wodurch einzelne „Ausreißer“-Pixel weniger stark gewichtet wurden. Die Auswertung orientierte sich damit zunehmend an dem typischen Grundprinzip der Auswertesoftware vieler Mikroarrayscanner, die wie *GenePix ProTM* die Signalintensitäten durch Bestimmung des Mittelwertes in einem kreisförmigen Raster und Subtraktion des lokalen Hintergrundwertes um jeden Spot bestimmen (vgl. 4.6.3). Für eine weitere Optimierung der Software *Exprimage* könnte das zur Zeit verwendete quadratische Raster entsprechend ersetzt werden, um dadurch noch genauer den individuellen Hintergrundwert für jeden Spot zu erfassen. Diese Modifizierung des Programms ist allerdings algorithmisch anspruchsvoll und im Rahmen dieser Arbeit noch nicht umgesetzt worden, weil auch mit der bestehenden Methode zur Mittelwertbildung eine genaue und reproduzierbare Auswertung sowie die Bestimmung von Nachweisgrenzen möglich war. Für die Detektion eines 46mer-Targets wurde z.B. eine Nachweisgrenze von 13 pM erreicht, wobei diese grundsätzlich durch eine Vergrößerung der Anregungsintensität bei gleichzeitiger Verkleinerung der sensitiven Fläche noch verringert werden könnte. Der Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor kann damit einem Vergleich mit anderen beschriebenen Systemen sehr gut standhalten, so wurden z.B. mit 10 pM für ein fluorophormarkiertes 18mer-Target [67] und mit 74 pM für ein Cy5-markiertes 21mer-Target [70] bei Anwendung planarer Biosensoren mit jeweils kurzen Messzeiten von wenigen Minuten Nachweisgrenzen in derselben Größenordnung erhalten. Deutlich schlechtere Nachweisgrenzen ergeben sich dagegen beim Nachweis unmarkierter Target-Moleküle. Watts *et al.* [57] detektierten beispielsweise ein 40mer-Target in einem Resonant-Mirror-Biosensor nach 15minütiger Messung bis zu einer Konzentration von 9.2 nM. Nelson *et al.* [54] erhielten mit einem SPR-System für 18mer-Targetoligonukleotide eine Nachweisgrenze von 10 nM und konnten bei der Hybridisierung von 1500 bp großen 16S rRNA-Molekülen mit Hilfe dieses massensensitiven Detektionsprinzips noch Konzentrationen von 2 nM nachweisen. Bessere Nachweisgrenzen wurden dagegen von Budach *et al.* [66] bei Hybridisierung eines 22mer-Cy5-Targets in einem planaren Wellenleitersystem mit 50 fM in 12 min sowie bei der Anwendung von faseroptischen Sensoren erhalten. Abel *et al.* [71] wiesen damit z.B. während eines längeren Messzeitraumes von 60 min noch 0.2 pM eines Fluorescein-

markierten 16mer-Targets nach und Kleinjung *et al.* [62] konnten sogar noch 70 fM eines 13mer-Oligonukleotids durch Interkalation von PicoGreen detektieren.

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Hybridisierungsrate, wie beispielsweise die Versuche zur Variation des Hybridisierungspuffers und der Temperatur zeigten. Besonders die Anbindung verschiedener Targets bei unterschiedlichen Temperaturen deutete dabei bereits an, dass sich bei paralleler Hybridisierung verschiedener Targetsequenzen meist unterschiedliche optimale Reaktionsbedingungen ergeben (vgl. 6.2 und 6.3). Das Experiment verdeutlichte durch den Vergleich der Hybridisierungseffizienzen für das System Actin-51mer-Target mit der komplementären 45mer-Sonde einerseits und das System NPT1-56mer-Target mit 18mer-Sonde andererseits außerdem, dass die Hybridisierungsstärke von der Länge der Hybridisierungssequenz abhängt. Der positive Einfluss der Sondenlänge auf die Signalintensität aufgrund der zunehmenden Wechselwirkungen wurde auch schon von Schult [79] für die Hybridisierung des Actin-51mer-Targets mit 15, 19, 30 und 45 nt langen Sonden beschrieben. Einen interessanten Aspekt der Immobilisierung von Sondenoligonukleotiden auf festen Oberflächen haben Steel *et al.* [186] untersucht. Bei der Immobilisierung thiolmodifizierter Sonden mit einer Länge von 4 bis 48 nt stellten sie fest, dass bei einer Sondenlänge von > 24 nt ein deutlicher Rückgang der Belegungsdichte auftrat. Dieser wurde hervorgerufen durch eine zunehmend ungeordnete Ausrichtung der polymerartigen Moleküle auf der Oberfläche und verstärkte Sekundärstrukturen innerhalb der Sondenmoleküle. Die für längere Sonden beobachtete Hybridisierungseffizienz wird daher grundsätzlich positiv durch die größere Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen und negativ durch die schlechtere Zugänglichkeit der Sonden beeinflusst.

Weiterhin zeigten die Versuche zur Spezifität der Hybridisierung im DNA-Sensorchip, dass die Stärke der Anbindung von der Anzahl der Basenfehlpaarungen in der Hybridisierungssequenz abhängt, wobei der Einfluss eines einzelnen mismatches mit zunehmender Länge der Hybridisierungssequenz abnimmt. Diesen Effekt demonstrierten ausführlich auch Gotoh *et al.* [45]. Beim Sondendesign muss deshalb vor dem Hintergrund der jeweiligen Fragestellung immer ein Kompromiss gefunden werden zwischen der Sensitivität einerseits, die eher durch längere Sonden erreicht wird, und der Spezifität andererseits, die durch kürzere Sonden erfüllt wird. Weil der Schwerpunkt bei den in dieser Arbeit behandelten Fragestellungen zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln sowie zur Mikroorganismendetektion auf der spezifischen Diskriminierung zwischen nah verwandten Spezies lag, wurden hier Sonden in einer Länge von 20 nt bzw. 18 nt konzipiert. Die Versuche zu beiden Fragestellungen zeigten außerdem, dass es beim Design spezifischer Sonden besonders auf die Position und die Art der mismatches ankommt.

Um zu gewährleisten, dass die Hybridisierung im DNA-Sensorchip tatsächlich kinetisch kontrolliert und nahezu nicht diffusionslimitiert abläuft und um auf dieser Grundlage Messun-

gen zur Bestimmung der kinetischen Konstanten durchführen zu können, wurde die Fließrate optimiert. Auch Graham *et al.* [187] beobachteten bei der Hybridisierung auf der Oberfläche eines faseroptischen Evaneszent-Feld-DNA-Biosensors, dass bei Messung unter der stehenden Lösung nur eine schwache Signaländerung auftrat und die Bindungsrate erst bei zunehmender Fließrate anstieg. Dabei wurde aber im Gegensatz zur Detektion im DNA-Sensorchip noch bis zu einer Fließrate von 25 $\mu\text{l/s}$ eine kontinuierliche Zunahme des Signalanstiegs während der Assoziationsphase aufgezeichnet. Erickson *et al.* [81] entwickelten ein umfassendes theoretisches Modell zur kinetischen Beschreibung der Hybridisierung an Oberflächen und nutzten dieses dann, um die Bindungskinetiken in einem theoretisch konstruierten Fließkanalelement eines mikrofluidischen Biosensors, dem sog. BLOCS (*biolab-on-a-chip simulation*), zu simulieren. Die Hybridisierungsraten wurden dabei u.a. für drei verschiedene Fließgeschwindigkeiten berechnet, um daran den Übergang zwischen einem transport- und einem reaktionslimitierten System zu demonstrieren. Außerdem wurde theoretisch gezeigt, dass bei vorgegebener Fließgeschwindigkeit die Reaktionsrate bei einer schrittweisen Verringerung der Fließkanalhöhe von 300 auf 100 μm zunimmt, weil sich auf der Basis des parabolischen Geschwindigkeitsprofils eine zunehmende Konvektion nahe der Oberfläche und dadurch eine noch geringere Verarmung der Targetmoleküle ergibt. Diese Simulation bestätigt damit die Konzeption des Fließkanals in unserem DNA-Sensorchip, dessen Höhe mit 50 μm möglichst gering gewählt wurde, um nahezu ohne Diffusionslimitierung arbeiten zu können.

Kinetische Untersuchungen

Die kinetischen Untersuchungen im DNA-Sensorchip zeigten, dass das System für die Betrachtung von Assoziations-, Gleichgewichts- und Dissoziationsphase der Hybridisierung und die Bestimmung kinetischer Konstanten prinzipiell geeignet ist. Basenfehlpaarungen und auch die Länge der Hybridisierungssequenz wirkten sich dabei nicht nur auf die Dissoziation, sondern auf alle drei Phasen der Bindungsreaktion aus. Weil die Signalsteigung im Anfangsbereich der Hybridisierung nach

$$dR/dt = k_{\text{on}}cR_{\text{max}} \quad (\text{Gl. 5})$$

direkt proportional zur Geschwindigkeitskonstanten k_{on} ist, kann eine Charakterisierung der Wechselwirkung sowie die Bestimmung der kinetischen Konstanten zeitlich effektiv bereits in der Assoziationsphase erfolgen. Die Gültigkeit von (Gl. 5) wurde auch dadurch gestützt, dass die Werte für k_{on} zusätzlich über einen zweiten, von der Assoziationsphase unabhängigen Ansatz aus der Gleichgewichtskonstanten für die Dissoziation K_{D} und der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{off} nach (Gl. 7) bestimmt wurden. Nur weil der Einfluss der Diffusion während der Anbindung tatsächlich vernachlässigt werden durfte, ergab sich dabei

eine relativ gute Übereinstimmung zwischen $k_{on}(1)$ und $k_{on}(2)$ mit Werten in derselben Größenordnung (vgl. Tab. 8).

Obwohl sich die Basenfehlpaarungen, wie auch schon von Jensen *et al.* [188] durch ausführliche Untersuchungen an einem BIAcore-System gezeigt, auf alle Phasen der Hybridisierung auswirkten, wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_{off} stärker durch mismatches in der Hybridisierungssequenz beeinflusst als die Konstanten k_{on} . Eine analoge Beobachtung machten auch Gotoh *et al.* [45], als sie für verschiedene mismatches in 11-20 bp langen Oligonukleotidsequenzen die Auswirkung von Art, Anzahl und Position auf die kinetischen Konstanten untersuchten. Die relativ geringen Unterschiede zwischen den k_{on} -Werten für pm- und mm-Sequenz ergaben sich bei den Messungen im DNA-Sensorchip dadurch, dass nach (Gl. 5) die Signalsteigung nicht nur eine Funktion von k_{on} , sondern auch von R_{max} ist und die verhältnismäßig großen Unterschiede der tatsächlich beobachteten Signalsteigungen auch auf einen deutlichen Unterschied der R_{max} -Werte für pm- und mm-System zurückzuführen sind (vgl. Abb. 40). R_{max} wurde nach

$$R_{eq} = \frac{R_{max} \cdot c}{K_D + c} \quad (\text{Gl. 8})$$

bestimmt und stellt eigentlich das Fluoreszenzsignal dar, das sich nach Hybridisierung aller immobilisierten Sondenmoleküle ergibt. (Gl. 8) wird auch die Langmuirsche Adsorptionsisotherme genannt und beschreibt allgemein heterogene Bindungsreaktionen an Oberflächen unter der idealen Voraussetzung, dass alle Bindungsstellen energetisch gleichwertig sind und unabhängig voneinander frei zur Verfügung stehen. Die Werte für R_{max} waren in dem hier verwendeten System eventuell deswegen nicht konstant, weil die verschiedenen Sondensequenzen kein ideales Verhalten zeigten und z.B. aufgrund von Sekundärstrukturen keine homogene Verteilung der Bindungsstellen vorlag. Möglicherweise berücksichtigt R_{max} aber auch, dass die Effizienz der Wechselwirkung bei pm- und mm-Sequenzen unterschiedlich war und z.B. bei einer mm-Hybridisierung laterale Wechselwirkungen der Targets mit verschiedenen Sondenmolekülen auftraten und dadurch weniger Bindungsstellen frei zugänglich waren. Langmuir-Isothermen zur Analyse von pm- und mm-Hybridisierungen wurden besonders an SPR-Sensorsystemen schon häufig aufgenommen und in der Literatur beschrieben. Liebermann *et al.* [68] gingen z.B. bei der Untersuchung einer 15mer-Sequenz mit 0, 1 und 2 mismatches von einem nahezu idealen Verhalten mit konstantem R_{max} -Wert aus und beobachteten einen deutlichen Unterschied zwischen den Geschwindigkeitskonstanten k_{on} von bis zu drei Größenordnungen. Bei der Hybridisierung einer 25mer-Sequenz mit 0, 1 und 2 mismatches erhielten dagegen Peterson *et al.* [80] auch deutlich unterschiedliche R_{max} -Niveaus für die drei Langmuir-Isothermen. Sie schlugen für eine exaktere Analyse der Daten das Sips-Modell zur Anpassung der Langmuir-Isotherme vor,

das der Eigenart der mm-Hybridisierung besser entsprechen soll. Für $c \rightarrow \infty$ erhielten sie dadurch angeglichenen R_{\max} -Werte und die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation K_D lag zwischen 20 nM (pm) und 500 nM (2mm). Eine analoge Auswertung der am DNA-Sensorchip erhaltenen Daten war jedoch zu ungenau. Peterson *et al.* [80] wiesen außerdem wie auch Erickson *et al.* [81] darauf hin, dass sich die Dichte der immobilisierten Sondenmoleküle grundsätzlich auf die Bindungskinetik auswirken kann, so wird besonders bei einer zu hohen Belegungsdichte und starker Wechselwirkung der Sonden untereinander eine mm-Differenzierung erschwert und die Assoziationsgeschwindigkeit verlangsamt. Dieser Einfluss wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt, weil die Sondenkonzentration ohnehin relativ gering gewählt wurde.

Bei der Beurteilung der ermittelten kinetischen Konstanten muss auch berücksichtigt werden, dass die für die Anfangsphase der Hybridisierung beobachtete gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hier nicht mehr zugrunde gelegt werden konnte, weil das System viel extremeren Bedingungen ausgesetzt war und z.B. eine vollständige alkalische Regenerierung nach Erreichen des Sättigungsniveaus nicht mehr in jedem Fall gewährleistet werden konnte. Weil bei gleichzeitig verringerter Sondenkonzentration relativ hohe Targetkonzentrationen gewählt wurden, um das Sättigungsniveau in akzeptabler Zeit erreichen zu können, bildeten sich wahrscheinlich nach der spezifischen Hybridisierung zwischen Sonden und Targets als primärer Wechselwirkung auf der Oberfläche zusätzliche Effekte aus, die dazu führten, dass die Targetmoleküle während der Dissoziationsphase nicht mehr vollständig abgelöst wurden. Dieses Verhalten wurde u.a. auch von Sauer *et al.* [189] bei kinetischen Untersuchungen mittels der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) sowie von Kleinjung [190] und Bier *et al.* [59] bei Messungen mit einem BIAcore-Sensorsystem beobachtet.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Konstanten mit anderen Literaturwerten erweist sich aus zwei Gründen als kompliziert. Zum einen wurde bereits verdeutlicht, dass die bestimmten Werte aufgrund der Genauigkeit der Messmethode nicht absolut, sondern eher als Tendenz und in Größenordnungen bewertet werden dürfen. Zum anderen sind die bisher in der Literatur beschriebenen Daten nur eingeschränkt vergleichbar, weil sie mit ganz unterschiedlichen Systemen und so z.B. bei variierender Immobilisierungsschemie oder Sondendichte bestimmt wurden [80]. Dadurch ergaben sich bisher häufig Abweichungen zwischen den Ergebnissen verschiedener Untersuchungen von bis zu drei Größenordnungen [81]. Mit den Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{on} im Bereich von $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ wurden in dieser Arbeit Daten in derselben Größenordnung wie bei Erickson *et al.* [81] für eine perfekt komplementäre 20mer-Sequenz erhalten. Während Erickson *et al.* bei einer geringen Sondendichte von nur 1 nmol/m^2 arbeiteten, wurde die Belegungsdichte im DNA-Sensorchip, wie bereits erwähnt, nicht näher bestimmt, allerdings wurde bei den kinetischen Untersuchungen bewusst eine deutlich sub-maximale Sondenkonzentration verwendet. Im

Vergleich dazu beobachteten Okahata *et al.* [191] bei Messungen mit einer Quarzmikrowaage für ein 20mer-Oligonukleotid ein k_{on} im Bereich von $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei einer Sondendichte von 200 nmol/m^2 . Mit einem optimierten SPR-System wurde dagegen bei einer Sondendichte von 170 nmol/m^2 sowohl für ein DNA- als auch für das entsprechende RNA-18mer-System k_{on} zu $1.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aus dem nahezu idealen Langmuir-Verhalten des Signalverlaufes bestimmt [54]. Aus der Reihe fallen im Gegensatz dazu die k_{on} -Werte, die in der Arbeitsgruppe von Knoll [68,69] mit einem fluoreszenzbasierten Sensorsystem bestimmt wurden und für ein 15mer-System nur im Bereich von 10^3 - $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ lagen. Von Sauer *et al.* [189] wurden durch Reflektometrische Interferenzspektroskopie in einem Sensorsystem die kinetischen Konstanten für die Wechselwirkung verschiedener 15-20mer-Oligonukleotidsysteme bestimmt und dabei wie in dieser Arbeit Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung von 10^{-3} s^{-1} erhalten. Eine relativ gute Übereinstimmung mit den im DNA-Sensorchip bestimmten Gleichgewichtskonstanten K_D von etwa 10^9 nM ergab sich mit den Werten von McKendry *et al.* [192], die für die Hybridisierung eines 12mer-Systems auf einem neuartigen, nanomechanischen Sensorsystem aus freischwingenden Trägern bei verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt wurden.

In der Vergangenheit hat sich das Bewusstsein, dass Basenfehlpaarungen sowie die Länge der Hybridisierungssequenz eine Auswirkung auch auf die Assoziationsphase der Bindungsreaktion zeigen, nur langsam durchgesetzt, weshalb z.B. Bier *et al.* [59,193] hauptsächlich die Dissoziationsphase der Hybridisierung untersuchten. In ersten Messungen an einem BIAcore-System erhielten sie aber Daten, die einen Unterschied sowohl zwischen den Geschwindigkeitskonstanten k_{off} als auch zwischen den k_{on} -Werten zumindest beim Auftreten von zentralen mismatches in einer 13mer-Sequenz zeigten [59]. Der Vorteil etablierter Sensorsysteme, wie z.B. von BIAcore, bei der Untersuchung von Bindungskinetiken liegt gegenüber dem DNA-Sensorchip grundsätzlich darin, dass die optimierten Oberflächen auch nach einer Sättigung der Bindungsreaktion mehrfach vollständig regenerierbar sind, wodurch verschiedene Wechselwirkungen auf derselben Oberfläche untersucht werden können und sich geringere Abweichungen ergeben.

Hybridisierung von PCR-Produkten

Im Anschluss an die grundlagenorientierten Untersuchungen am DNA-Sensorchip, die sich ausschließlich auf die Wechselwirkung von Oligonukleotidsequenzen bezogen, wurde demonstriert, dass das System auch für die Detektion von PCR-Produkten geeignet ist. Das Verhalten doppelsträngiger PCR-Produkte bei der Hybridisierung konnte dabei in einem ersten Schritt durch ein artifizielles System aus Actin-Target und komplementärem Gegenstrang unter kontrollierten Bedingungen sowohl mit als auch ohne vorangegangene Denaturierung ideal simuliert werden. Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass bei der Detektion

von PCR-Produkten mit asymmetrischer, aber auch mit symmetrischer Produktverteilung unabhängig von der Targetkonzentration ausschließlich lineare Signalanstiege in den betrachteten Zeiträumen auftraten und keine Sättigung der Bindungsstellen auf der Oberfläche beobachtet wurde, wodurch sich ein deutlicher Vorteil des Systems für die Anwendbarkeit auf praktische Fragestellungen ergab. Im Gegensatz dazu stehen andere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe, die mit einem verwandten Messaufbau erhalten worden waren [77]. Bei der Hybridisierung verschiedener Cy5-markierter PCR-Produkte zwischen 66 und 202 bp in einem kunststoffbasierten Evaneszent-Feld-DNA-Sensorchip wurden auch nach Optimierung bereits im Anfangsbereich der Hybridisierung gesättigte Signalverläufe beobachtet. In der Literatur finden sich bis heute nur vereinzelt Berichte über die PCR-Produktanalyse in DNA-Biosensoren. Nilsson *et al.* [50] vermieden bei Experimenten zur Mutationsanalyse die direkte Hybridisierung von 185 bzw. 199 bp großen PCR-Produkten in einem BIAcore-Sensorchip durch eine sog. subtraktive Oligonukleotid-Hybridisierungsanalyse. Dabei wurden in parallelen Experimenten verschiedene Oligonukleotide der Wildtypsequenz mit den auf Mikropartikeln immobilisierten PCR-Produkten in Lösung hybridisiert. Lag in der Probe an einer bestimmten Position eine Punktmutation vor, erfolgte die Hybridisierung der entsprechenden komplementären Oligonukleotidsequenz aufgrund des mismatches nur noch eingeschränkt. Die entsprechend relativ hohe Konzentration des ungebundenen Oligonukleotids in der überstehenden Lösung wurde anschließend durch Hybridisierung im Sensorchip charakterisiert. O'Meara *et al.* [48] umgingen bei der Analyse eines 324 bp großen PCR-Produktes aus dem Hepatitis-C-Virus das Problem des *Re-Annealings*, indem sie vor der Hybridisierung im BIAcore-Sensor die biotinylierten PCR-Produkte auf Magnetpartikeln immobilisierten und denaturierten, so dass nach der Elution ein unmarkiertes, einzelsträngiges PCR-Produkt hybridisiert werden konnte. Die Hybridisierung von 143, 256 und 391 bp großen, doppelsträngigen PCR-Produkten mit einer 18mer-Sonde in einem BIAcore-Sensor nach vorangegangener Denaturierung durch Formamid und Erhitzen wurde von Kai *et al.* [194] beschrieben. Für den spezifischen und sensitiven Nachweis eines Pathogens in klinischen Proben nutzten sie eine Sondensequenz aus Peptidnukleinsäure (*peptide nucleic acid*, PNA), einem DNA-Analogon, in dem das Zuckerphosphatgerüst durch N-(2-aminoethyl)glycin-Einheiten ersetzt wurde [195]. In der Hybridisierungsanalyse werden PNAs häufig als alternative Sondenmoleküle eingesetzt, weil sich für PNA-DNA-Wechselwirkungen aufgrund der fehlenden elektrostatischen Abstoßung zwischen den Phosphatgruppen im Vergleich zu dsDNA eine bessere Hybridisierungseffizienz bei gleichzeitig erhöhten Schmelztemperaturen ergibt. Dadurch können auch auf relativ kurzen PNA-Sonden noch deutliche Hybridisierungssignale erhalten werden, weshalb sie besonders für den Nachweis von Punktmutationen noch besser geeignet sind als die entsprechenden DNA-Sonden [196]. Feriotta *et al.* [52] nutzten daher 9mer-PNA-Moleküle für den Nachweis einer

charakteristischen Punktmutation in einem 89 bp großen PCR-Produkt aus dem Gen der zystischen Fibrose, wobei sie auf der Streptavidin-beschichteten Oberfläche eines BIAcore-Sensors allerdings das doppelsträngige biotinylierte PCR-Produkt als Sonden-DNA immobilisierten, denaturierten und anschließend die Anbindung des PNA-Targets in Realzeit verfolgten. Dieses Hybridisierungsformat erlaubt allerdings keine Parallelisierung der Analyse verschiedener PCR-Produkte. In einem ganz anderen, etwas aufwendigeren Ansatz konnten Kai *et al.* [51] ein doppelsträngiges PCR-Produkt ohne vorangegangene Denaturierung mit einer 21mer-DNA-Sonde hybridisieren, weil die beiden unterschiedlich langen Einzelstränge zunächst separat asymmetrisch amplifiziert worden waren und nach dem *Annealing* ein PCR-Produkt mit einem einseitig um 42 nt überhängenden Einzelstrang bildeten. Sie wählten diese Methode, weil sie bei der Hybridisierung einzelsträngiger PCR-Produkte von mehreren 100 bp Länge die Bildung von intramolekularen Komplexen und Homodimeren befürchteten. Derartige Effekte haben die Hybridisierung im DNA-Sensorchip allerdings nicht negativ beeinflusst, wie besonders die Messungen zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln zeigten.

Wie im Bereich der optischen DNA-Biosensoren wurde die Detektion von PCR-Produkten bisher auch nur mit wenigen elektrochemischen [38,40] und piezoelektrischen [42,197] DNA-Biosensoren bearbeitet. Minunni *et al.* [197] verglichen in ersten grundlegenden Arbeiten zum Nachweis von GMOs z.B. den BIAcore-Sensor mit einem piezoelektrischen sowie einem elektrochemischen System, das Daunomycin als elektroaktiven Interkalator verwendete. Dabei ergab sich für die Analyse von PCR-Produkten aber besonders bei der elektrochemischen Detektion zunächst nur eine schlechte Reproduzierbarkeit und es wurde keine einheitliche Proportionalität zwischen dem Sensorsignal und der PCR-Produkt-Konzentration beobachtet. Ein ähnliches Problem trat auch bei Ozkan *et al.* [40] auf, die PCR-Produkte zum Nachweis der Faktor V Leiden-Mutation in einem elektrochemischen DNA-Biosensor mit Inosin-substituierten Oligonukleotidsonden hybridisierten. Durch den Einsatz eines parallelisierten Elektrodenarrays konnte dabei jedoch eine Diskriminierung homozygoter und heterozygoter Punktmutationen erreicht werden. Eine charakteristische Punktmutation des Apolipoprotein E-Gens konnte nach PCR durch die Hybridisierung der Amplifikate mit spezifischen, auf der Oberfläche eines Quarzkristalls immobilisierten Fangsonden anhand der beobachteten Änderung der Schwingungsfrequenz nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der schnellen Analyse im DNA-Sensorchip war eine Messung dabei allerdings erst nach 20 min zu Ende und das System zeigte eine deutlich geringere Sensitivität.

6.2 Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln

Wenn sich beim Nachweis einer bestimmten Spezies durch Hybridisierung des 377bp -PCR-Produktes aus dem *cytb*-Gen mit speziesspezifischen Sonden im DNA-Sensorchip oder auch konventionell auf DNA-Chips nur ein schwaches Signal ergibt, kann es dafür grundsätzlich drei Ursachen geben, nämlich eine geringe Konzentration der *Template*-DNA im PCR-Ansatz, eine schlechte Effizienz der Konsensus-PCR für die betrachtete Spezies sowie eine eingeschränkte Hybridisierungseffizienz der PCR-Produkte mit den immobilisierten Fangsonden. Um die Anwendbarkeit der Nachweismethode auf praktische Fragestellungen zu gewährleisten, wurde sie hier deshalb soweit optimiert, dass ein schwaches Fluoreszenzsignal schließlich, zumindest bei der Analyse von Fleischproben, nur noch auf eine geringe Konzentration der Spezies in der analysierten Probe zurückzuführen war.

Effizienz und Spezifität der PCR

Im ersten Schritt wurden daher Effizienz und Spezifität der PCR untersucht. Die Sequenzierung der 377bp-PCR-Produkte des *cytb*-Gens von Rind, Schwein, Huhn und Pute belegte, dass die Amplifikation spezifisch verlaufen war. Obwohl die auf Grundlage des Sequenzabgleichs für das *cytb*-Gen entwickelten Primersequenzen *cytb403* und *cytb779* hier nicht weiter optimiert wurden, ergaben sich für die verschiedenen Spezies noch vergleichbare PCR-Effizienzen, die nicht um mehrere Größenordnungen voneinander abwichen. Die im Vergleich zu den anderen Spezies etwas schlechtere Amplifikation der Spezies Ziege und Huhn beruht wahrscheinlich darauf, dass zwischen dem Primer *cytb403* und der *Template*-Sequenz in beiden Fällen eine Basenfehlpaarung auftrat, die nicht durch das Wobbeln erfasst wurde und besonders bei Ziege sehr ungünstig am 3'-Ende des Primers lag (vgl. Abb. 46). Dennoch erwies sich die PCR auch für diese beiden Spezies als ausreichend effektiv, um in verschiedenen Real- und Mischproben auch noch geringe Probenanteile nachzuweisen. Für eine noch gezieltere Angleichung der verschiedenen PCR-Effizienzen sollte allerdings vor der Anwendung der Nachweismethode in der Routineanalytik trotzdem eine weitere Primeroptimierung erfolgen. Dazu könnten zum einen die bisher verwendeten Primer mit einer statistischen Basenverteilung (*wobble*) an zusätzlichen Positionen speziell in *cytb403* eingesetzt werden. Die Verwendung eines an drei Positionen gewobbelten *reverse*-Primers zur Amplifikation eines 464 bp großen Abschnittes des *cytb*-Gens bewährte sich z.B. auch bei der Identifizierung zahlreicher Fischarten mittels PCR-RFLP nach Wolf *et al.* [141] (vgl. Abb. 5) und fand Einzug in eine §35-Methode. Für eine Verstärkung der Amplifikation des Ziege-PCR-Produktes könnten aber z.B. auch ungewobbelte, perfekt komplementäre *cytb403*- und *cytb779*-Primersequenzen dem PCR-Ansatz zugefügt werden. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, gruppenspezifische Primer z.B. für Geflügel zu entwickeln und sich damit zugunsten eines noch homogeneren Nachweises der verschiedenen

Spezies vom Konsensus-PCR-Konzept zumindest teilweise zu lösen. Dieser Ansatz wurde z.B. in einem Ringversuch des BgVV [174] bei dem Nachweis von Huhn und Pute in Brühwurst mittels PCR-RFLP verfolgt. Eine optimale Positionierung der Primersequenzen im *cytb*-Gen bei idealer Übereinstimmung der verschiedenen Primereigenschaften bedarf jedoch der Anwendung von speziell zum Primerdesign entwickelten Computerprogrammen, die in diesem Bereich mittlerweile standardmäßig eingesetzt werden (z.B. PrimerDesign, Primer3).

Für die effiziente Amplifikation der *Template*-DNA einer bestimmten Spezies ist ganz besonders auch die Stringenz der Reaktionsbedingungen ausschlaggebend. Durch die Wahl einer *Annealing*-Temperatur von 62°C konnte der 377bp-Abschnitt des *cytb*-Gens für alle untersuchten Spezies noch effizient amplifiziert werden, während gleichzeitig besonders bei der Analyse der DNA-Extrakte aus den Realproben mit komplexer Probenmatrix die Bildung unspezifischer Sekundärprodukte größtenteils verhindert wurde. Alternativ zur Variation der *Annealing*-Temperatur hätte die Stringenz bei konstanter Temperatur auch durch eine Variation der $MgCl_2$ -Konzentration optimiert werden können, da eine Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration zu einer deutlichen Stabilisierung der DNA-Doppelhelix und damit zu einer Erhöhung des T_m -Wertes führt. Grundsätzlich besteht bei der PCR ein komplexer Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der verschiedenen Reaktionskomponenten wie dNTPs, Primer, Polymerase und $MgCl_2$ [198], weshalb jedes neue PCR-System zunächst hinsichtlich dieser verschiedenen Aspekte optimiert werden muss. Für die Durchführung solcher Optimierungen bietet sich als schnelles Durchsatzverfahren die Analyse der PCR-Produkte im DNA-Sensorchip alternativ zu der deutlich zeitaufwendigeren PAGE an.

Unter den hier verwendeten Standardbedingungen konnten schließlich die Effizienz und die Spezifität der *cytb*-PCR zum Nachweis von Rind, Schwein, Huhn, Pute, Schaf und Ziege soweit gewährleistet werden, dass eine schwache Bande in der PAGE, entsprechend einer geringen Ausbeute der PCR, immer auch mit einer vergleichsweise geringen Konzentration der *Template*-DNA korrelierte. Eine Einschränkung ergab sich jedoch teilweise bei der Amplifikation von DNA-Extrakten aus Käseproben, in denen die komplexe Probenmatrix aus Proteinen und Lipiden inhibierend auf die PCR wirken kann. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Plath *et al.* [199] beim Nachweis von Kuhmilch in verschiedenen Käseproben mittels PCR-RFLP-Analyse des β -Casein-Gens gemacht und bestätigten systematische Untersuchungen von Rossen *et al.* [200] zum störenden Einfluss von zahlreichen Lebensmittelkomponenten auf die PCR. Die Störungen können jedoch durch eine gezielte Optimierung der DNA-Extraktion minimiert werden [200]. So gelang z.B. Rea *et al.* [129] die Differenzierung zwischen Kuh- und Büffelmilch in Mozzarella durch Duplex-PCR und Branciani *et al.* [138] die Identifizierung verschiedener Spezies in Mozzarella und griechischem Feta durch die 359bp-*cytb*-PCR nach Meyer *et al.* [136], jeweils nach

Anwendung angepasster, organischer Extraktionsmethoden. Am CVUA Münster erfolgte die Extraktion der Käseproben dagegen ausschließlich mit dem weit verbreiteten Wizard-Kit, der sich dort für Fleischproben bewährt hatte und für die Aufarbeitung der Käseproben nicht weiter optimiert worden war. Dementsprechend war dabei ein Extraktionsschritt mit Chloroform zur Entfernung von lipiden Bestandteilen (wie z.B. in Ref. [129,138]) nicht integriert. Durch eine Anpassung des Extraktionsverfahrens könnte die PCR zur Amplifikation des 377 bp großen *cytb*-Genabschnittes sicherlich auch für DNA-Extrakte aus Käseproben noch an Zuverlässigkeit gewinnen. Insgesamt wurde die Amplifikation von *Template*-DNA aus Käse in der Literatur bisher jedoch nur selten beschrieben [129,138,199-202], so dass nur wenige Referenzmethoden zur Verfügung stehen.

Um Störungen der PCR durch Matrixeffekte in Zukunft sicherer nachweisen zu können, sollte dem PCR-Ansatz eine zusätzliche *Template*-DNA als interne Amplifikationskontrolle zugesetzt werden. Die Vorteile einer solchen Amplifikationskontrolle wurden z.B. ausführlich von Brunnert [203] beschrieben. Als definierten Standard würde man dafür eine Plasmidsequenz auswählen, die ebenfalls Bindungsstellen für die Primer *cytb*403 und *Cy5cytb*779 aufweisen sollte. Ideal für eine einfache Detektion des internen Kontroll-Produktes durch eine zusätzliche Sonde im DNA-Sensorchip wären z.B. die entsprechenden Abschnitte des *cytb*-Gens von Maus oder Mensch. Die Konzeption des Standards könnte auch vorsehen, dass die Größe des Kontroll-Amplifikates deutlich von den 377bp-*cytb*-PCR-Produkten abweicht, so dass eine Aussage bezüglich des Reaktionsverlaufes der PCR auch durch PAGE möglich wäre.

Effizienz und Spezifität der Sondenhybridisierung

Solange eine effiziente Amplifikation des 377 bp großen Sequenzabschnittes aus dem *cytb*-Gen gewährleistet ist, spielen für den sicheren Nachweis der jeweiligen Spezies die Effizienz bei der Hybridisierung der PCR-Produkte mit den immobilisierten Sonden sowie die Spezifität der Sonden signale eine entscheidende Rolle. Der Vergleich der Hybridisierungseffizienzen sowohl bei der konventionellen Chiphybridisierung als auch im DNA-Sensorchip zeigte, dass durch die Einführung der Schwein566-Sonde der Nachweis des Schwein-PCR-Produktes im Gegensatz zur Detektion mit der zunächst gewählten Schwein684-Sonde deutlich verbessert werden konnte. Auch dadurch ergaben sich letztlich für den Nachweis der sechs verschiedenen Spezies vergleichbare Effizienzen. Absolut identische Bindungsstärken für die unterschiedlichen Sondensequenzen sind allerdings ohnehin nicht zu realisieren, so dass grundsätzlich bei der Anwendung der Chiptechnologien in der Praxis für die verschiedenen Spezies mit variierenden Nachweisgrenzen gerechnet werden muss. Dementsprechend ist z.B. für Ziege im Vergleich zu den anderen Spezies bei Anwendung der

Realzeithybridisierungsmethode eine etwas schlechtere Nachweisgrenze zu erwarten. Hinzu kommt, dass sich für Ziege auch eine vergleichsweise geringe PCR-Effizienz zeigte.

Eine mögliche Ursache dafür, dass der Vergleich der Hybridisierungseffizienzen bei der konventionellen Chiphybridisierung und der Realzeithybridisierung im DNA-Sensorchip größtenteils zu unterschiedlichen Ergebnissen führte, liegt darin, dass die Anbindung unter dem Deckgläschen über einen viel längeren Zeitraum und im Gegensatz zur Realzeithybridisierung unter diffusionskontrollierten Bedingungen beobachtet wurde. Dabei ist auch zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse der konventionellen Chiphybridisierung mit einem deutlich größeren statistischen Fehler behaftet waren. Insgesamt ließ sich besonders für die Ergebnisse der Analyse im DNA-Sensorchip zumindest teilweise eine Korrelation zwischen den Signalstärken und den unterschiedlichen Sondeneigenschaften feststellen. So weist die Schwein566-Sonde mit 65 % den größten GC-Gehalt und gleichzeitig auch die höchste Hybridisierungseffizienz auf, während die GC-Gehalte von der Rind684- über die Schaf684- hin zur Huhn684-Sequenz abnehmen und entsprechend auch leicht rückläufige Anbindungsstärken beobachtet wurden bis hin zur P684-Sonde mit dem geringsten GC-Gehalt von 40 %. Nur für die Z684-Sonde war trotz eines GC-Gehaltes von 50 % die Signalstärke unerwartet niedrig. Dadurch wurde deutlich, dass Sondeneigenschaften wie GC-Gehalt und, davon abgeleitet, T_m -Wert zumindest in erster Näherung Aufschluss geben über Qualität und Hybridisierungseffizienz einer Sondensequenz, wodurch das Design weiterer Sonden grundsätzlich planbarer wird. Darüberhinaus haben aber auch Faktoren wie die Verteilung von G und C innerhalb der Sequenz sowie Sekundärstrukturen von Sonde und Target Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die heute zur Verfügung stehenden Modelle nur die Berechnung der T_m -Werte von freien Oligonukleotidsequenzen in Lösung ermöglichen, deren Eigenschaften von den entsprechenden oberflächengebundenen Sequenzen deutlich abweichen können. So haben z.B. GC-Paarungen im oberflächennahen Bereich 5'-gebundener Sonden eine geringere Auswirkung auf die Bindungsstärke als solche im zentralen Bereich und in 3'-Nähe. Die zahlreichen Faktoren, die bei der Entwicklung eines Sondensets mit möglichst einheitlicher Hybridisierungseffizienz eine Rolle spielen, wurden ausführlich von Bodrossy *et al.* [160] beschrieben.

Die Spezifität bei Hybridisierung der PCR-Produkte mit den ausgewählten Sondensequenzen ab Position 566 bzw. 684 des *cytb*-Gens wurde sowohl bei der konventionellen Chiphybridisierung als auch bei der Realzeithybridisierung im DNA-Sensorchip untersucht. In beiden Fällen traten an einzelnen Sonden Kreuzhybridisierungen auf. Diese waren jedoch im Rahmen der Möglichkeiten der jeweiligen Nachweismethode reproduzierbar und charakteristisch für die Detektion bestimmter Spezies, so dass unter Berücksichtigung der bekannten Kreuzhybridisierungen dennoch eine eindeutige Auswertung möglich war. Man kann dabei grundsätzlich zwei verschiedene Arten der Kreuzhybridisierung unterscheiden. Zum einen

ergaben sich erwartete Wechselwirkungen, die auf das Auftreten nur weniger Basenfehlpaarungen zwischen Sonde und Target zurückzuführen sind, wie z.B. bei der Anbindung von Ziege-PCR-Produkt an der Schaf566-Sonde mit lediglich zwei mismatches im Randbereich der Sondensequenz. Zum anderen wurden aber auch Kreuzreaktivitäten zwischen deutlich weniger homologen Sequenzen beobachtet, die eher durch das Auftreten sekundärer Wechselwirkungen zu erklären sind und nicht das für eine mismatch-Hybridisierung charakteristische Verhalten bei Variation der Stringenzbedingungen zeigten. Ein typisches Beispiel dafür ist die Anbindung des Schwein-PCR-Produktes an der Ziege684-Sonde trotz neun mismatches zwischen den cytb-Sequenzen beider Spezies im Bereich der Sondensequenz. Ein deutlicher Vorteil ergab sich bei der Hybridisierung im DNA-Sensorchip dadurch, dass solche „echten“ Kreuzhybridisierungen dabei nur in deutlich geringerem Maß als bei der konventionellen Chiphybridisierung auftraten. Letztlich musste bei der Sensorchipanalyse außer der aufgrund der Sequenzhomologie erwarteten Kreuzhybridisierung von Ziege-PCR-Produkt mit der Schaf566-Sonde nur die echte Kreuzhybridisierung von Schwein-PCR-Produkt mit der Ziege684-Sonde berücksichtigt werden. Zwar wird bei der Anwendung in der Routineanalytik der simultane Nachweis von Schwein und Ziege üblicherweise ohnehin nicht verlangt, weil Schwein nur in Fleisch-, Ziege dagegen in Milch- und Käseproben nachgewiesen werden muss. Dennoch können beide Spezies mit dem entwickelten Sondenset im Sensorchip parallel detektiert werden, wenn die Schaf566-Sonde als gruppenspezifische Sonde zum Nachweis von Schaf und Ziege aus der Unterfamilie der Ziegenartigen eingesetzt wird.

Tab. 18 Signalprofil beim Nachweis der Spezies Schwein, Schaf und Ziege durch Realzeit-hybridisierung im DNA-Sensorchip

Signalintensitäten für die verschiedenen Sonden bei der Hybridisierungsanalyse von Proben, welche die drei Spezies einzeln oder in unterschiedlicher Mischung enthalten, -: keine Anbindung, +: schwache Anbindung, ++: starke Anbindung.

Probe	Spezies	Ziege684	Schaf684	Schaf566*	Schwein566
A	Schwein	+ (6-8 %)	-	-	++
B	Schaf	-	++	++	-
C	Ziege	++	-	++	-
D	Schwein + Ziege	++	-	++	++
E	Schaf + Ziege	++	++	++	-
F	Schwein + Schaf	+ (≤ 8 % zu S566)	++	++	++

* gruppenspezifische Sonde für Ziegenartige

Tab. 18 verdeutlicht, dass bei Analyse einer Probe mit Schwein und Ziege im Sensorchip Signale an den Sonden Schwein566, Ziege684 und Schaf566 detektiert werden, wobei der

fehlende Signalanstieg an der Schaf684-Sonde Schaf als Probenbestandteil ausschließt (D). Entsprechend ergeben sich auch bei dem Nachweis von Schaf und Ziege in einer Probe keine Probleme durch Kreuzhybridisierung (E), wie z.B. die Analyse des Schafskäses P-21/22 zeigte. Bei der Analyse einer Mischung aus Schwein und Schaf tritt dagegen durch Kreuzhybridisierung des Schwein-PCR-Produktes ein Signal an der Ziege684-Sonde auf, weshalb Ziege als Probenbestandteil erst festgestellt werden dürfte, wenn das Signal an der Ziege684-Sonde deutlich mehr als 8 % des Schwein566-Signals betragen würde (F). Eine entsprechende Mischprobe aus Schaf und Schwein wurde z.B. mit der Lammbratwurst P-11 korrekt bestimmt, in der eine Verunreinigung durch Ziege aber ohnehin nicht erwartet bzw. sinnvoll gewesen wäre.

Ein Nachteil bei Analyse der verschiedenen Mischungen aus Schwein, Schaf und Ziege ergibt sich allerdings bei der konventionellen Hybridisierung unter dem Deckgläschen (Tab. 19), wo zusätzlich schwache Kreuzhybridisierungen von Schwein-PCR-Produkt mit der Schaf566-Sonde sowie von Schaf-PCR-Produkt mit der Ziege684-Sonde auftreten (jeweils < 5 %, vgl. Tab. 11). Daher kann die Schaf566-Sonde hier nur bedingt als gruppenspezifische Sonde eingesetzt werden, weil schwache Signale an den Sonden Ziege684 und Schaf566 von 10-30 % bzw. bis zu 5 % des Schwein566-Signals in diesem Fall sowohl durch eine geringe Zumischung von Ziege als auch durch Kreuzhybridisierung von Schwein-PCR-Produkt verursacht worden sein können (D).

Tab. 19 Signalprofil beim Nachweis der Spezies Schwein, Schaf und Ziege durch konventionelle Chiphybridisierung

Signalintensitäten für die verschiedenen Sonden bei der Hybridisierungsanalyse von Proben, welche die drei Spezies einzeln oder in unterschiedlicher Mischung enthalten, -: keine Anbindung, +: schwache Anbindung, ++: starke Anbindung.

Probe	Spezies	Ziege684	Schaf684	Schaf566*	Schwein566
A	Schwein	+ (10-30 %)	-	+ (< 5 %)	++
B	Schaf	+ (< 5 % zu Sf684)	++	++	-
C	Ziege	++	-	++	-
D	Schwein + Ziege	++	-	++	++
E	Schaf + Ziege	++	++	++	-
F	Schwein + Schaf	+ (10-30 % zu S566)	++	++	++

* gruppenspezifische Sonde für Ziegenartige

Ein Problem stellt dabei auch der Nachweis geringer Mengen Ziege neben Schaf dar, weil ein schwaches Ziege684-Signal von bis zu 5 % des Schaf684-Signals auch auf eine Kreuzhybridisierung durch Schaf zurückgeführt werden kann (E). Aufgrunddessen war z.B. auch der eindeutige Nachweis von Ziege bei Analyse des Schafskäses P-21/22 durch

konventionelle Chiphybridisierung nicht möglich. Der Nachweis auch kleiner Mengen Schaf neben Schwein ist allerdings eindeutig möglich aufgrund des Signals an der Schaf684-Sonde, das nicht auf Kreuzhybridisierung zurückgeführt werden kann. Eine Zumischung von Ziege kann dabei solange ausgeschlossen werden, solange das durch Kreuzhybridisierung von Schwein-PCR-Produkt verursachte Signal an der Ziege684-Sonde nicht deutlich mehr als 30 % des Schwein566-Signals beträgt (F).

Um eine noch eindeutigere Differenzierung der Spezies in einer Lebensmittelprobe besonders bei Analyse der *cytb*-PCR-Produkte durch konventionelle Chiphybridisierung zu ermöglichen, soll daher in zukünftigen Arbeiten eine alternative Sonde für Ziege entwickelt werden, die einen spezifischen Nachweis, zumindest ohne Kreuzhybridisierung durch Schwein und Schaf ermöglicht. Die zu Schaf566 und Schwein566 analoge Ziege566-Sonde stellt dabei keine sinnvolle Alternative dar, weil aufgrund der nur zwei mismatches zum Schaf-PCR-Produkt im Randbereich der Sondensequenz eine deutliche Kreuzhybridisierung zu erwarten wäre (vgl. Anhang Abb. 108). Die schwache Auswirkung einzelner mismatches im Bereich des 5'-Terminus der Sondensequenz auf die Schmelztemperatur T_m wurde auch von Urakawa *et al.* [204] bei der konventionellen Hybridisierung auf DNA-Mikroarrays demonstriert, als sie sowohl für Position und Art des mismatches als auch für den Formamidgehalt des Waschpuffers den Einfluss auf T_m systematisch untersuchten. Wie der Test der Sonde Ziege703 zeigte, erweist sich das Design einer alternativen Ziegesonde aufgrund der Verwandtschaft zwischen Ziege, Schaf und Rind als Vertreter der Familie der Hornträger und aufgrund des Zusammenhangs zwischen Sondeneigenschaften und -qualität als durchaus kompliziert. Die Konzeptionierung der Sondensequenz soll deshalb in Zukunft unterstützt durch eine neue, von Dipl.-Chem. Eric Frauendorfer entwickelte Software erfolgen, welche die Kombination der Anforderungen an die Sondenlänge, den GC-Gehalt sowie Art und Position der mismatches innerhalb der Sondensequenz berücksichtigt. Sollte allerdings auch dadurch keine geeignete Sondensequenz für die spezifische Detektion des 377bp-PCR-Produktes von Ziege ermittelt werden können, würde der Nachweis weiterhin wie bereits in Tab. 18 angedeutet auf der kombinierten Auswertung verschiedener Sonden signale beruhen. Das Ergebnis könnte dabei durch die Entwicklung zusätzlicher gruppenspezifischer Sonden im Sinne eines hierarchischen Hybridisierungskonzeptes (vgl. 6.3) noch weiter abgesichert werden.

Um die sensitive Fläche sowohl im DNA-Sensorchip als auch bei der Hybridisierung unter dem Deckgläschen möglichst effektiv zu nutzen und eine gewisse Redundanz der Ergebnisse zu gewährleisten, sollten die verschiedenen Spezies in der praktischen Anwendung außerdem auf verschiedenen charakteristischen Sondensequenzen parallel detektiert werden. Dadurch würden etwa Signalausfälle einzelner Sonden, z.B. verursacht durch einen Fehler des Dispensers bei der Immobilisierung, nicht automatisch zu Falschinterpretationen

führen. Außerdem könnte sich dadurch das mögliche Auftreten polymorpher Positionen innerhalb einer Art weniger auf das Ergebnis der Bestimmung auswirken. Im ersten Schritt würde sich dafür beispielsweise die zusätzliche Immobilisierung der Sonden Rind566, Pute566 und Huhn566 anbieten. Je größer die Anzahl der unterschiedlichen immobilisierten Sondensequenzen im Array wäre, desto komplizierter würde sich allerdings auch das Sondendesign im Hinblick auf möglichst einheitliche Hybridisierungseffizienzen und – gerade bei der konventionellen Hybridisierung – auf mögliche Kreuzhybridisierungen gestalten. Die Variation der Stringenzbedingungen zur Optimierung der Spezifität bei der konventionellen Chiphybridisierung hat hier bereits verdeutlicht, dass sich auch schon bei einem übersichtlichen Sondenarray mit weniger als zehn verschiedenen Sequenzen unterschiedliche optimale Bedingungen für die einzelnen Hybridisierungsreaktionen ergaben. Bei einer weiteren Ausdehnung des Sondenarrays eventuell auch auf die Detektion einer größeren Zahl verschiedener Spezies im Rahmen noch komplexerer Fragestellungen müsste die Hybridisierung dementsprechend für eine ausreichende Spezifität der einzelnen Bindungsreaktionen wahrscheinlich bei unterschiedlichen Stringenzbedingungen beobachtet werden. Eine Alternative wäre in diesem Fall nach der Hybridisierung unter wenig spezifischen Bedingungen die Analyse der Dissoziationsphase durch eine Serie von Waschschritten bei zunehmender Stringenz, analog dem Ansatz zur Mikroorganismendetektion im DNA-Sensorchip (vgl. 6.3).

Ein weiteres Hilfsmittel, das zur Steigerung der Hybridisierungseffizienz und damit zu einer Verbesserung der Nachweisgrenzen oder aber auch zur gezielten Anpassung der Eigenschaften einzelner Sondensequenzen genutzt werden kann, ist der Einsatz Oligonukleotid-analoger Sonden mit modifizierter Phosphodiester-Bindung. Bei deren Immobilisierung ergeben sich deutlich stärkere Wechselwirkungen mit den komplementären Targetsequenzen, weil die Abstoßung der negativen Ladungen im Zucker-Phosphat-Rückgrat aufgehoben ist. In Methylphosphonaten ist z.B. das negativ geladene Sauerstoffatom des Phosphodiesters durch eine Methylgruppe ersetzt worden und pro Einbau eines entsprechenden Nukleotids können doppelsträngige Strukturen um 2-4°C stabilisiert werden [205]. Eine entsprechende Wirkung kann, wie bereits erwähnt, auch durch die Immobilisierung von PNA-Sonden erreicht werden. Ausführlich verglichen wurden sowohl die Intensität als auch die Spezifität von PNA-DNA-, PNA-RNA-, DNA-DNA und PNA-PNA-Wechselwirkungen bei der Hybridisierung in einem BIAcore-Sensor für eine 15mer-Sequenz von Jensen *et al.* [188]. Dabei wurde wie erwartet in der Reihenfolge von PNA-PNA > PNA-RNA > PNA-DNA > DNA-DNA ein abnehmender T_m -Wert beobachtet. Ein besonderer Vorteil könnte sich bei der Tierartenidentifizierung mit PNA-Sonden durch die Tatsache ergeben, dass auch an kürzeren Sonden noch eine deutliche Bindung stattfinden kann. Dadurch könnten eventuell auch besonders nah verwandte Spezies wie z.B. Schaf, Ziege und Rind auf Basis weniger mismatches noch

differenziert werden, weil der prozentuale Anteil und damit die destabilisierende Wirkung einzelner mismatches in den kürzeren Hybridisierungssequenzen umso größer wäre. Einen Nachteil stellen dagegen die im Vergleich zu DNA-Sonden höheren Kosten der Oligonukleotid-analogen Sondensequenzen dar, so dass ihre Anwendung grundsätzlich nur in einem *low-density*-Array mit einer geringen Zahl verschiedener Sonden sinnvoll erscheint.

Asymmetrische PCR

Durch die Untersuchungen zur Variation des Primerverhältnisses wurde demonstriert, dass sich bei der *cytb*-PCR unter Standardbedingungen trotz der Verwendung von jeweils 10 pmol *forward*- bzw. *reverse*-Primer eine asymmetrische Verteilung der amplifizierten Einzelstränge im Produkt ergab, wobei der hier Cy5-markierte *antisense*-Strang in einem deutlichen Überschuss vorlag. Diese Beobachtung ist jedoch insofern nicht ungewöhnlich, als dass sich bei neu konzipierten PCR-Systemen trotz einer ausgeglichenen Konzentration der Primer aufgrund verschiedener Ursachen häufig eine asymmetrische Produktverteilung ergeben kann. Deshalb schlagen die üblichen Optimierungsprotokolle vor, das Primerverhältnis zunächst standardmäßig zu variieren. Als eine mögliche Ursache für die Entstehung asymmetrischer PCR-Produkte kommt etwa eine fehlerhafte Bestimmung der Primerkonzentrationen durch Absorptionmessung bei 260 nm in Frage, z.B. aufgrund einer ungenauen Angabe für den Extinktionskoeffizienten. Möglich ist außerdem, dass die Primersequenzen unerwartete Sekundärstrukturen bilden, die sich entweder auf das Absorptionsverhalten oder aber auch auf die Reaktivität der Primer in der PCR auswirken können. In dem vorliegenden Fall ist der asymmetrische Reaktionsverlauf der PCR aber wahrscheinlich auf Effizienzunterschiede beim *Annealing* der beiden Primer zurückzuführen. Zwar weisen beide Sequenzen mit T_m -Werten von 65°C für *cytb779* und 62°C für *cytb403* zumindest formell ähnliche Voraussetzungen auf, allerdings lassen diese Parameter ähnlich wie bei der Sondenhybridisierung noch keinen direkten Schluss auf das Bindungsverhalten zu. Die Schmelztemperatur des *cytb403*-Primers wurde dabei nämlich nur über eine Verlängerung der Sequenz um zwei Nukleotide erreicht, wodurch der GC-Gehalt jedoch noch weiter sank und so bereits ein deutlicherer Unterschied mit 56 % für *cytb779* und 44 % für *cytb403* bestand. Die hier gewählte relativ hohe *Annealing*-Temperatur von 62°C hat wahrscheinlich maßgeblich dazu beigetragen, dass die Bindung des *cytb779*-Primers bevorzugt wurde und schneller ablief. Ein deutlicher Vorteil bestand bei der Hybridisierungsanalyse der asymmetrischen PCR-Produkte darin, dass die Sondenanbindung des überschüssigen, einzelsträngigen *antisense*-Stranges nicht durch ein *Re-Annealing* des komplementären *sense*-Stranges gestört wurde. Durch die insgesamt größere Hybridisierungseffizienz wurden somit höhere Signalintensitäten als bei der Analyse der ausschließlich doppelsträngig vorliegenden PCR-Produkte erreicht (vgl. Abb. 83 B). Die Tatsache, dass dabei außerdem auf eine vorangegangene

Denaturierung verzichtet werden konnte, stellt nicht nur hinsichtlich des zeitlichen Arbeitsaufwandes einen Vorteil dar, sondern unterstützt auch die Absicht, auf Dauer ein optimiertes Sensorchipsystem mit einer integrierten Amplifikation der Probe zu entwickeln. Dieser „Lab-on-a-chip“-Ansatz zur Miniaturisierung analytischer Methoden wurde in den letzten Jahren besonders im Bereich der biomedizinischen Analytik verfolgt und beabsichtigt eine Kombination verschiedener Arbeitsschritte wie z.B. Probenvorbereitung, Mischung verschiedener Reagenzien, Probentrennung und Detektion. Die Vorteile miniaturisierter Systeme liegen bei verkürzten Analysezeiten, geringeren Proben- bzw. Abfallmengen, geringeren Kosten, der Portabilität der Analyseneinheiten und letztlich einer Erhöhung der Qualität der Analyseergebnisse. Ein zentrales Element der meisten mikrofluidischen Bauelemente stellen dabei kapillarelektrophoretische Trennmethode dar. So wurden bereits zahlreiche Einheiten entwickelt, in denen die DNA-Amplifikation mit einer elektrophoretischen Analyse der PCR-Produkte kombiniert ist [206,207]. Kommerziell angeboten wird z.B. bereits der Agilent 2100 bioanalyzer von Agilent (Palo Alto, USA). Die Kopplung der Amplifikation mit einer Hybridisierungsanalyse der PCR-Produkte auf einem Sondenarray in einem System wurde dagegen bisher kaum beschrieben, würde aber hinsichtlich der simultanen Analyse vieler verschiedener Targetsequenzen noch ganz neue Möglichkeiten eröffnen. Zunehmend spielen Lab-on-a-chip-Systeme auch im Bereich der Proteinanalytik eine Rolle [208].

Die direkte Hybridisierung asymmetrischer PCR-Produkte in Realzeit ohne vorangegangene Denaturierung wurde für verschiedene Anwendungen auch schon bei der Analyse in einem BIAcore-Sensor genutzt. Bianchi *et al.* [49] wiesen z.B. mit einer 28mer-Sonde zwei charakteristische *sense*-Sequenzen des HIV-1-Genoms nach, die durch Amplifikation mit einem *forward(f)*- und zwei unterschiedlichen *reverse(r)*-Primern bei einem Verhältnis von 10:1 entstanden waren. Durch die Hybridisierung verschiedener PCR-Produkt-Volumina im Bereich von 3-18 μ l konnten sie ansatzweise die Abhängigkeit des Gleichgewichtssignals von der eingesetzten PCR-Produktmenge demonstrieren, allerdings ergab sich dabei nicht wie im DNA-Sensorchip über mindestens eine Dekade ein streng linearer Zusammenhang. Mittels einer kapillarelektrophoretischen Analyse konnten die einzelsträngigen PCR-Produkte dabei außerdem von der dsDNA unterschieden werden, die bei einer Amplifikation mit ausgeglichenem Primerverhältnis entstand. Eine Methode zum Nachweis genetisch modifizierter Roundup-Ready-Sojabohnen entwickelten Feriotto *et al.* [53], indem sie ein 157bp-Soja-Lectin-PCR-Produkt sowie ein 139bp-Roundup-Ready-PCR-Produkt bei einem Primerverhältnis von 50:1 (f:r) erzeugten und diese anschließend durch spezifische Hybridisierung sowohl mit 15mer-Sonden als auch mit immobilisierten PCR-Produkt-Sequenzen im BIAcore-Sensor detektierten. Dabei zeigten sich bei der Anbindung an den deutlich längeren PCR-Produkt-Sonden intensivere Signalintensitäten. Vergleichbare Ergebnisse wurden wie

auch bei Bianchi *et al.* [49] mit aufgereinigten und nicht-aufgereinigten PCR-Produkten erhalten.

Cy5-Markierung

Neben der in dieser Arbeit standardmäßig durchgeführten Cy5-Primer-Markierung der cytb-PCR-Produkte erwies sich auch der Einbau Cy5-markierter dUTP-Bausteine für die effiziente Synthese fluorophormarkierter Amplifikate als geeignet. Der besondere Vorteil dieser alternativen Markierungsmethode besteht darin, dass sie auf beliebige PCR-Systeme angewendet werden kann, für die in der Regel unmodifizierte Primer bereits zur Verfügung stehen. Dadurch muss gerade in Optimierungsphasen nicht jeder Primer mit der vergleichsweise teuren Cy5-Markierung bestellt werden. Außerdem können die im Vergleich zur Cy5-Primer-Markierung höheren Markierungsgrade die Signalintensitäten bei der Hybridisierung verstärken. Wie auch die Hybridisierung der PCR-Produkte zur Mikroorganismendetektion zeigte, können die Cy5-dUTP- bzw. Cy5-dCTP-markierten PCR-Produkte nach einer einfachen Aufreinigung ohne eine Beeinträchtigung des Messsignals durch einen hohen Fluoreszenzhintergrund im DNA-Sensorchip vermessen werden. Grundsätzlich ist aber sogar die Analyse der nicht-aufgereinigten Cy5-dUTP-markierten PCR-Produkte möglich, wobei es jedoch zu Beginn der Messung sehr schnell zu einer unspezifischen Adsorption der markierten Nukleotide an die Oberfläche kommt. Die spezifische Hybridisierung der Targetmoleküle wird dadurch aber letztlich nicht beeinflusst, was auch Watterson *et al.* [73] mit einem faseroptischen DNA-Biosensor für die Detektion fluorophormarkierter komplementärer Target-DNA bei einer starken unspezifischen Adsorption nicht-komplementärer Oligonukleotide demonstrierten.

Für die Standardanwendung in der Routineanalytik ist die Cy5-dUTP-Markierungsmethode allerdings im Vergleich zur Cy5-Primer-Methode weitaus weniger geeignet, weil sie mit deutlich höheren Kosten verbunden ist. Legt man eine Standard-PCR mit 10 pmol je Primer pro Ansatz zugrunde, ergeben sich z.B. bei der Durchführung von 100 PCR-Ansätzen für den Cy5-Baustein Kosten von ca. 2.50 € bei der Cy5-Primer-Markierung bzw. ca. 760 € bei der Cy5-dUTP-Markierung, wenn pro Ansatz 25 µM Cy5-dUTP eingesetzt werden (Preise in Anlehnung an Preislisten von MWG-Biotech (Ebersberg) bzw. Amersham Biosciences (Freiburg)). Einen Vorteil bietet die Cy5-dUTP-Methode daher nur dann, wenn viele verschiedene Primersequenzen, beispielsweise im Rahmen einer Ausweitung der Methode zur Tierartendifferenzierung auf zusätzliche Spezies, getestet oder optimiert werden sollen, weil dann die deutlich günstigeren unmarkierten Primersequenzen eingesetzt werden können. Unabhängig davon wurde die Cy5-dUTP-Markierung in der vorliegenden Arbeit angewendet, weil dadurch mechanistische Studien zur Charakterisierung des asymmetrischen PCR-Verlaufes durchgeführt werden konnten. Die Zahlen verdeutlichen auch, dass

eine Erhöhung der Primergesamtmenge im Standard-PCR-Ansatz auf jeweils 80 pmol Primer zwecks einer weiteren Verbesserung der Nachweisgrenzen in zukünftigen Arbeiten im Grunde unproblematisch ist, weil die Kosten dabei im Vergleich zur Cy5-dUTP-Markierung immer noch vernachlässigbar gering bleiben würden. In Tab. 20 sind noch einmal die Vor- und Nachteile der beiden in dieser Arbeit angewendeten Markierungsmethoden zusammengefasst dargestellt, um die mittels der Cy5-dUTP-Markierung erweiterte Anwendungsbreite der PCR-Methode zu verdeutlichen.

Tab. 20 Vor- und Nachteile der Methoden zur Cy5-Markierung der PCR-Produkte

	Cy5-Primer	Cy5-dUTP
Vorteil	<ul style="list-style-type: none"> - kein störender Fluoreszenzhintergrund, Aufreinigung überflüssig - kostengünstig bei Routineanwendung 	<ul style="list-style-type: none"> - flexible Primeroptimierung ohne Markierung - höhere Markierungsgrade / Signalintensitäten möglich
Nachteil	<ul style="list-style-type: none"> - Markierungsgrad nicht variabel - kostenintensiv bei Primeroptimierung 	<ul style="list-style-type: none"> - sehr kostenintensiv bei Anwendung in größerem Umfang - störender Fluoreszenzhintergrund, Aufreinigung empfehlenswert

Charakterisierung des quantitativen Potentials von PCR und Realzeit-Hybridisierung

Nachdem die grundlegenden Aspekte zur Optimierung der PCR sowie zur Bestimmung von Effizienz und Spezifität der Sondenhybridisierung im DNA-Sensorchip untersucht worden waren, wurde die Nachweismethode zur Tierartendifferenzierung vor der Analyse von Realproben zunächst hinsichtlich ihres Potentials zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Spezies einzeln und in Mischung näher charakterisiert. Bei der Detektion der Verdünnungsreihen für die PCR-Produkt-Pools von Huhn bzw. Ziege ergab sich über mindestens eine Dekade ein streng linearer Zusammenhang zwischen Signalintensität und PCR-Produkt-Volumen. Dadurch wurde demonstriert, dass die Signalintensitäten der Realzeit-Hybridisierung nicht nur bei der Analyse von Targetoligonukleotiden, sondern auch von PCR-Produkten eine direkte quantitative Bewertung der Analytkonzentration in der Hybridisierungsprobe erlauben. Die Ergebnisse bestätigten außerdem die sehr gute Reproduzierbarkeit der Methode. Von ähnlichen Variationskoeffizienten im Bereich von meist deutlich unter 10 % wurde auch für die Detektion von PCR-Produkten im BIAcore-System berichtet [52,194]. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass im DNA-Sensorchip für Huhn und Ziege Nachweisgrenzen von 0.08 µl bzw. 0.34 µl eines typischen PCR-Produktes erhalten wurden, deutet sich der große Spielraum beim Nachweis auch kleinster Konzentrationen der cytb-

PCR-Produkte an, von denen pro Ansatz 25 µl für die weitere Analyse zur Verfügung stehen. Die Konzentrationen der PCR-Produkt-Pools betragen dabei in grober Näherung etwa 300 nM, so dass z.B. bei der Hybridisierung von 3 µl PCR-Produkt eine Konzentration von 7.5 nM in der Probenlösung vorlag. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Hybridisierung von Cy5-markierten Targetoligonukleotiden z.B. für Huhn zeigt, dass vergleichbare Signalintensitäten bereits mit etwas geringeren Targetkonzentrationen erhalten wurden. Die gegenüber den 46mer-Targetmolekülen leicht verringerte Hybridisierungseffizienz der 377bp-PCR-Produkte kann auf deren deutlich größeren sterischen Anspruch zurückgeführt werden, wobei zusätzlich auch Sekundärstrukturen die Anbindung behindern können.

Die Analyse von Mischproben verschiedener Spezies und eine Abschätzung der Nachweisgrenzen bei der entwickelten Methode erfolgten systematisch in drei Schritten. Zunächst wurden Mischungen der reinen PCR-Produkte von Huhn und Schaf hybridisiert, wodurch die störungsfreie, parallele Detektion beider Spezies eindeutig demonstriert werden konnte. Im Anschluss daran wurden zunächst PCR-Produkte aus definierten Mischungen der *Template*-DNA von Rind und Huhn und schließlich die Amplifikate von DNA-Extrakten aus Mischungen der rohen Fleisch- bzw. Käseprodukte analysiert, um die Bedingungen beim Nachweis auch geringer Probenbestandteile in Realproben schrittweise anzunähern. In den ersten Versuchen erwies sich der Nachweis einer Zumischung von 1 % auf Amplikonebene noch als problematisch. Als ein Vorteil der Detektionsmethode wurde aber auch dabei deutlich, dass bei der Anwendung in der Praxis eine flexible Anpassung des analysierten PCR-Produkt-Volumens möglich ist, um auch noch sehr geringe Amplikon-Konzentrationen in der Probenlösung nachzuweisen. Bei der Analyse der auf *Template*-Ebene hergestellten Mischproben konnten 1%ige Zumischungen, die hier einer *Template*-Konzentration von 4 pg Huhn- bzw. Rind-DNA/µl entsprachen, dagegen sehr deutlich nachgewiesen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der PCR die geringen *Template*-Konzentrationen überproportional amplifiziert wurden. Deshalb ergaben sich auch bei der Hybridisierungsanalyse der PCR-Produkte M-2 und M-6 mit je 1 % Huhn- bzw. Rind-*Template*-DNA auf den korrespondierenden Sonden im Verhältnis zu dem jeweiligen Hauptbestandteil unerwartet hohe Signalintensitäten (vgl. Abb. 88). Die Konzentration c_n der PCR-Produkte nach n Zyklen ergibt sich nach

$$c_n = c_0 (1 + E)^n \quad (\text{Gl. 16})$$

mit der *Template*-Konzentration c_0 und der Amplifikationseffizienz E ($0 \leq E \leq 1$). Das Verhältnis der *Template*-Konzentrationen blieb im Produkt deswegen nicht erhalten, weil beide Amplifikationen mit unterschiedlicher Effizienz abliefen. Insbesondere war auch die Effizienz nicht über alle n Zyklen konstant, sondern nahm während der Reaktion ab. Dabei erreichte die Amplifikationsrate für die höher konzentrierte Spezies wahrscheinlich aufgrund des

zunehmend konkurrierenden *Re-Annealings* der denaturierten Einzelstränge früher ein Sättigungsniveau, während die *Template*-DNA des Nebenbestandteils weiterhin exponentiell und damit überproportional bis zum Erreichen der eigenen Plateauphase vermehrt wurde.

Bei der Analyse der zur Validierung am CVUA Münster aus Rohmaterial hergestellten Mischproben durch Detektion der PCR-Produkte im DNA-Sensorchip zeigte sich schließlich, dass bei Hybridisierung eines Standard-PCR-Produkt-Volumens von 4 µl in Schweinefleisch noch eine 0.1%ige Zumischung von Rind sowie in Rindfleisch noch eine 1%ige Zumischung von Huhn nachgewiesen werden konnte. Für den Nachweis von Kuhmilch in Ziegenfeta deutete sich dagegen wie erwartet eine etwas schlechtere Nachweisgrenze an, wobei eine Zumischung von 5 % jedoch noch deutlich detektiert wurde. Die flexible Anpassung des in der Hybridisierung eingesetzten PCR-Produkt-Volumens ermöglichte weiterhin, dass bei der Analyse einer Probenlösung mit 25 µl Amplikon auch noch die 0.1%ige Beimengung des Hühnerfleisches in Rindfleisch nachgewiesen wurde. Die relativen Nachweisgrenzen lagen hier daher für beide untersuchten Fleischmischungen bei Standardbedingungen unter 1 % und damit in einem sinnvollen Bereich für die Bearbeitung praktischer Fragestellungen. Je nach Zielsetzung könnte das eingesetzte PCR-Produkt-Volumen auch in der Routineanalytik variiert werden. Während bei vielen Analysen ein sicherer Nachweis von 1%igen Beimengungen und entsprechend eine Hybridisierung von 4 µl Amplikon ausreichend wäre, könnte für die gezielte Detektion deutlich geringerer Anteile oder auch bei der Analyse von stark prozessierten Proben mit hohem Degradierungsgrad der DNA, wie z.B. Konserven, bewusst ein größeres Volumen eingesetzt werden.

Wie auch schon bei der Untersuchung der Mischungen auf *Template*-Ebene zeigte sich auch bei der Analyse der zur Validierung angesetzten Mischproben die überproportionale Amplifikation der Nebenbestandteile. Zwar erzeugten die Amplifikate der Hauptbestandteile die weitaus höheren Signalintensitäten, aber wenn z.B. 0.1 % einer Beimengung in der Probe vorhanden war, ergab sich an der korrespondierenden Sonde im Mittel 1 % der Signalintensität für die Hauptkomponente. Ein analoges Verhalten zeigte sich auch bei der Analyse der PCR-Produkte durch konventionelle Chiphybridisierung, weshalb beide Methoden zur Tierartendifferenzierung aufgrund des vorgeschalteten Amplifikationsschrittes nur eine semi-quantitative Bestimmung der Probenzusammensetzung ermöglichen.

Um abgesehen von den hier beschriebenen relativen Nachweisgrenzen für die Detektion prozentualer Anteile verschiedener Spezies in Mischung auch absolute Nachweisgrenzen für die einzelnen Spezies angeben zu können und dadurch die Leistungsfähigkeit der PCR zu demonstrieren, müsste in weiteren Versuchen spezies-spezifische Plasmid-DNA als *Template* in der PCR eingesetzt werden. Durch gezielte Verdünnungsreihen könnte so die Anzahl der gerade noch nachgewiesenen DNA-Moleküle bestimmt werden.

Analyse der Realproben

Bei Anwendung der chipbasierten Nachweismethoden zur Tierartendifferenzierung auf Realproben ergab sich für die Hybridisierungsanalyse der PCR-Produkte sowohl im DNA-Sensorchip als auch konventionell auf DNA-Chips insgesamt eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Referenzanalytik. Dabei konnten neben reinen Proben mit nur einer einzelnen Spezies auch Mischungen mit bis zu vier verschiedenen Spezies richtig bestimmt werden. Von den am CVUA Münster routinemäßig überprüften Proben fielen einige durch eine falsche Deklaration bzw. unerwartete Bestandteile auf, wodurch die Notwendigkeit regelmäßiger Kontrollen bestätigt wurde. Typische Beispiele für die Beimengung günstigerer Rohprodukte aus wirtschaftlichen Gründen sind der Zusatz von Kuhmilch in Schafs- oder Ziegenkäse, wie z.B. in den Proben P18-22, und der Zusatz von Rindfleischanteilen in Lammfleischprodukten, wie z.B. in Probe P-11.

Im Vergleich zu den Referenzmethoden, die am CVUA Münster angewendet werden, liegt ein besonderer Vorteil der Hybridisierungsanalyse der Konsensus-PCR-Produkte darin, dass das Verfahren unabhängig von der Art der untersuchten Probe und der nachzuweisenden Spezies standardisiert abläuft und der Anwender die Analysemethode nicht gezielt auf die eventuell in der Probe enthaltenen Spezies abstimmen muss. Die Anwendung der Referenzmethoden gestaltet sich dagegen deutlich aufwendiger und es muss dabei zwischen der Bearbeitung von Fleisch- und Käseproben unterschieden werden. Fleischproben werden in einem ersten *Screening* zunächst mit Hilfe eines ELISA-Tests immunochemisch analysiert. Dadurch können Rind, Schwein, Schaf, Pferd und Geflügel bis zu einem Anteil von mindestens 1 % nachgewiesen werden, während eine Differenzierung zwischen Huhn, Pute, Ente und Gans sowie der Nachweis von Ziege nicht möglich sind. Die Methode auf Basis eines *Sandwich*-Immunoassays ist in die Amtliche Sammlung von Verfahren zu §35 LMBG aufgenommen worden und beansprucht etwa 3.5 h Bearbeitungszeit. Nur für Spezies, welche im ELISA auffällig erscheinen, wird anschließend eine tierartspezifische PCR durchgeführt, durch die Anteile von bis zu 0.01 % nachgewiesen werden können. Die Methode ist damit unter Umständen allerdings bereits zu sensitiv, weil in Realproben der Nachweis geringer Kontaminationen, die sich z.B. durch die Herstellungspraxis ergeben können, im Rahmen der Routinekontrolle üblicherweise nicht erwünscht ist und das Ergebnis dadurch nur verfälscht wird (Dr. Claudia Brünen-Nieweler, CVUA Münster, persönliche Mitteilung). Auch Meyer *et al.* [209] hielten z.B. für Schwein eine Nachweisgrenze von 0.1 % für ausreichend. Wahrscheinlich konnte vor diesem Hintergrund in der Fleischwurst P-15 Pute am CVUA mittels tierartspezifischer PCR als sehr geringer Bestandteil noch nachgewiesen werden, während bei der Hybridisierungsanalyse an der Pute684-Sonde kein Signal detektiert wurde. Weil zum gleichzeitigen Nachweis von Schaf und Ziege die tierartspezifische PCR, die am CVUA mit dem CIB-A-Kit durchgeführt wird, aufgrund von starken Kreuzreaktivitäten der

Primer nicht gut geeignet ist (Dr. Claudia Brünen-Nieweler, CVUA Münster, persönliche Mitteilung), wird zur Bestimmung der beiden Spezies z.B. in Käseproben nur noch die PCR-RFLP-Methode nach Wolf *et al.* [140] angewendet. Dabei wird aus dem *cytb*-Gen ein 464bp-PCR-Produkt erhalten und anschließend verdaut (vgl. Abb. 5). Die Methode ist jedoch relativ zeitaufwendig, außerdem ist eine eindeutige Interpretation des Fragmentmusters aufgrund schwacher Bandenintensitäten bei der gelelektrophoretischen Analyse der verdauten PCR-Produkte, insbesondere bei Mischproben nicht immer möglich. Definierte Nachweisgrenzen für die Bestimmung von Schaf und Ziege mittels PCR-RFLP können trotz verschiedener Validierungsexperimente am CVUA Münster aufgrund einer starken Matrixabhängigkeit der Methode nicht angegeben werden und auch in der Literatur wurde bisher keine systematische Untersuchung zur Sensitivität der Methode beschrieben. Der parallele Nachweis von Rind gelingt zudem aufgrund einer schwachen Restriktion nur sehr eingeschränkt, weshalb in einem Ziegenfeta eine 5%ige Zumischung von Kuhmilch (Probe V-2) durch PCR-RFLP nicht mehr nachgewiesen werden konnte (vgl. Tab. 3). Dagegen gelang der Nachweis durch Hybridisierung der *cytb*-PCR-Produkte sowohl konventionell unter dem Deckgläschen als auch im DNA-Sensorchip, so dass die chipbasierten Nachweismethoden sich hier im Vergleich zu dem etablierten PCR-RFLP-Verfahren als sensitiver erwiesen haben. In der Routinekontrolle müssen Käseproben stattdessen mit dem Casein-ELISA „Ridascreen Cis“ auf Rind getestet und positive Ergebnisse durch tierartspezifische PCR bestätigt werden.

Am CVUA Münster werden jährlich 800-1000 Lebensmittelproben überprüft, von denen jedoch nur 10 % im ELISA-*Screening* eine Auffälligkeit zeigen und in weiteren Schritten molekularbiologisch untersucht werden. Vor diesem Hintergrund stellt auch die Methode zur Tierartendifferenzierung mittels *cytb*-PCR und Hybridisierung im DNA-Sensorchip keine echte Alternative zum ELISA-Test dar, weil für die immunchemische Analyse im Gegensatz zu den verschiedenen DNA-analytischen Verfahren der zusätzliche DNA-Extraktionsschritt und auch die Amplifikation nicht notwendig sind und der zeitliche Aufwand damit insgesamt viel geringer ist. Für die in der Routine geforderte unabhängige Überprüfung auffälliger Ergebnisse des ELISA-Tests bietet sich allerdings mit den beiden hier entwickelten chipbasierten Nachweismethoden gegenüber den bisher angewendeten Referenzmethoden ein deutlicher Vorteil, weil sie in einem Experiment für die meisten erdenklichen Probenzusammensetzungen eine eindeutige Identifizierung der relevanten Nutztierspezies erlauben.

Bei der Hybridisierungsanalyse der Realproben-PCR-Produkte konnte nach den Voruntersuchungen zu Effizienz und Spezifität von PCR und Hybridisierung davon ausgegangen werden, dass im Falle einer ausreichend großen Nukleinsäurekonzentration des DNA-Extraktes ein schwaches Sondersignal nur auf einen geringen Anteil der entsprechenden Spezies in der Probe zurückzuführen war. Die Konzentration der Gesamt-DNA lag für die

meisten der 26 untersuchten Extrakte in derselben Größenordnung (Abb. 104), wobei die Schwankungen zwischen den DNA-Konzentrationen klein waren verglichen mit den Abweichungen zwischen den Anteilen der einzelnen Spezies in den verschiedenen Proben.

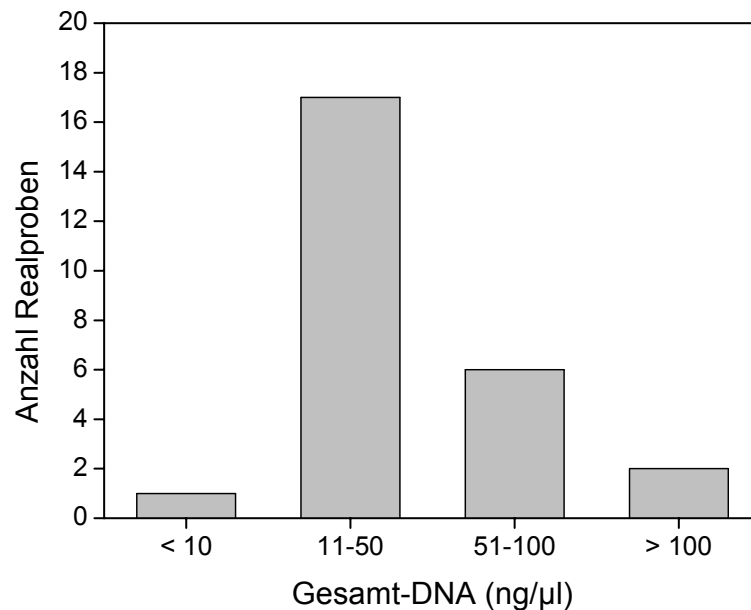


Abb. 104 Schwankungsbreite des Konzentrationsbereiches der Realproben-DNA-Extrakte

Die Konzentration und die Qualität der extrahierten DNA werden, wie bereits erwähnt, nicht nur dadurch beeinflusst, dass die Extraktion entweder aus einer Fleisch- oder aus einer Käseprobe erfolgt. Eine Auswirkung hat vielmehr auch die in der Probe enthaltene Fleischsorte, so ist z.B. in magerem Muskelfleisch deutlich mehr DNA enthalten als in fettreichem Bauch- oder Rückenspeck. Für Proben mit bekannter, allerdings massenbezogener Zusammensetzung der Zutaten (z.B. 20 % Schweineleber, 80 % Hühnerbrust) werden sich aus diesem Grund und auch aufgrund der semi-quantitativen PCR die Anteile der verschiedenen Spezies im Analyseergebnis nicht in jedem Fall wieder finden lassen. Um eine maximale Sensitivität des Nachweises zu gewährleisten, sollte letztlich bei der praktischen Anwendung der Nachweismethode der DNA-Extrakt immer unverdünnt in die PCR eingesetzt werden, falls keine Inhibition auftritt.

Für eine weitere Etablierung der Methode zur Tierartendifferenzierung mittels Hybridisierungsanalyse der *cytb*-PCR-Produkte sollten in zukünftigen Arbeiten noch weitere Realproben analysiert werden, weil z.B. die besonders anspruchsvollen Probenzusammensetzungen mit vier verschiedenen Spezies bisher noch nicht ausreichend untersucht wurden. Es bleibt beispielsweise zu klären, ob dabei eventuell in bestimmten Fällen die Amplifikation von Minorkomponenten nur noch eingeschränkt abläuft. Allerdings stellt der parallele Nachweis von vier Spezies in einer Probe in der Routinekontrolle ohnehin keine häufige Fragestellung dar und zumindest die Identifizierung von drei verschiedenen Spezies in einer Probe

erwies sich bisher als absolut unproblematisch. Weiterhin wäre auch die Analyse zusätzlicher Käseproben sinnvoll, um zu demonstrieren, dass das von der Referenzanalytik abweichende Ergebnis für den Schafskäse P-18 nur eine Ausnahme darstellt, und um möglichst die Ursache dafür zu bestimmen. Das Ziel wäre außerdem, auch für den Nachweis verschiedener Spezies in Käseproben die Sensitivität mittels definierter Mischungen aus zertifizierten Referenzmaterialien genauer abzuschätzen.

Hinsichtlich der Nachweisgrenzen für geringe Probenbestandteile kann die hier entwickelte Methode zur Tierartendifferenzierung einem Vergleich mit verschiedenen in der Literatur beschriebenen Methoden sehr gut standhalten. Rüggeberg *et al.* [124] nutzten die Blot-Technik und hybridisierten die membrangebundene Proben-DNA mit artspezifischen Sonden, wodurch 1%ige Anteile von Rind-, Schwein-, Pute- und Schaffleisch in erhitzten Mischproben noch eindeutig nachgewiesen werden konnten. Dieses Verfahren konnte dabei auf einen Amplifikationsschritt verzichten, da die Sonden spezifisch für in vieltausendfacher Kopie im Genom vorliegende Mikrosatelliten waren. Mit der *cytb*-PCR-RFLP-Methode nach Meyer *et al.* [136] konnten Schwein-spezifische Fragmente auch bei 0.5%iger Zumischung in Rindfleisch nach Erhitzung der Proben noch nachgewiesen werden. Umgekehrt gelang allerdings bei Anwendung derselben Methode die Detektion eines 10%igen Anteils von Rind in Schweinefleisch nicht und auch die Bestimmung von Schaf in verschiedenen erhitzten Mischproben mit 2, 5 bzw. 25%iger Beimengung war nicht möglich [5]. Durch eine Anpassung des für die Konsensus-PCR eingesetzten Primerpaares konnten Rüggeberg *et al.* [124] dagegen noch 1%ige Rindzumischungen in Schweinefleisch und 10%ige Anteile von Schaf- in Rindfleisch nachweisen. Lahiff *et al.* [127] entwickelten tierartspezifische Primer für den Nachweis von bis zu jeweils 1 % Rind- und Schweinanteilen bzw. von bis zu 5 % Schafanteilen in Tiermehlproben. Mittels einer Multiplex-PCR konnten Bellagamba *et al.* [130] noch 0.25%ige Verunreinigungen durch Wiederkäuer (Rind, Ziege, Schaf) und Schwein in Fischmehl detektieren, während Rea *et al.* [129] mit Hilfe einer Duplex-PCR der Nachweis 1%iger Anteile von Rind bzw. Wasserbüffel in Milch und Mozzarella-Käse gelang. Im Gegensatz dazu wiesen Plath *et al.* [199] durch PCR-RFLP des β -Casein-Gens von Schaf- und Ziegen-DNA noch 0.5%ige Zumischungen von Kuhmilch in Schafs- und Ziegenkäse nach.

Die meisten Methoden zur Tierartendifferenzierung liefern nur eine qualitative oder semi-quantitative Aussage, die bei den häufigsten Fragestellungen zur Überprüfung der Etikettierung jedoch ausreichend ist. Dagegen nutzten Calvo *et al.* [126] die exponentielle Amplifikationsphase der PCR, um einen Anteil von bis zu 1 % Schweinefleisch in verschiedenen Proben durch den Abgleich mit einer Kalibrationsgeraden zu quantifizieren, die densitometrisch aus der Bandenintensität bei der gelelektrophoretischen Analyse eines spezies-spezifischen PCR-Produktes nach 20 Reaktionszyklen bestimmt wurde. Die Methode ist

allerdings relativ umständlich und erwies sich im Bereich der Bestimmung 10%iger Schweinanteile als ungenau. Sie darf außerdem nicht verwechselt werden mit den echt quantitativen PCR-Methoden, nämlich der kompetitiven PCR und der *Real-Time*-PCR, die inzwischen von vielen Routinelaboratorien als Dienstleistung angeboten wird (vgl. 6.3). Ein *Real-Time*-PCR-Verfahren wurde z.B. von Laube *et al.* [210] für den Nachweis von bis zu 0.1%igen Zutmischungen von Rindfleisch in prozessierten Lebensmitteln entwickelt. Die Methode wurde durch die Analyse zahlreicher Mischproben evaluiert und gewährleistet neben dem Nachweis einer rindspezifischen Sequenz auch einen sicheren Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse durch die parallele Amplifikation eines universellen DNA-Fragmentes aus Fleisch von verschiedenen Säugetieren und Geflügelarten.

Als eine alternative Referenzmethode werden am CVUA Münster momentan die SureFood Animal ID Kits von Congen (Berlin) getestet, welche für den Nachweis zahlreicher Spezies angeboten werden und auf dem Prinzip eines PCR-ELISAs beruhen. Dabei werden zunächst speziesspezifische DNA-Abschnitte amplifiziert, woraufhin die PCR-Produkte dann in einem sequentiellen, ELISA-ähnlichen Verfahren mit tierartspezifischen Sonden hybridisiert und die Hybride detektiert werden. Der Hersteller garantiert Nachweisgrenzen von 0.5 %, wobei in Futtermitteln mit hohem pflanzlichen Anteil sogar Anteile von unter 0.1 % nachgewiesen werden können. Prinzipiell zeigt die PCR-ELISA-Methode grundlegende Ähnlichkeiten im Vergleich zu den chipbasierten Methoden, so ergeben sich z.B. dieselben Optimierungsansätze im Bereich des Primer- und Sondendesigns, um eine spezifische Detektion zu erreichen. Allerdings erlaubt der PCR-ELISA zwar einen hohen Probendurchsatz, jedoch keine Parallelisierung des Nachweises verschiedener Spezies, wohingegen die chipbasierten Verfahren genau umgekehrt eine hohe Parallelisierung bei vergleichsweise geringem Probendurchsatz ermöglichen. Die PCR-ELISA-Methode ist dadurch zeitlich deutlich aufwendiger und auch teurer als die bisher angewendeten Referenzverfahren.

In der Literatur wurde bisher noch kein Ansatz zur Tierartendifferenzierung beschrieben, der analog zu der in dieser Arbeit entwickelten Nachweismethode die Sensitivität der PCR mit der Spezifität der Hybridisierungsanalyse auf einem DNA-Sondenarray kombiniert. Diesem Prinzip folgt bisher nur der CarnoCheck[®]-DNA-Chip, den die Firma Greiner Bio-one (Frickhausen) seit kurzem zum semi-quantitativen Nachweis von acht Tierarten in Nahrungs- und Futtermitteln bei einer Nachweisgrenze von 0.5 % anbietet. Der Kit umfasst alle notwendigen Komponenten für die Amplifikation eines cytb-Fragmentes und die anschließende konventionelle Chiphybridisierung. Allerdings wurden bisher keine näheren Daten und Informationen publiziert, die Aufschluss über das Design der Primer und der Sonden oder über Ergebnisse bei der Anwendung des Systems geben.

Vergleich von konventioneller Chiphybridisierung und Realzeithybridisierung

Besonders deutlich werden die Vorteile der PCR-Produkt-Analyse im DNA-Sensorchip, wenn man die Ergebnisse der Realzeithybridisierung und der als Vergleichsmethode eingesetzten konventionellen Chiphybridisierung hinsichtlich verschiedener Aspekte miteinander vergleicht (Tab. 21).

Tab. 21 Vergleich verschiedener Eigenschaften der beiden für die Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln angewendeten Hybridisierungsmethoden

Eigenschaft	Konventionelle Chiphybridisierung	Realzeithybridisierung
Array	<i>low-density</i> (n = 12)	<i>low-density</i> (n = 3)
<i>Photobleaching</i>	vernachlässigbar	vernachlässigbar
Reproduzierbarkeit	ca. 40 %	ca. 5 %
Spezifität	viele schwache Kreuzhybridisierungen	fast keine Kreuzhybridisierungen
Nachweisgrenze	ca. 0.1 %	ca. 0.1 %
PCR-Produkt-Volumen	3.25 µl	4 µl (max: 25 µl)
Verbrauch	1 Messung/Array	ca. 20 Messungen/Array
Dauer	120 min ¹⁾	5 min
Charakterisierung von Realproben	gut – sehr gut	sehr gut

¹⁾ Angenommen wurde eine Standard-Inkubationszeit von 1 h.

Zunächst muss betont werden, dass die Hybridisierung auf DNA-Chips unter dem Deckgläschen hier insofern von der konventionellen DNA-Chip-Technologie abweichend eingesetzt wurde, als dass nicht mit *high-density*-Arrays, sondern der Aufgabenstellung angepasst mit einem *low-density*-Array gearbeitet wurde. Dabei wurde für den DNA-Sensorchip und den konventionellen DNA-Chip dasselbe Sondenaset verwendet. Während die Größe der sensitiven Fläche und damit des Sondenarrays im DNA-Sensorchip beschränkt war, bot sich bei der konventionellen Chiphybridisierung der Vorteil einer größeren Detektionsfläche im Mikroarrayscanner, so dass die Sonden mit einer höheren Redundanz immobilisiert werden konnten. Der Effekt des *Photobleachings* konnte bei der Detektion der Fluoreszenz sowohl im Mikroarrayscanner als auch im DNA-Sensorchip vernachlässigt werden, weil sich die Auswirkung der wiederholten Anregung der Fluorophore auf den konventionell hybridisierten DNA-Chips bereits als gering erwies und die Strahlungsintensität des fokussierten Laserstrahls im Mikroarrayscanner dabei noch deutlich größer war als auf der sensitiven Oberfläche im DNA-Sensorchip. Die Anregung erfolgte dort nämlich nur indirekt durch die vergleichsweise schwache Intensität des evaneszenten Feldes, dessen Ausdehnung außerdem

auf ein stark aufgeweitetes Profil des eingekoppelten Laserstrahls zurückzuführen war. Dadurch ergab sich ebenso wie in einem analog am ICB entwickelten Evaneszent-Feld-Sensorsystem auf Kunststoffbasis eine energetisch günstige Anregungsoptik, die während der Messungen auch über mehrere Minuten nicht zu einem signifikanten *Photobleaching*-Effekt führte [75].

Zwar zeigte die konventionelle Chipybridisierung im Hinblick auf die Spezifität und die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse schlechtere Eigenschaften als die Realzeithybridisierung. Eine eindeutige Analyse der Realproben zur Tierartendifferenzierung war aber dennoch möglich und die Ergebnisse der Referenzanalytik konnten wie auch bei der Analyse im DNA-Sensorchip bestätigt werden. Trotz der zeitlich eng begrenzten Bindungsphase wurde bei der Realzeithybridisierung im Vergleich zur konventionellen Chipybridisierung kein grundsätzlicher Sensitivitätsverlust beobachtet. Für beide Systeme kann bezüglich der analysierten Fleischmischungen eine Nachweisgrenze von etwa 0.1 % angegeben werden. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass zur Detektion der 0.1%igen Zumischung von Huhn in Rindfleisch im Sensorchip das Volumen des zugegebenen PCR-Produktes von 4 μl auf 25 μl erhöht werden musste, während unter dem Deckgläschen zumindest in einer der beiden analysierten Proben das Huhn684-Signal mit dem Standard-Volumen von 3.25 μl detektiert werden konnte. Während bei der Realzeithybridisierung das Volumen des zugegebenen PCR-Produktes bei konstanter Pufferzusammensetzung variiert werden kann, bietet sich diese Möglichkeit bei der konventionellen Hybridisierung nicht ohne weiteres. Eine Verbesserung der Nachweisgrenzen könnte daher lediglich über eine Verlängerung der Inkubationszeit erreicht werden, wodurch sich aber ein zusätzlicher Nachteil gegenüber der zeitsparenden Hybridisierung im Sensorchip ergäbe, bei der eine Probe innerhalb von 5 min vorbereitet und vermessen werden kann.

Ein deutlicher Vorteil für die Realzeithybridisierung ergibt sich auch durch die im Vergleich zu den konventionellen DNA-Chips geringere Anzahl der verbrauchten DNA-Sensorchips, weil hier jeder Sondenarray mindestens 20x regeneriert werden kann, während unter dem Deckgläschen jeder Array nur einmal hybridisiert werden sollte. Auf der Regenerierbarkeit der Sensorchips beruht auch die sehr gute intra-Array-Reproduzierbarkeit der Methode und das Verfahren wird erst dadurch automatisierbar und schnell, weil ein häufiger Wechsel des Sensorchips und damit verbundene Wartezeiten verhindert werden. Außerdem ergeben sich durch den einmaligen Gebrauch der DNA-Chips bei der konventionellen Hybridisierungsmethode höhere Verbrauchskosten als bei der Analyse im Sensorchip. Eine genaue Abschätzung der Gesamtkosten beider Methoden ist nicht möglich, da das DNA-Biosensorsystem nicht auf dem Markt angeboten wird. Allerdings würde ein entsprechendes Produkt preislich wahrscheinlich im Bereich der günstigsten DNA-Mikroarrayscanner liegen, so dass die Realzeithybridisierungsanalyse in jedem Fall konkurrenzfähig wäre. Aber auch die

Methode der konventionellen Chiphybridisierung bietet ein deutliches Potential für die Anwendung zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln, weil MikroarraysScanner zunehmend Einzug in molekularbiologische Labore halten. Dementsprechend müssten hier lediglich entsprechende Kits mit den immobilisierten Sondenarrays und einem optimierten Hybridisierungspuffer angeboten werden.

6.3 Detektion von Mikroorganismen durch Realzeit-Hybridisierung

Im Rahmen der Adaption des Nachweises der sulfatreduzierenden Prokaryonten vom konventionellen SRP-PhyloChip auf den DNA-Sensorchip wurde stärker noch als bei der Analyse der PCR-Produkte zur Tierartendifferenzierung die Diskriminierung auch einzelner mismatches zwischen Sonde und Target-DNA verlangt. Nur dadurch kann eine Differenzierung der zum Teil sehr nah verwandten, 134 verschiedenen SRP-Arten, für die bereits eine 16S rRNA-Sequenz veröffentlicht wurde, nach dem Mehrfachsondenkonzept gewährleistet werden. Die Analyse der zunächst ausgewählten Oligonukleotid-Targets und später auch der markierten PCR-Produkte von *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* durch Hybridisierung mit den korrespondierenden Sonden SRB385, SRB385Db und DSV698 bestätigte, dass bereits während der Assoziationsphase in den meisten Fällen deutlich zwischen pm- und 1mm- bzw. 2mm-Paarungen unterschieden werden kann. Die 1mm-Wechselwirkungen erreichten dabei üblicherweise eine Signalintensität im Bereich $\leq 10\%$ des pm-Signals. Eine Ausnahme bildete lediglich die Wechselwirkung von *Dsv. halophilus* mit der SRB385Db-Sonde, bei der trotz eines GT-mismatches noch eine sehr intensive Anbindung beobachtet wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich auch zwischen den Basen Guanin und Thymin zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können (Abb. 105 A) [211]. Diese sind außerdem aufgrund der Beteiligung von zwei Imino-Protonen, welche stärker polarisiert sind als Amino-Protonen, besonders stabil, weshalb G-T-mismatches generell relativ gut toleriert werden. Dieses Phänomen wurde bereits in verschiedenen Studien eingehend untersucht. Ikuta *et al.* [212] bestimmten die destabilisierende Wirkung verschiedener Basenfehlpaarungen durch die Analyse der Dissoziationskinetiken von 19mer-Oligonukleotid-DNA-Hybriden mit einzelnen mismatch-Positionen innerhalb der DNA-Helix. Die Ergebnisse sind in Abb. 106 zusammengefasst und zeigen, dass sich neben den bevorzugten Watson-Crick-Basenpaarungen A-T und G-C auch zwischen G-T, G-A und G-G Wechselwirkungen aufbauen, welche die Stabilität der DNA-Doppelhelix weit weniger beeinflussen als die Basenfehlpaarungen A-A, T-T, C-C, C-T und C-A. Dabei erwiesen sich die G-A- und G-G-Wechselwirkungen als etwas schwächer im Vergleich zu der relativ stabilen G-T-„mismatch“-Paarung, weil die Wechselwirkung zwischen den Heterobizyklen der beiden Purine G und A sterisch anspruchsvoller ist und weil z.B. bei der G-A-Paarung

nur an einer der beiden Wasserstoffbrückenbindungen ein Imino-Proton beteiligt ist (Abb. 105 B).

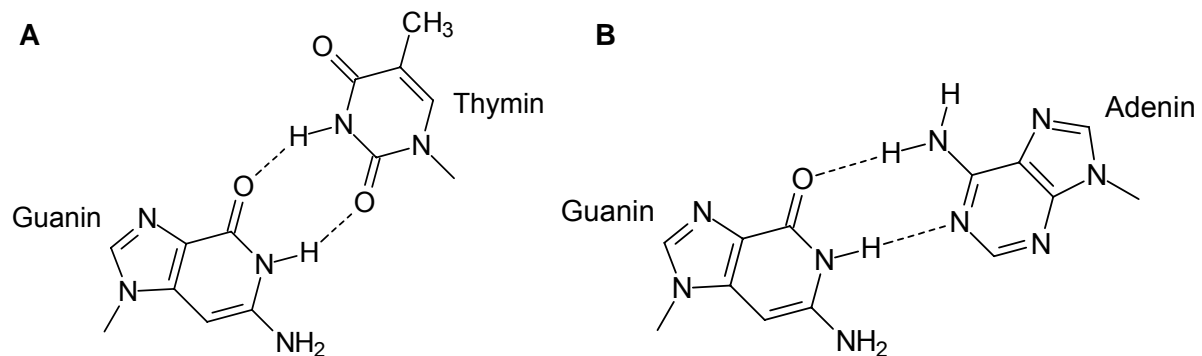


Abb. 105 non-Watson-Crick-Wechselwirkungen zwischen Guanin und Thymin (A) sowie Guanin und Adenin (B)

----- : Wasserstoffbrückenbindung

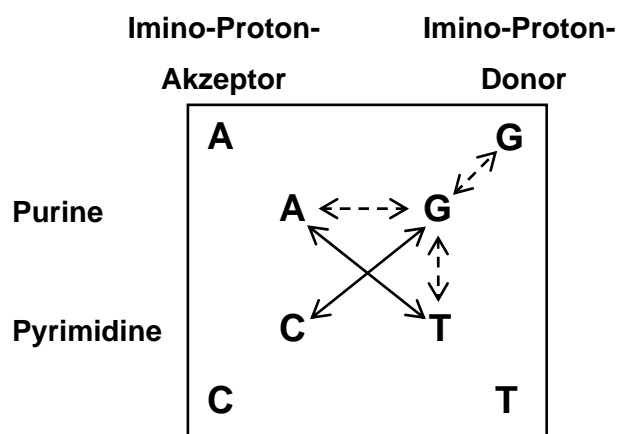


Abb. 106 Einfluss der Wechselwirkung verschiedener Nukleinsäurebasen auf die Stabilität der DNA-Doppelhelix (nach: Ikuta et al. [212])

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, \longleftrightarrow : bevorzugte Watson-Crick-Basenpaarungen, $\leftarrow - \rightarrow$: schwächere non-Watson-Crick-Wechselwirkungen, ohne Pfeilverbindung: instabile Basenpaarungen.

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Sugimoto *et al.* [213] bei der Bestimmung der thermodynamischen Eigenschaften von 66 verschiedenen RNA/DNA-Hybriden mit einzelnen mismatches unterschiedlicher Art aus UV-photometrischen Schmelzkurven. Der G-T-mismatch erwies sich hier ebenfalls als weitaus stabilste Fehlpaarung, während auch zwischen U-G, G-G und G-A noch deutliche Wechselwirkungen auftraten. Der Anteil der Fehlpaarungen A-A, U-T, U-C, C-A und C-T an der Bindungsstabilität der RNA/DNA-Hybride konnte dagegen vernachlässigt werden.

Obwohl somit eine starke Kreuzhybridisierung von *Dsv. halophilus* mit der SRB385Db-Sonde erwartet werden konnte, wurde die Sondensequenz von Loy *et al.* [173] dennoch bei der Konzeptionierung des SRP-PhyloChips ausgewählt, weil sie ebenso wie die Sonde SRB385

bereits in zahlreichen vorangegangenen Untersuchungen zur SRP-Bestimmung eingesetzt worden war. Bei der Auswahl der übrigen SONDENSEQUENZEN wurden zum einen 24 weitere Sonden berücksichtigt, die zuvor im Rahmen der SRP-Detektion beschrieben worden waren und nach einem erneuten Abgleich mit den aktuellen 16S rRNA-Daten in das SONDENSET aufgenommen wurden. Zum anderen wurden nach dem Mehrfachsondenkonzept 102 zusätzliche Sonden entworfen, wobei sich das Design aller Sonden danach richtete, dass die Sequenz ohne T8-Spacer eine Länge von 18 nt bei einem minimalen GC-Gehalt von 50 % aufweisen sollte. Um eine maximale Spezifität zu erreichen, sollten bei einem Inter-Spezies-Vergleich möglichst viele mismatches im zentralen Bereich der Sequenz liegen. Die Evaluierung des SONDENSETS zeigte jedoch, dass die Hybridisierungseigenschaften nicht immer aus der Sequenz vorhersagbar sind.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Spezifität ausgewählter Sonden bei unterschiedlichen Stringenzbedingungen im DNA-Sensorchip konnten grundsätzlich die Ergebnisse von Loy *et al.* [173, <http://www.microbial-ecology.de/download/srpphylochip>] bestätigt werden. Demnach konnten bei konstanter Stringenz nicht alle Sonden des SRP-PhyloChips zwischen perfekt- und fehlpaarenden Hybridisierungsereignissen unterscheiden, weil sich für die verschiedenen SONDENSEQUENZEN unterschiedliche optimale Stringenzbedingungen ergaben. Während der ursprünglichen Evaluierung des SONDENSETS durch Hybridisierung mit PCR-Produkten von 41 verschiedenen SRP-Spezies hatten sich bei konstanter Waschttemperatur des SRP-PhyloChips auf 31 % der Sonden unspezifische Anbindungen gezeigt, wobei auch mit den Sonden SRB385 und SRB385Db häufig Kreuzhybridisierung auftrat. Für eine exakte Differenzierung zwischen pm- und mm-Signal wäre dementsprechend eine Analyse der Hybridisierungen bei unterschiedlichen Stringenzbedingungen nötig. Dies ließe sich bei Anwendung des konventionellen SRP-PhyloChips nur durch einen sehr großen Arbeitsaufwand realisieren, wie die Bestimmung der Schmelzkurven für die Anbindung der PCR-Produkte von *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* gezeigt hat [173]. Dazu musste bei Waschttemperaturen von 42-60°C für jeden Referenzorganismus eine separate Hybridisierung auf einem SRP-PhyloChip durchgeführt werden. Während in ähnlichen Experimenten zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens der *Dsv. halophilus*-Targetoligonukleotide mit dem DNA-Sensorchip zum Teil Maximumskurven erhalten wurden, ergab sich mit dem SRP-PhyloChip ein klassischer Verlauf der Schmelzkurven ohne Signaloptimum. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hier nur die Temperatur und nicht der Formamidgehalt des Hybridisierungspuffers variiert wurde. Dementsprechend konnte auch nicht der aktivierende Effekt des Formamids beobachtet werden, der z.B. auch von Urakawa *et al.* [204] bei der konventionellen Hybridisierung auf DNA-Mikroarrays ausgenutzt wurde. Ein Vergleich der Ergebnisse zur SRP-Detektion bei variabler Stringenz macht außerdem deutlich, dass durch die Hybridisierungsanalyse im DNA-Sensorchip in viel

kürzerer Zeit und mit einem viel geringeren Arbeitsaufwand eine umfangreiche Datenmenge zur Generierung von Schmelzkurven und zur Bestimmung der optimalen Stringenzbedingungen der verschiedenen Sonden erhalten wurde als mit dem konventionellen SRP-PhyloChip.

Der entscheidende Vorteil der Hybridisierung im DNA-Sensorchip wurde aber schließlich dadurch demonstriert, dass nach einer Assoziation unter weniger stringenten Bedingungen das Bindungsverhalten verschiedener SONDENSEQUENZEN in kurzer Zeit durch eine gezielte Stringenzerhöhung in der Dissoziationsphase verfolgt werden konnte. Dadurch wurde z.B. eine Differenzierung des G-T-mismatches bei der Hybridisierung von *Dsv. halophilus* mit der SRB385Db-Sonde möglich. Das ganze Potential dieses Ansatzes wird letztendlich erst dann deutlich werden, wenn im DNA-Sensorchip die komplexe Hybridisierung mit allen 132 Sonden des SRP-PhyloChips verfolgt wird, weil dafür trotz der grundsätzlich sehr guten Spezifität der Realzeithybridisierung in der Assoziationsphase nicht in allen Fällen mm-Anbindungen ausgeschlossen werden können. Auf Dauer ist deswegen für die Anwendung des dynamischen Hybridisierungskonzeptes die Anbindung der Proben-DNA bei einem optimierten, wenig stringenten Formamidgehalt des Puffers geplant (z.B. 40 % bei RT), woraufhin dann in stringenten Waschschritten durch eine schrittweise Erhöhung des Formamidanteils (z.B. 50 %, 60 %, 70 %) mm-Hybridisierungen aufgelöst werden sollen. Das zur Zeit realisierte Gerätekonzept erlaubt dabei nur das indirekte Aufheizen des Sensorchips über das Glasprisma, so dass keine Temperaturgradienten zur Variation der Stringenz gefahren werden können.

Wie die Ergebnisse zeigten, kann die Dauer der einzelnen Waschschriffe von derzeit 200 s noch deutlich verringert werden, weil eine charakteristische Veränderung des Bindungsverhaltens bereits nach wenigen Sekunden zu beobachten war. Um nach diesem Prinzip eine eindeutige Charakterisierung der verschiedenen SRP-Spezies durch Hybridisierung mit dem evaluierten SONDENSET zu ermöglichen und um die Stringenz der Waschstufen sinnvoll wählen zu können, müsste aber zunächst einmalig das Bindungsverhalten der zur Verfügung stehenden Referenzorganismen bei unterschiedlicher Stringenz im DNA-Sensorchip charakterisiert werden. Die entsprechenden Schmelzkurven wurden zwar bisher nur für die Modell-Targetoligonukleotide Halop385-Cy5 und Halop698-Cy5 bestimmt. Die Analyse der PCR-Produkte von *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* im DNA-Sensorchip hat jedoch verdeutlicht, dass die PCR-Produkte dasselbe Bindungsverhalten wie die korrespondierenden Targetoligonukleotide zeigen, so dass Schmelzkurven unproblematisch wohl auch mit Realproben generiert werden könnten.

Als ein Vorteil der Hybridisierung im DNA-Sensorchip erwies sich auch, dass dabei für deutliche Fluoreszenzsignale viel weniger PCR-Produkt eingesetzt werden musste als bei der Hybridisierung auf dem SRP-PhyloChip nach Loy *et al.* [173]. So reichten mit 0.8 µl

Dsv. halophilus-Produkt im Sensorchip etwa 5 % der üblicherweise auf dem SRP-PhyloChip hybridisierten DNA-Menge noch aus, um eindeutige Signale zu detektieren. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf die grundsätzlich verschiedenen Puffer- und Temperaturbedingungen bei beiden Hybridisierungsmethoden zurückzuführen, so enthielt der Standardpuffer bei Loy *et al.* z.B. nur 5 % Formamid.

Weil die Ergebnisse demonstrieren, dass die Analyse der Hybridisierung bei variabler Stringenz im DNA-Sensorchip für die schnelle und spezifische Identifizierung von Mikroorganismen grundsätzlich geeignet ist, wird momentan in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schleifer (TU München) eine optimierte Version des Evaneszent-Feld-DNA-Biosensorsystems entwickelt. Diese sieht neben einer verbesserten Temperierung auch eine Automation der Probenzuführung und nachgeschalteter Waschschriffe vor, wodurch dann Stufengradienten für das stringente Waschen in ein Messprogramm eingebunden werden können. Das System soll dabei dauerhaft auf Basis der CEL-Objektträger betrieben werden, durch die zum einen eine standardisierte und qualitätsgeprüfte Chipoberfläche und zum anderen eine maximale Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen der Hybridisierung auf dem SRP-PhyloChip gewährleistet wird. Die Immobilisierung von DNA-Sonden auf den aldehydaktivierten CEL-Objektträgern wurde auch schon in anderen Fällen erfolgreich für die Mikroorganismendetektion auf DNA-Mikroarrays angewendet, so z.B. von Chizhikov *et al.* [166] zur Identifikation verschiedener Genotypen des humanen Gruppe-A-Rotavirus.

Bodrossy *et al.* [160] nutzten ebenfalls CEL-Objektträger, um nach Amplifikation des partikulären Methan-Monooxygenase(pMMO)-Gens methanotrophe und funktionell verwandte Bakterien auf einem DNA-Mikroarray nachzuweisen. Ihre Ergebnisse zur Konzeptionierung eines hierarchisch strukturierten SONDENSETS bestätigten, dass besonders einzelne G-T- bzw. G-U-mismatches bei DNA-RNA-Hybridisierungen keine Auswirkung auf die Hybridisierung der perfekt komplementären Target-DNA zeigen. Außerdem wurden beim Design des entsprechenden SONDENSETS in dieser Studie nicht nur die Positionierung der mismatches sowie die G-C-Verteilung innerhalb der SONDENSEQUENZ beachtet, sondern auch sekundäre Haarnadelstrukturen der SONDEN-DNA als zusätzlicher mismatch bewertet. Um möglichst vergleichbare Hybridisierungseffizienzen der verschiedenen SONDEN zu gewährleisten, wurden die Sequenzen hier soweit wie möglich auf einen T_m -Wert von $60 \pm 2^\circ\text{C}$ abgestimmt, so dass sich im Gegensatz zu dem von Loy *et al.* [173] gewählten Ansatz keine einheitliche Länge der SONDEN ergab. Die Validierung des generierten SONDENSETS mit den verschiedenen Reinulturen zeigte jedoch, dass sich auch in diesem Fall die Hybridisierungseigenschaften nicht für alle SONDEN vorhersagen ließen. Immerhin trat aber nur an 8 von insgesamt 50 SONDEN mit einzelnen Organismen eine unerwartete Anbindung durch Kreuzhybridisierung auf, wobei eine 1mm-Diskriminierung unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen von vornherein nicht erwartet worden war. Unter Berücksichtigung der beobachteten Kreuzhybridisierungen

konnten hier bei konstanter Stringenz die Bakterienpopulationen in Umweltproben mit einer Nachweisgrenze von etwa 5 % bezogen auf die Gesamtheit der in einer Probe vorliegenden Bakterien eindeutig identifiziert werden.

Weil dieser Weg aber mit einer zunehmenden Komplexität der Fragestellung, wie z.B. auf dem SRP-PhyloChip, immer weniger geeignet ist, wählten Liu *et al.* [214] für die Differenzierung fünf nah verwandter Bakterienspezies des *Bacillus*-Typs auf einem DNA-Mikroarray ebenfalls einen dynamischen Ansatz. Dazu wurden nach dem hierarchischen Mehrfachsondenkonzept 30 Sonden aus dem Bereich des 16S rRNA-Gens entwickelt und auf polyacrylamidbeschichteten Glaschips immobilisiert. Um nach der Hybridisierung der fluorophormarkierten 16S rRNA-Genamplifikate der verschiedenen Spezies eine Diskriminierung zwischen pm- und mm-Hybriden zu ermöglichen, wurden simultan für alle Sonden des Arrays durch eine systematische Temperaturerhöhung die charakteristischen Schmelzkurven bestimmt. Unspezifische Anbindungen konnten dadurch eindeutig identifiziert werden, weil mm-Hybride bereits bei Temperaturen unterhalb des T_m -Wertes der jeweiligen pm-Wechselwirkung vollständig dissoziierten. Das Detektionsprinzip ist damit ähnlich dem Ansatz zur SRP-Detektion im DNA-Sensorchip, bei dem der Stringenzgradient durch Erhöhung des Formamidgehaltes realisiert wird. Eine Analyse nach Liu *et al.* ist allerdings deutlich aufwendiger, so dauerte eine Messung inklusive Hybridisierung, Abwaschen der ungebundenen Target-DNA und Detektion der Schmelzkurven hier etwa 8 h.

Die verschiedenen Beispiele zeigen, dass bei der Entwicklung von DNA-Mikroarrays zur Mikroorganismen-Diagnostik ein präzises Sondendesign bei möglichst genauer Abschätzung des Sondenverhaltens die entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung in der Praxis bilden, unabhängig davon, ob der Nachweis nach der konventionellen DNA-Chip- oder der Sensorchipmethode erfolgen soll. Die bisher zur Verfügung stehenden Analyseverfahren, wie z.B. kulturelle Anzucht, Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) mit DNA-Sonden oder spezies-spezifische PCR, können meist nur einzelne Bakterienspezies identifizieren und sind zudem meist sehr zeitaufwendig. Dagegen ergibt sich durch die Kombination von PCR und Arrayhybridisierung die mit Abstand schnellste und sensitivste Methode für die simultane Charakterisierung verschiedener Spezies in komplexeren Bakterienpopulationen. Die zahlreichen Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet [10,160-166,185] machen das große Interesse an solch alternativen Verfahren deutlich. Auf dem Markt erhältlich sind bisher allerdings nur wenige mikroarraybasierte Produkte, die auch nur für den gezielten Nachweis bestimmter Spezies geeignet sind. So ermöglicht z.B. der NUTRI[®]Chip von Genescan (Freiburg) den simultanen Nachweis der Spezies *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* und *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*) als wichtigste Ausschlusskeime in Lebensmitteln. Die Detektion erfolgt dabei durch die Amplifikation charakteristischer DNA-Sequenzen in einer Multiplex-PCR und die anschließende Hybridisierung der PCR-Produkte auf spezifischen

Sonden. Weiterhin wird von Greiner Bio-one (Frickhausen) der ParocheckTM-DNA-Chip angeboten, welcher den semi-quantitativen Nachweis von insgesamt 20 verschiedenen Parodontitis assoziierten Keimen ermöglicht und auf dem Nachweis keimspezifischer Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens beruht.

Durch die Versuche zur Mikroorganismendetektion wurde letztendlich auch verdeutlicht, dass die Hybridisierung im DNA-Sensorchip – ebenso wie konventionell auf DNA-Chips – bei einem gezielten Sondendesign auch für den Nachweis von Punktmutationen (SNPs) genutzt werden kann, um dadurch z.B. genetisch bedingte Erkrankungen festzustellen oder eine individuelle Genotypisierung der Patienten in der Pharmakogenomik zu ermöglichen. Neben den Sequenziermethoden und der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse ist heute eine der am meisten angewendeten Methoden zum SNP-Nachweis der TaqManTM-Assay. Dabei handelt es sich um ein spezielles *Real-Time*-PCR-Verfahren, bei dem zusätzlich zu den beiden normalen PCR-Primern zwei TaqManTM-Oligonukleotidsonden eingesetzt werden. Eine von diesen Sonden ist perfekt komplementär zur Wildtyp-Sequenz, während die andere perfekt komplementär zur SNP-tragenden Sequenz ist. Zusätzlich tragen die Sonden am 5'-Ende unterschiedliche Reporterfarbstoffe, deren Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Löscher (*quencher*) am 3'-Ende unterdrückt wird (Abb. 107). Je nachdem, ob in der Probe Wildtyp- oder mutierte DNA vorliegt, hybridisiert die jeweils perfekt komplementäre Sonde mit der *Template*-DNA und wird dann während der Primer-Elongation in der PCR durch die 5'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase zu einzelnen Nukleotiden zersetzt [215]. Dadurch wird der 5'-Reporter-Fluoreszenzfarbstoff vom 3'-*Quencher* getrennt und die damit proportional zu der PCR-Produktmenge entstandene Fluoreszenz im *Real-Time*-PCR-Cycler detektiert. Die aufgrund eines mismatches nicht hybridisierende Sonde wird nicht abgebaut und die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes bleibt weiterhin durch den *Quencher* unterdrückt. So geben letztlich die Fluoreszenzintensitäten der beiden unterschiedlichen Reporter-Farbstoffe Aufschluss über die Verteilung zwischen Wildtyp- und SNP-Sequenz in der Probe.

Der Vorteil der TaqManTM-Methode besteht darin, dass dabei sämtliche post-PCR-Schritte entfallen. Neueste Geräte sind außerdem in der Lage, Mikrotiterplatten mit bis zu 384 Kavitäten zu prozessieren, so dass damit ein Hochdurchsatz-*Screening* möglich wird. Allerdings ergibt sich ein Nachteil durch den hohen Kostenfaktor des notwendigen Thermocyclers mit optischer Detektionseinrichtung (z.B. GeneAmp[®] 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt) oder Lightcycler[®] (Roche Diagnostics, Mannheim)) und die entsprechenden Reagenzien. Der wesentliche Unterschied zu den chipbasierten Methoden besteht darin, dass die TaqManTM-Methode nur sehr begrenzt multiplex-fähig ist, denn in der Regel kann pro PCR nur ein SNP (entsprechend zweier paralleler Hybridisierungen) detektiert werden.

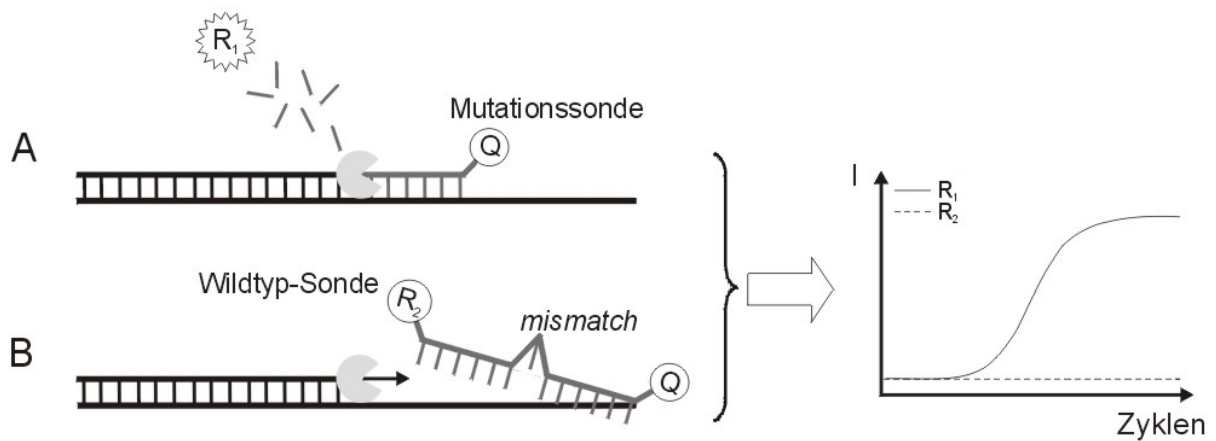


Abb. 107 Schematische Darstellung eines TaqMan[®]-Assays

Probe enthält nur die mutierte Sequenz mit einem SNP. A: Mutationssonde hybridisiert und wird durch Polymerase abgebaut, B: Wildtyp-Sonde hybridisiert nicht (oder bedeutend schwächer) aufgrund eines mismatches. Anstieg des Fluoreszenzsignals nur für Reporter-Farbstoff R_1 aus Mutationssonde.

Aufgrund der hohen Spezifität, der Schnelligkeit und der quantitativen Aussage des Nachweises wird die TaqMan[®]-PCR besonders häufig auch zur Detektion einzelner, definierter Mikroorganismen eingesetzt [216]. So werden z.B. von Applied Biosystems TaqMan[®]-Kits zur Bestimmung von Pathogenen in Lebensmitteln und von zahlreichen Routinelaboratorien die TaqMan[®]-Analyse auf Mikroorganismen als Dienstleistung angeboten.

Die unterschiedlichen charakteristischen Merkmale der *Real-time*-PCR und der Chiptechnologie werden in Zukunft dazu führen, dass diese Techniken schwerpunktmäßig für unterschiedliche Fragestellungen zum Einsatz kommen. Falls sehr viele Proben im Hinblick auf einzelne oder wenige Targets (z.B. Mikroorganismen oder SNPs) untersucht werden müssen, werden die Vorteile der *Real-time*-PCR, d.h. insbesondere die einfache Handhabung und das Potential für quantitative Ergebnisse, zum Zuge kommen. Die Chiptechnologie wird dort ihr Einsatzfeld finden, wo in wenigen Proben eine Vielzahl möglicher Targets – bis hin zur Größenordnung von *high-density*-Chips – nachgewiesen werden muss. Typischerweise sind dies Anwendungen, bei denen eine Konsensus-PCR oder direkte RNA-Markierungen möglich bzw. echte Multiplex-PCR-Systeme etabliert sind und eher qualitative Angaben ausreichen. Das Anwendungsspektrum der Chiptechnologie wird dabei durch den Gebrauch von DNA-Sensorchips in Richtung der *Real-time*-PCR-Methoden erweitert, da die Sensorchip-Hybridisierung einen höheren Durchsatz bei einer immer noch diagnostisch sinnvollen Anzahl von analysierten Targetsequenzen (einige 10 bis 100) erlaubt.

7 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit ist es erstmalig gelungen, die Anwendung eines Evaneszent-Feld-DNA-Biosensorsystems zur schnellen, zeitaufgelösten Detektion multipler Hybridisierungsereignisse auf verschiedene praktische Fragestellungen zu etablieren und zur Demonstration der Praxistauglichkeit eine schnelle und zuverlässige PCR-basierte Methode zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln zu entwickeln.

Zunächst wurde das Sensorsystem allerdings durch die Analyse von Wechselwirkungen zwischen Modell-Oligonukleotiden ausführlich hinsichtlich grundlegender Aspekte optimiert und charakterisiert. Dazu wurde die Hybridisierung fluorophormarkierter Modell-Targetoligonukleotide mit den auf der sensitiven Glasoberfläche des Sensorchips kovalent immobilisierten Sondensequenzen untersucht, welche mit Hilfe eines Nano-Dispensers in definierten Arrays einzelner Sondenspots angeordnet worden waren. Eine Sondenkonzentration von 5 μM gewährleistete dabei einen deutlichen Überschuss gegenüber den Targetmolekülen und damit einen linearen Signalanstieg im Anfangsbereich der Hybridisierung. Weil die Anbindung der Cy5-markierten Targetmoleküle durch alkalische Denaturierung der gebildeten Hybride vollständig aufgehoben werden konnte, ergab sich für einen Sensorchip eine sehr gute Arbeitsstabilität über mindestens $n = 20$ Messungen mit einer Drift von $\leq -0.5\%$ pro Messung und einem Variationskoeffizienten von 5 %. Ein Vorteil ergab sich auch dadurch, dass die Signalintensität als Steigung des Fluoreszenzsignals während der Anfangsphase der Hybridisierung direkt proportional zur Targetkonzentration war, weshalb die Hybridisierung im DNA-Sensorchip prinzipiell quantitativ war. Für die Kalibration eines 46mer-Targets wurde so z.B. ein linearer Bereich über fast zwei Dekaden bei einer Sensitivität von 12.8 counts/(s*nM) und einer Nachweisgrenze von 13 pM erhalten.

Durch die Variation verschiedener Parameter der Hybridisierung wurde demonstriert, dass Effektivität und Selektivität der Wechselwirkung zwischen Sonde und Target u.a. durch die Temperatur, den Hybridisierungspuffer, die Sondenlänge und die Anzahl von Basenfehlpaarungen in der Hybridisierungssequenz beeinflusst werden. So zeigte sich, dass im DNA-Sensorchip während der Assoziationsphase an einer 18mer-Sonde der Signalanstieg schon durch einen einzelnen zentralen mismatch (mm) fast vollständig unterdrückt wurde.

Weil der Stofftransport im DNA-Sensorchip nahezu nicht diffusionslimitiert, sondern maßgeblich nur durch Konvektion erfolgte, lief die Wechselwirkung zwischen Target und Fangsonde im Wesentlichen kinetisch kontrolliert ab. Das Messsystem konnte daher für die Durchführung ausführlicher kinetischer Studien genutzt werden, wobei neben der Assoziationsphase auch das Gleichgewicht sowie die Dissoziationsphase der Hybridisierungsreaktion verfolgt wurden. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} für die Asso-

ziation und k_{off} für die Dissoziation und auch die Werte für die Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation K_D zeigten, dass sich Basenfehlpaarungen und auch die Länge der Hybridisierungssequenz auf alle drei Phasen der Bindungsreaktion auswirkten. Die für verschiedene Hybridisierungssequenzen ermittelten Werte lagen dabei in ähnlichen Größenordnungen wie Literaturdaten, die mit anderen DNA-Biosensorsystemen generiert worden waren, Basenfehlpaarungen allerdings erst in der Dissoziationsphase identifizieren konnten. Ein wesentlicher Vorteil der Hybridisierung im DNA-Sensorchip lag deshalb darin, dass mismatches bereits während der Assoziationsphase detektiert werden konnten.

Zum Abschluss der grundlagenorientierten Untersuchungen wurde demonstriert, dass das Sensorsystem ebenso wie für die Hybridisierung von Modell-Targetoligonukleotiden auch für die Hybridisierung von fluorophormarkierten PCR-Produkten geeignet war, wobei doppelsträngige PCR-Produkte für eine optimale Hybridisierungseffizienz vor der Messung denaturiert werden mussten. Die grundlegenden Eigenschaften der Hybridisierung im DNA-Sensorchip, wie z.B. der lineare Zusammenhang zwischen Targetkonzentration und zeitlicher Signaländerung, die Arbeitsstabilität und die Linearität der Kalibration, blieben beim Übergang vom Target-Oligonukleotid zum PCR-Produkt erhalten.

Im Rahmen der Entwicklung einer neuen Methode zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln wurde zunächst ein Konsensus-PCR-System zur Amplifikation eines Teilabschnittes des mitochondrialen cytb-Gens der Spezies Rind, Schwein, Huhn, Pute, Schaf und Ziege etabliert. Durch die Konzeptionierung der Primer cytb403 und cytb779, die jeweils in sequenzkonservierten Bereichen des cytb-Gens der verschiedenen Spezies binden, wurden dabei speziesunabhängig 377 bp große Amplifikate mit inneren interspezifisch variablen Sequenzbereichen erzeugt. Während die Analyse von Konsensus-PCR-Produkten im Bereich der Tierartendifferenzierung konventionell meist durch die zeitaufwendige und nicht immer eindeutige Restriktionsanalyse (RFLP) erfolgt, wurden diese hier schnell und zuverlässig durch die Hybridisierung mit artspezifischen Sondensequenzen im DNA-Sensorchip analysiert. Durch die Positionierung der 20mer-Sonden in den interspezifisch variablen Bereichen der PCR-Produkte wurde eine ausreichende Spezifität der Hybridisierung gewährleistet. Dabei trat lediglich an der Ziege684-Sonde eine unerwartete Kreuzhybridisierung des Schwein-PCR-Produktes trotz 9 mismatches zwischen dem cytb-Gen beider Spezies im Bereich der Sondensequenz auf. Weil in der Routinekontrolle aber normalerweise keine Proben auftreten, die sowohl Schwein- als auch Ziegenbestandteile enthalten, konnte diese Kreuzhybridisierung im weiteren Verlauf zunächst toleriert werden, zumal sich die Entwicklung einer alternativen Sonde für Ziege aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen Ziege, Schaf und Rind als kompliziert erwies.

Durch die Analyse der 377bp-PCR-Produkte im DNA-Sensorchip wurde deutlich, dass trotz des ausgeglichenen Verhältnisses der Primer cytb403 und Cy5cytb779 im PCR-Ansatz unter

Standardbedingungen der Cy5-markierte *antisense*-Strang in einem deutlichen Überschuss vorlag, wahrscheinlich verursacht durch eine unterschiedliche Bindungseffizienz der beiden Primer. Durch diese asymmetrische PCR-Produkt-Verteilung konnte bei der Hybridisierungsanalyse der Amplifikate grundsätzlich auf den Denaturierungsschritt verzichtet und der Zeitbedarf der Methode dadurch weiter verkürzt werden. Außerdem wurden insgesamt höhere Signalintensitäten erhalten, weil die Hybridisierung nicht durch ein sonst unausweichliches *Re-Annealing* des komplementären *sense*-Stranges gestört wurde.

Um die Nachweismethode zur Tierartendifferenzierung systematisch zu evaluieren und die Nachweisgrenzen der Methode abzuschätzen, wurden nach der Hybridisierung von reinen PCR-Produkten der einzelnen Spezies auch Mischproben analysiert. Die PCR-Produkte verschiedener Spezies konnten störungsfrei parallel detektiert werden und aufgrund der hohen Sensitivität der PCR ließen sich sowohl in Mischungen der *Template*-DNA als auch in Mischungen von Rohfleisch 1%ige Beimengungen noch sehr sicher nachweisen. Die Methode erwies sich dabei aufgrund einer überproportionalen Amplifikation geringer Probenbestandteile wie erwartet nur als semi-quantitativ. Beimengungen von Huhn in Rind- sowie von Rind in Schweinefleisch konnten sogar noch bis zu 0.1 % nachgewiesen werden, wobei sich die flexible Anpassung des zur Analyse eingesetzten PCR-Produkt-Volumens und auch der große dynamische Messbereich über mindestens zwei Dekaden als vorteilhaft erwiesen. Weil sowohl die PCR- als auch die Hybridisierungseffizienzen für die verschiedenen Spezies jeweils in derselben Größenordnung lagen, waren für die Anwendung in der Praxis ebenfalls grundsätzlich vergleichbare Nachweisgrenzen für alle Spezies zu erwarten.

Die neue Methode zur Tierartendifferenzierung wurde abschließend zur Analyse zahlreicher Fleisch- und Käseproben aus der Routinekontrolle eines Lebensmitteluntersuchungsamtes eingesetzt. Unabhängig davon, ob in den Proben nur einzelne oder bis zu vier verschiedene Spezies vorhanden waren, ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Referenzanalytik. Im Gegensatz zu den verschiedenen immunchemischen und molekularbiologischen Referenzmethoden, die bisher in der Routinekontrolle eingesetzt werden und immer an die jeweilige Fragestellung angepasst werden müssen, kann das hier entwickelte Verfahren unabhängig von der Art der untersuchten Probe und der nachzuweisenden Spezies immer nach demselben Schema durchgeführt werden und verlangt vom Anwender keine gezielte Abstimmung. Es ist außerdem zeitlich weniger aufwendig als die zur Zeit eingesetzten Methoden der tierartspezifischen PCR und des PCR-RFLP.

Ergänzend zur Hybridisierung im DNA-Sensorchip wurde auch eine Methode zur Analyse der *cytb*-PCR-Produkte durch konventionelle Hybridisierung auf DNA-Chips etabliert. Dabei ergaben sich im Vergleich zur Realzeithybridisierung zwar Nachteile durch eine schlechtere Reproduzierbarkeit, stärkere unspezifische Wechselwirkungen, einen größeren Verbrauch an Objektträgern mit immobilisierten Sondenarrays und einen größeren zeitlichen Arbeitsauf-

wand. Allerdings wurden wie im DNA-Sensorchip Nachweisgrenzen im Bereich von ca. 0.1 % für Fleischmischproben erreicht und unter Berücksichtigung der auftretenden Kreuzhybridisierungen konnten auch mit dieser Methode die Ergebnisse der Referenzanalytik für die meisten Realproben sehr gut bestätigt werden. Da dieses Verfahren ohne das bislang nur als Laborprototyp vorliegende Auslesegerät für die Sensorchips auskommt, kann es auch von Laboren mit Zugang zu einem handelsüblichen Mikroarrayscanner durchgeführt werden.

Das praktische Potential der Realzeithybridisierung im DNA-Sensorchip wurde außerdem vor dem Hintergrund der Mikroorganismendetektion demonstriert. Dazu wurde als Modellsystem ein 132 Oligonukleotidsequenzen umfassendes Sondenset zum Nachweis aller bekannten sulfatreduzierenden Prokaryonten (SRPs) betrachtet, das zuvor von dem Kooperationspartner für die konventionelle Hybridisierung auf dem sog. SRP-PhyloChip entwickelt worden war. Durch den Nachweis der drei Spezies *Dsv. halophilus*, *Dsm. aspheronum* und *Dsh. retbaense* auf speziell ausgewählten 18mer-Sondensequenzen wurden hier grundlegende Vorversuche zur Übertragung des SRP-Nachweises auf den DNA-Sensorchip durchgeführt.

Aufgrund der relativ geringen interspezifischen Diversität des in einer Konsensus-PCR amplifizierten 16S rRNA-Gens mussten für eine eindeutige Detektion der drei Spezies auch sehr nah verwandte Sequenzen mit nur wenigen Basenfehlpaarungen differenziert werden. In den meisten Fällen konnte tatsächlich bereits während der Assoziationsphase sehr deutlich zwischen perfectmatch- und 1mm- bzw. 2mm-Paarungen unterschieden werden. Lediglich der G-T-mismatch wirkte sich kaum auf die Bindungsstärke aus. Dieses bekannte Phänomen beruht darauf, dass die G-T-Fehlpaarung immerhin noch zwei stabile Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet. Dies unterstrich, dass beim Design spezifischer Sonden grundsätzlich nicht nur die Länge der Hybridisierungssequenz und die Anzahl der mismatches, sondern auch Art und Position der Basenfehlpaarungen berücksichtigt werden müssen.

Für den SRP-Nachweis ergab sich durch die Anwendung des DNA-Biosensorsystems ein besonderer Vorteil dadurch, dass aufgrund der integrierten Fluidik eine Feinabstimmung der Stringenz und damit eine optimale Spezifität für jede einzelne Sonde erreicht werden konnten. Während die konventionelle Hybridisierung auf dem SRP-PhyloChip nur unter monostriktanten Bedingungen durchgeführt werden konnte, erlaubte der DNA-Sensorchip eine dynamische Betrachtung des Systems durch eine gezielte Stringenzerhöhung während der Dissoziationsphase. Dadurch war z.B. auch noch eine Differenzierung des G-T-mismatches möglich und es wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass die optimalen Stringenzbedingungen für die zahlreichen Sequenzen des Sondensets teilweise deutlich voneinander abweichen. Die Analyse im DNA-Sensorchip bietet damit eine Möglichkeit für die schnelle und eindeutige Identifizierung nah verwandter Zielsequenzen auf einem komplexen Sondenarray.

8 Anhang

8.1 Nomenklatur und Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Tab. 22 Oligonukleotide zur Optimierung und Charakterisierung des DNA-Biosensors

(mm: mismatch (Basenfehlpaarung); grau unterlegt: Position des mismatches)

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	GC (%)	T _m (°C)	Länge (bp)
Targets:	Cy5-			
NPT1-18-Cy5	CTGCCTCGTCCTGCAGTT	61	58	18
NPT1-56-Cy5	CACAGCTGCGCAAGGAACGCTGCCTCGTCC TGCAGTTGAACACGGCGGCATCAGAG	63	79	56
Actin-51-Cy5	TGGGAGTGGGTGGAGGCAGCCAGGGCTTAC CTGTACACTGACTTGAGACCA	59	76	51
CD31-50-Cy5	ACAGCAAGGCCAGATGCACATCCCTGGAAG GACATCCATGTTCCGAGAAG	54	74	50
c-erb-50-Cy5	TGAGGAAGGAACAGCAATGGTGTCTCAGTATC CAGGCTTTGTACAGAGTGCT	48	71	50
GAPDH-50-Cy5	ACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATG TAGACCCCTTGAAGAGGGGA	54	74	50
Sonden:	NH ₂ -C ₁₂ -			
NPT1-18-0mm	T ₈ -AACTGCAGGACGAGGCAG	61	58	18 ¹⁾
NPT1-18-1mm	T ₈ -GACGGAGCACGACGTCAA	61	53	18
NPT1-18-3mm	T ₈ -GAGGGAGCACGACGTGAA	61	53	18
Actin-45-0mm	T ₈ -TCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAGC CCTGGCTGCCTCCACCCACTC	58	74	45
Actin-45-5mm	T ₈ -TCTCAAGTCAGTGTACAGGTGACC ACTAGATGCCTCCACCCACTC	53	72	45
Actin-45-10mm	T ₈ -TCTCAAGTCAGTATATAGATGACC ACTAGATACGTCCACCCACTC	44	68	45
CD31-44-0mm	T ₈ -CTCGGAACATGGATGTCCTTCCAG GGATGTGCATCTGGCCTTGC	57	73	44
c-erb-47-0mm	T ₈ -AGCACTCTGTACAAAGCCTGGATA CTGACACCATTGCTGTTCCCTTCC	49	71	47
GAPDH-44-0mm	T ₈ -CCTCTTCAAGGGTCTACATGGCA ACTGTGAGGAGGGGAGATTC	55	72	44
Sonstige:				
Actin-51-gegen	TGGTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAGCCCT GGCTGCCTCCACCCACTCCCA	59	76	51
Positionsmarker (5'-Cy5 und 3'-NH ₂)	ACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATG TAGACCCCTTGAAGAGGGGA-T ₈	54	74	50

¹⁾ Gezählt wurden bei den Sonden nur die tatsächlich hybridisierenden Nukleotide.

Tab. 23 Oligonukleotide zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln

(R: A oder G, W: A oder T, D: A oder G oder T (ohne C))

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	GC (%)	T _m (°C)	Länge (bp)
Primer:				
cytb403	CCATGRGGACAAATATCATTCTGAGG	44	62	26
cytb779	TGGGGTGWAGTTDTCTGGGTCTCC	56	65	24
Cy5cytb779	Cy5-TGGGGTGWAGTTDTCTGGGTCTCC	56	65	24
Sonden: NH ₂ -C ₁₂ -				
Huhn684	T ₈ -CATTCTGGGCTTAACTCTCA	45	50	20 ¹⁾
Pute684	T ₈ -CATCCTAGGTCTAACAATCA	40	48	20
Rind684	T ₈ -CATCTTAGGGGCCCTCTTAC	55	54	20
Schaf684	T ₈ -CATCCTAGGTGCTATCCTAC	50	52	20
Schaf566	T ₈ -TCGCAGCCCTCGCCATAGTT	60	56	20
Schwein684	T ₈ -CATTCTAGGAGCCTTATTTA	35	46	20
Schwein566	T ₈ -TTACCGCCCTCGCAGCCGTA	65	58	20
Ziege684	T ₈ -TATCTTAGGCGCCATGCTAC	50	52	20
Ziege703	T ₈ -CTAATTCTTGTCCCTAATACTAC	32	47	22
Rind684anti	T ₈ -GTAAGAGGGCCCTAAGATG	55	54	20
Targets: Cy5-				
Rind-46-Cy5	AGAGCTAGAATTAGTAAGAGGGCCCTAAGATG TCCTTAATGGTAT	41	72	46
Huhn-46-Cy5	AATGGGGTGTAGTATGAGAGTTAAGCCCAGAATG TCTTTGAAGGAGT	44	73	46

¹⁾ Gezählt wurden bei den Sonden nur die tatsächlich hybridisierenden Nukleotide.

Tab. 24 Oligonukleotide zur Detektion von Mikroorganismen

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	GC (%)	T _m (°C)	Länge (bp)
Targets:	Cy5-			
Halop385-Cy5	TGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGTGTGC GGGAA	68	75	38
Retba385-Cy5	TGGGCGCAAGCCTGACCCAGCAACGCCGCGTGT GGGAT	68	75	38
Asphe385-Cy5	TGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGTGTGA GGGAT	63	73	38
Halop698-Cy5	GGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACC GGTGG	53	69	38
Retba698-Cy5	GGAGTGAAATCCGTAGATATCGGGAGGAATACC AGTGG	50	68	38
Asphe698-Cy5	GGAGTGAAATCCGTAGATATCAGGAGGAACACC GGTGG	53	69	38
Sonden:	NH ₂ -C ₁₂ -			
SRB385	T ₁₅ -CGGCGTCGCTGCGTCAGG	78	59	18 ¹⁾
SRB385Db	T ₁₅ -CGGCGTTGCTGCGTCAGG	72	57	18
DSV698	T ₁₅ -TCCTCCAGATATCTACGG	50	48	18
EUB338	T ₁₅ -GCTGCCTCCCGTAGGAGT	67	55	18

¹⁾ Gezählt wurden bei den Sonden nur die tatsächlich hybridisierenden Nukleotide.

Die Sequenzen aller Oligonukleotide des Modellsystems zur Detektion von Mikroorganismen wurden bereits vorab im Rahmen des Projektes „Entwicklung von Oligonukleotid-DNA-Chips“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Schleifer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München) entwickelt und in dieser Arbeit zur Demonstration der Nachweismethode im DNA-Sensorchip eingesetzt.

Die GC-Gehalte sowie die Schmelztemperaturen aller Oligonukleotide wurden mit Hilfe des *Oligonucleotide Properties Calculators* (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligo.html>) bestimmt.

8.2 Sequenzvergleich des *cytb*-Gens verschiedener Spezies

Die Sequenzdaten des *cytb*-Gens der mtDNA für die in dieser Arbeit betrachteten Spezies wurden mit der Datenbank *Genbank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) erhalten. In Tab. 25 sind für alle Spezies die Daten der Sequenzen zusammengefasst, denen die hier im weiteren Verlauf verwendeten *cytb*-Abschnitte entnommen worden sind.

Tab. 25 Sequenzdaten der verschiedenen Spezies

Tierart	Spezies	Accession-No.	Datenbankeintrag (Länge)
Huhn	<i>Gallus gallus</i>	NC_001323	Referenz Mitochondrion (16775 bp)
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	NC_001807	Referenz Mitochondrion (16571 bp)
Pferd	<i>Equus caballus</i>	NC_001640	Referenz Mitochondrion (16660 bp)
Pute	<i>Meleagris gallopavo</i>	L08381	<i>cytb</i> -Gen (1143 bp)
Rind	<i>Bos taurus</i>	NC_001567	Referenz Mitochondrion (16338 bp)
Schaf	<i>Ovis aries</i>	NC_001941	Referenz Mitochondrion (16616 bp)
Schwein	<i>Sus scrofa</i>	NC_000845	Referenz Mitochondrion (16613 bp)
Ziege	<i>Capra hircus</i>	X56289	<i>cytb</i> -Gen (1140 bp)

Der Sequenzvergleich (*alignment*) des *cytb*-Gens der mtDNA für die verschiedenen Spezies ist in Abb. 108 gezeigt. Markiert sind darin die Positionen sowohl der beiden Primer *cytb*403 und *cytb*779, die die Grenzen der 377bp-PCR-Produkte vorgeben, als auch der beiden Sondenbereiche 566 und 684. Hervorgehoben durch rote Anmerkungen sind dabei außerdem die Positionen der Primersequenzen, die zwecks einer besseren universellen Anbindung der Primer an alle hier untersuchten Spezies bewusst in einer statistischen Verteilung zwei oder drei verschiedene Basen (*wobbles*) aufweisen.

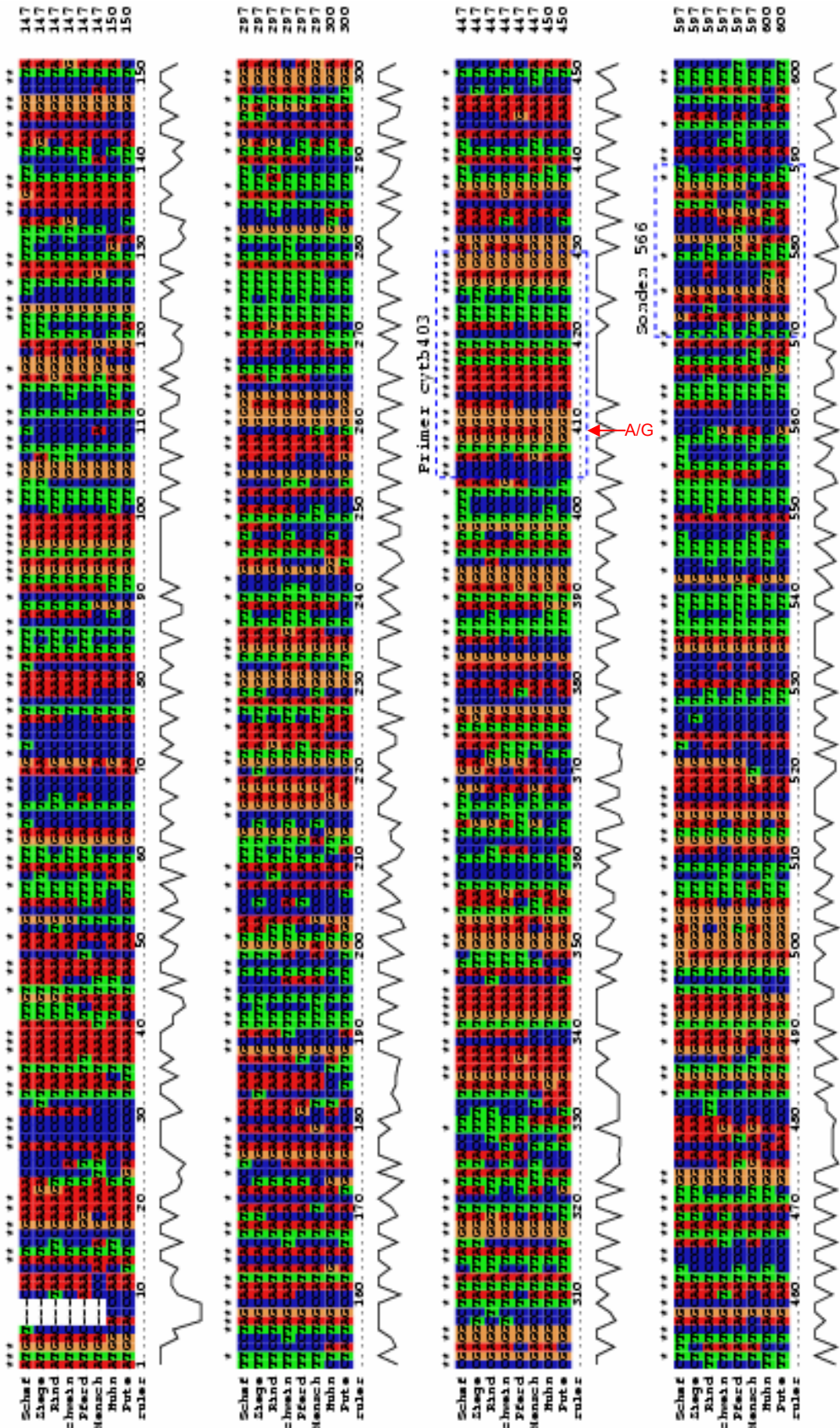


Abb. 108 Sequenzvergleich des cytb-Gens der mtDNA für die verschiedenen Spezies

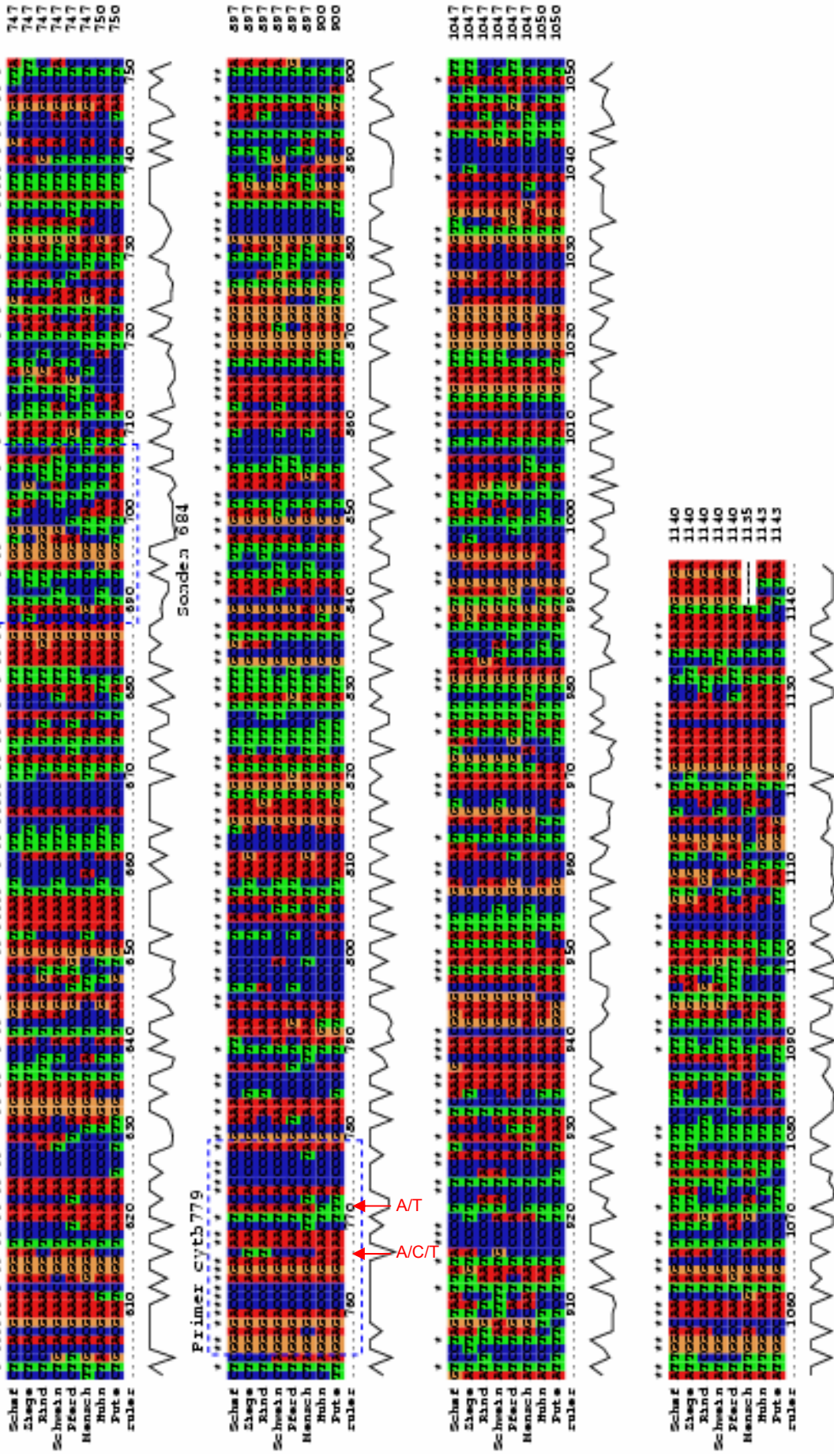
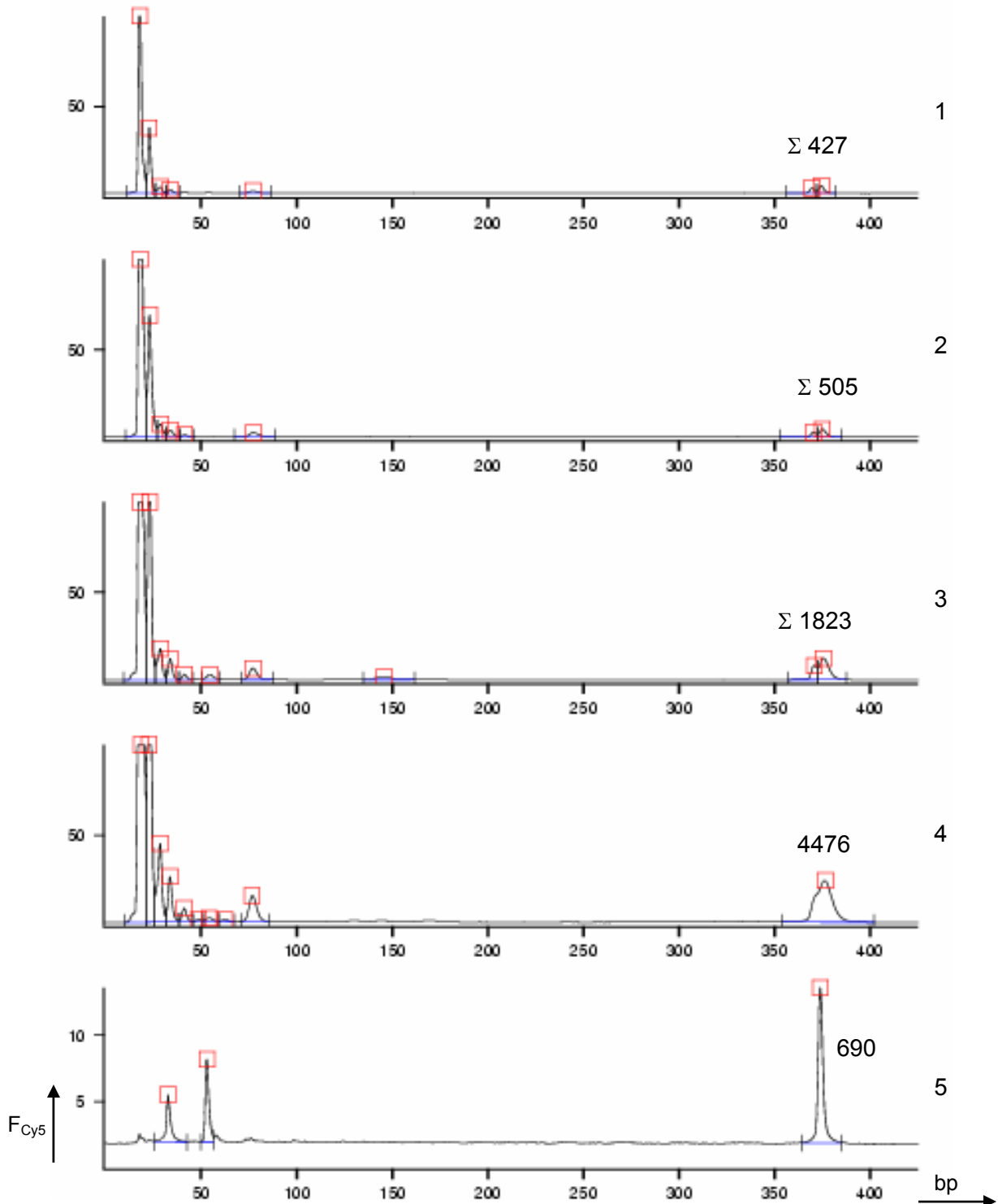


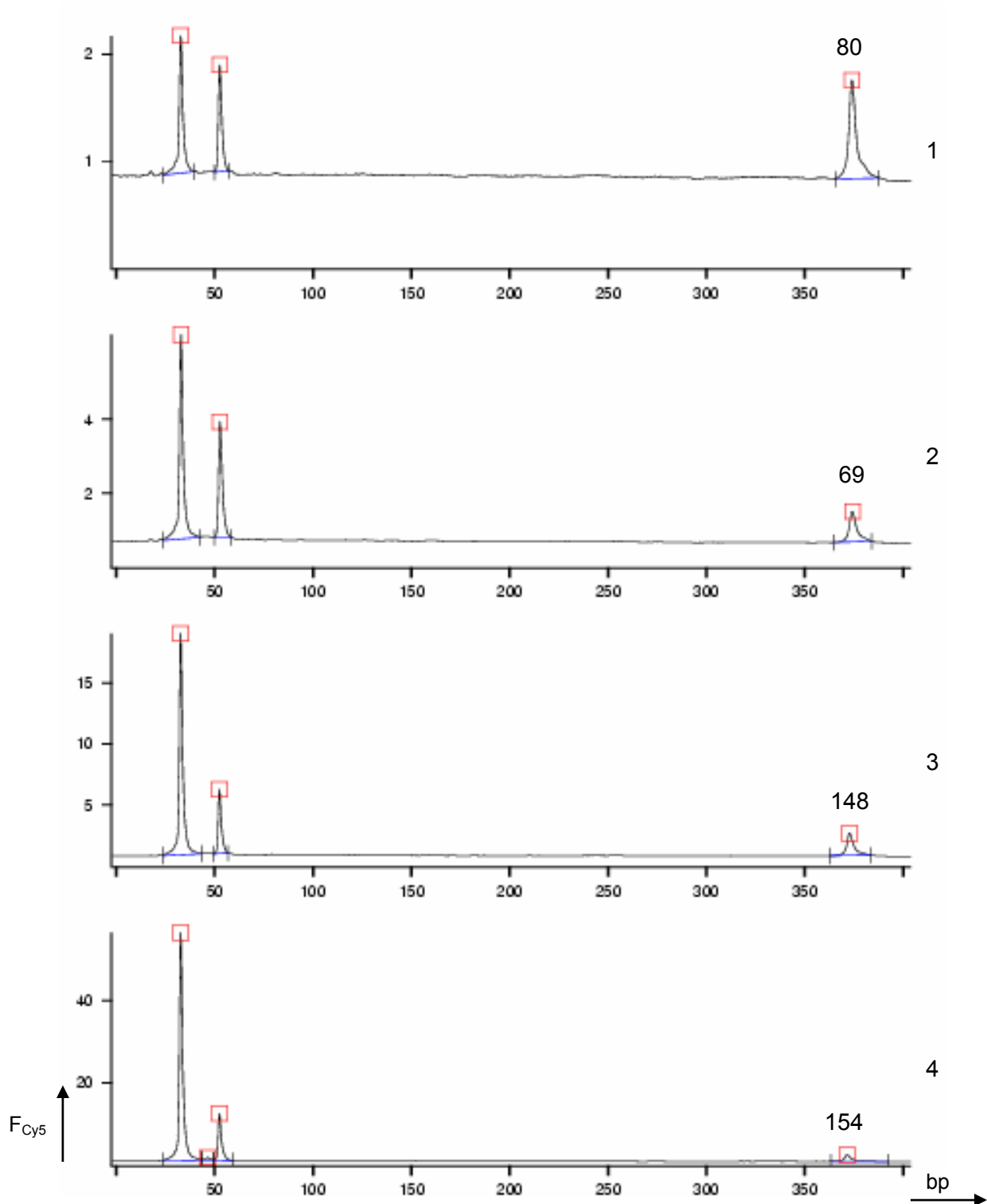
Abb. 108 Fortsetzung

8.3 Ergebnisse der Fluoreszenzdetektion am ALFexpress™ Analysesystem

8.3.1 Analyse 1



8.3.2 Analyse 2



1-4: PCR-Produkte aus Huhn-*Template* (R-1) in gleicher Verdünnung aufgetragen, 1: je 10 pmol Primer/Ansatz, 2: je 20 pmol Primer/ Ansatz, 3: je 40 pmol Primer/Ansatz, 4: je 80 pmol Primer/Ansatz. Fluoreszenzsignal F_{Cy5} angegeben im Verhältnis (%) zur Intensität des gesättigten Signals, an den 377bp-Peaks sind die Flächenintegrale (in counts) vermerkt. Deutlich wird wie erwartet eine starke Zunahme des Cy5-Primer- und des Primer-Dimer-Peaks, wobei das Cy5-Primer-Signal im Verhältnis stärker zugenommen hat

9 Literatur

- 1 Matissek, R., Schnepel, F.M., Steiner, G., *Lebensmittelanalytik*. Springer Verlag, Berlin, 1992
- 2 Mullis, K.B., The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262 (1990) 56-65
- 3 Ogden, R.C., Adams, D.A., Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol.* 152 (1987) 61-87
- 4 Darling, D.C., Brickell, P.M., *Nukleinsäure-Blotting*, Reihe: Labor im Fokus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994
- 5 Beneke, B., Hagen, M., Eignung der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) – Tierarten-nachweis in erhitzten Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* 78 (1998) 1016-1019
- 6 Niemeyer, C.M., Blohm, D., DNA-Mikroarrays. *Angew. Chem.* 111 (1999) 3039-3043
- 7 Kwok, P.Y., Chen, X., Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5 (2003) 43-60
- 8 Wen, S.Y., Wang, H., Sun, O.J., Wang, S.Q., Rapid detection of the known SNPs of CYP2C9 using oligonucleotide microarray. *World J. Gastroenterol.* 9 (2003) 1342-1346
- 9 Holst-Jensen, A., Ronning, S.B., Lovseth, A., Berdal, K.G., PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 985-993
- 10 Anthony, R.M., Brown, T.J., French, G.L., Rapid detection of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 781-788
- 11 Graham, C.A., Hill, A.J., Introduction to DNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* 167 (2001) 1-12
- 12 Mitnik, L., Novotny, M., Felten, C., Buonocore, S., Koutny, L., Schmalzing, D., Recent advances in DNA sequencing by capillary and microdevice electrophoresis. *Electrophoresis* 22 (2001) 4104-4117
- 13 Arthur, J.M., Proteomics. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 12 (2003) 423-430
- 14 Pawson, T., Nash, P., Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300 (2003) 445-452

- 15 Storck, T., von Brevern, M.C., Behrens, C.K., Scheel, J., Bach, A., Transcriptomics in predictive toxicology. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5 (2002) 90-97
- 16 Betts, J.C., Transcriptomics and proteomics: tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis. *IUBMB Life.* 53 (2002) 239-242
- 17 Haberhausen, G., Jurk, M., Kessler, C., Wirkner, U., Zimmermann, J., Zorbas, H., Bioanalytik. Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998
- 18 Pingoud, A., Urbanke, C., Arbeitsmethoden der Biochemie. Walter de Gruyter, Berlin, 1997
- 19 Christopoulos, T.K., Nucleic Acid Analysis. *Anal. Chem.* 71 (1999) 425R-438R
- 20 Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Molekularbiologie der Zelle. Jaenicke, L. (Hrsg.), VCH Weinheim, New York, 1995
- 21 Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (1981) 457-465
- 22 Stryer, L., Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1995
- 23 Schildkraut, C., Lifson, S., Dependence of the melting temperature of DNA on the salt concentration. *Biopolymers* 3 (1965) 195-208
- 24 McConaughy, B.L., Laird, C.D., McCarthy, B.J., Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochemistry* 8 (1969) 3289-3295
- 25 Thomas, C.A.J., Dancis, B.M., Ring stability. *J. Mol. Biol.* 77 (1973) 43-55
- 26 Casey, J., Davidson, N., Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucl. Acids Res.* 4 (1977) 1539-1552
- 27 Anderson, M.L.M., Young, B.D., Nucleic acid hybridization: a practical approach. Hames B.D., Higgins, S.J. (Hrsg.), IRL Press, Oxford, 1985
- 28 Healey, B.G., Matson, R.S., Walt, D.R., Fiber optic DNA sensor array capable of detecting point mutations. *Anal. Biochem.* 251 (1997) 270-279
- 29 Dong, S., Wang, E., Hsie, L., Yanxiang, C., Xiaogiong, C., Gingeras, T.R., Flexible use of high-density oligonukleotide arrays for single-nucleotide polymorphism discovery and validation. *Genome Res.* 11 (2001) 1418-1424

- 30 Amasino, R.M., Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal. Biochem.* 152 (1986) 304-307
- 31 Newton, C.R., Graham, A., PCR, Reihe: Labor im Fokus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1997
- 32 Minjolle, S., Arvieux, C., Gautier, A.L., Jusselin, I., Thomas, R., Michelet, C., Colimon, R., Detection of herpesvirus genomes by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and clinical findings. *J. Clin. Virol.* 25 (2002) 59-70
- 33 Meng, Q., Wong, C., Rangachari, A., Tamatsukuri, S., Sasaki, M., Fiss, E., Cheng, L., Ramankutty, T., Clarke, D., Yawata, H., Sakakura, Y., Hirose, T., Impraim, C., Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 2937-2945
- 34 Gyllensten, U.B., Erlich, H.A., Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 (1988) 7652-7656
- 35 Cammann, K., Chemnitz, G.C., Kleiböhmer, W., Instrumentelle Analytische Chemie. Cammann, K. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001
- 36 Scheller, F., Schubert, F., Biosensoren. Birkhäuser Verlag, Berlin, 1989
- 37 Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R., Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal. Chim. Acta* 375 (1998) 197-203
- 38 Ju, H.X., Ye, Y.K., Zhao, J.H., Zhu, Y.L., Hybridization biosensor using di(2,2'-bipyridine)osmium (III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain reaction product of hepatitis B virus DNA. *Anal. Biochem.* 313 (2003) 255-261
- 39 Caruana, D.J., Heller, A., Enzyme-amplified amperometric detection of hybridization and of a single base pair mutation in an 18-base oligonucleotide on a 7- μ m-diameter microelectrode. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 769-774
- 40 Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M., Allele-specific genotype detection of factor V Leiden mutation from polymerase chain reaction amplicons based on label-free electrochemical genosensor. *Anal. Chem.* 74 (2002) 5931-5936

- 41 Wang, J., Nielsen, P.E., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M., Mismatch-sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.* 69 (1997) 5200-5202
- 42 Tombelli, S., Mascini, M., Braccini, L., Anichini, M., Turner, A.P.F., Coupling of a DNA piezoelectric biosensor and polymerase chain reaction to detect apolipoprotein E polymorphisms. *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 363-370
- 43 Bier, F.F., Fürste, J.P., Nucleic acid based sensors, in: *Frontiers in Biosensorics I, Fundamental Aspects.* Scheller, F.W., Schubert, F., Fedrowitz, J. (Hrsg.), Birkhäuser Verlag, Basel, 1997
- 44 Vercoutere, W., Akeson, M., Biosensors for DNA sequence detection. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 (2002) 816-822
- 45 Gotoh, M., Hasegawa, Y., Shinohara, Y., Shimizu, M., Tosu, M., A new approach to determine the effect of mismatches on kinetic parameters in DNA hybridization using an optical biosensor. *DNA Research* 2 (1995) 285-293
- 46 Gotoh, M., Hasebe, M., Ohira, T., Hasegawa, Y., Shinohara, Y., Sota, H., Nakao, J., Tosu, M., Rapid method for detection of point mutations using mismatch binding protein (MutS) and an optical biosensor. *Genet. Anal.* 14 (1997) 47-50
- 47 Persson, B., Stenhag, K., Nilsson, P., Larsson, A., Uhlén, M., Nygren, P.A., Analysis of oligonucleotide probe affinities using surface plasmon resonance: a means for mutational scanning. *Anal. Biochem.* 246 (1997) 34-44
- 48 O'Meara, D., Nilsson, P., Nygren, P.A., Uhlén, M., Lundeberg, J., Capture of single-stranded DNA assisted by oligonucleotide molecules. *Anal. Biochem.* 255 (1998) 195-203
- 49 Bianchi, N., Rutigliano, C., Tomassetti, M., Feriotto, G., Zorzato, F., Gambari, R., Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction. *Clin. Diagn. Virol.* 8 (1997) 199-208
- 50 Nilsson, P., Larsson, A., Lundeberg, J., Uhlén, M., Nygren, P.A., Mutational scanning of PCR products by subtractive oligonucleotide hybridization analysis. *BioTechniques* 26 (1999) 308-316
- 51 Kai, E., Sawata, S., Ikebukuro, K., Iida, T., Honda, T., Karube, I., Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* 71 (1999) 796-800

- 52 Feriotto, G., Corradini, R., Sforza, S., Bianchi, N., Mischiati, C., Marchelli, R., Gambari, R., Peptide nucleic acids and biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation by surface plasmon resonance. *Lab. Invest.* 81 (2001) 1415-1427
- 53 Feriotto, G., Borgatti, M., Mischiati, C., Bianchi, N., Gambari, R., Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified Roundup Ready soybean gene sequences. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 955-962
- 54 Nelson, B.P., Grimsrud, T.E., Liles, M.R., Goodman, R.M., Corn, R.M., Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Anal. Chem.* 73 (2001) 1-7
- 55 Cush, R., Cronin, J.M., Stewart, W.J., Maule, C.H., Molloy, J., Goddard, N.J., The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions, Part I: Principle of operation and associated instrumentation. *Biosens. Bioelectron.* 8 (1993) 347-353
- 56 Buckle, P.E., Davies, R.J., Kinning, T., Yeung, D., Edwards, P.R., Pollard-Knight, D., Lowe, C.R., The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions, Part II: Applications. *Biosens. Bioelectron.* 8 (1993) 355-363
- 57 Watts, H., Yeung, D., Parkes, H., Real-time detection and quantification of DNA hybridization by an optical biosensor. *Anal. Chem.* 67 (1995) 4283-4289
- 58 Bier, F.F., Scheller, F.W., Label-free observation of DNA-hybridization and endonuclease activity on a wave guide surface using a grating coupler. *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 669-674
- 59 Bier, F.F., Kleinjung, F., Scheller, F.W., Real-time measurement of nucleic acid hybridization using evanescent-wave sensors: Steps towards the genosensor. *Sensor. Actuat. B38-39* (1997) 78-82
- 60 Voros, J., Ramsden, J.J., Csucs, G., Szendro, I., De Paul, S.M., Textor, M., Spencer, N.D., Optical grating coupler biosensors. *Biomaterials* 23 (2002) 3699-3710
- 61 Piunno, P.A.E., Krull, U.J., Fiber-optic DNA sensor for fluorimetric nucleic acid determination. *Anal. Chem.* 67 (1995) 2635-2643
- 62 Kleinjung, F., Bier, F.F., Warsinke, A., Scheller, F.W., Fiber-optic genosensor for specific determination of femtomolar DNA oligomers. *Anal. Chim. Acta* 350 (1997) 51-58

-
- 63 Liu, X., Tan, W., A fiber-optic evanescent wave DNA biosensor based on novel molecular beacons. *Anal. Chem.* 71 (1999) 5054-5059
- 64 Li, J., Tan, W., Wang, K., Xiao, D., Yang, X., He, X., Tang, Z., Ultrasensitive optical DNA biosensor based on surface immobilization of molecular beacon by a bridge structure. *Anal. Sci.* 17 (2001) 1149-1153
- 65 Duveneck, G.L., Pawlak, M., Neuschäfer, D., Bär, E., Budach, W., Pielas, U., Ehrat, M., Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides. *Sensor. Actuat. B38-39* (1997) 88-95
- 66 Budach, W., Abel, A.P., Bruno, A.E., Neuschäfer, D., Planar waveguides as high-performance sensing platforms for fluorescence-based multiplexed oligonucleotide hybridization assays. *Anal. Chem.* 71 (1999) 3347-3355
- 67 Schuderer, J., Akkoyun, A., Brandenburg, A., Bilitewski, U., Wagner, E., Development of a multichannel fluorescence affinity sensor system. *Anal. Chem.* 72 (2000) 3942-3948
- 68 Liebermann, T., Knoll, W., Sluka, P., Herrmann, R., Complement hybridization from solution to surface-attached probe-oligonucleotides observed by surface-plasmon-field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Colloid. Surface. A* 169 (2000) 337-350
- 69 Kambhampati, D., Nielsen, P.E., Knoll, W., Investigating the kinetics of DNA-DNA and PNA-DNA interactions using surface plasmon resonance-enhanced fluorescence spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 1109-1118
- 70 Tolley, S.E., Wang, H.K., Smith, R.S., Christensen, D.A., Herron, J.N., Single-chain polymorphism analysis in long QT syndrome using planar waveguide fluorescent biosensors. *Anal. Biochem.* 315 (2003) 223-237
- 71 Abel, A.P., Weller, M.G., Duveneck, G.L., Ehrat, M., Widmer, H.M., Fiber-optic evanescent wave biosensor for the detection of oligonucleotides. *Anal. Chem.* 68 (1996) 2905-2912
- 72 Lü, H., Zhao, Y., Ma, J., Li, W., Lu, Z., Characterization of DNA hybridization on the optical fiber surface. *Colloid. Surface. A* 175 (2000) 147-152
- 73 Watterson, J.H., Piuino, P.A.E., Wust, C.C., Rha, S., Krull, U.J., Influences of non-selective interactions of nucleic acids on response rates of nucleic acid fiber optic biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 601-608

-
- 74 Meusel, M., Trau, D., Katerkamp, A., Meier, F., Polzius, R., Cammann, K., New ways in bioanalysis – one-way optical sensor chip for environmental analysis. *Sensor. Actuat. B51* (1998) 249-255
- 75 Schult, K., Katerkamp, A., Trau, D., Grawe, F., Cammann, K., Meusel, M., Disposable optical sensor chip for medical diagnostics: new ways in bioanalysis. *Anal. Chem.* 71 (1999) 5430-5435
- 76 Peter, C., Meusel, M., Grawe, F., Katerkamp, A., Cammann, K., Börchers, T., Optical DNA-sensor chip for real-time detection of hybridization events. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 120-127
- 77 Begemann, S., Entwicklung eines optischen DNA-Sensors zum simultanen Nachweis des *invA*-Gens von *Salmonella spp.* und des *ctxA*-Gens aus *Vibrio cholerae*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2002
- 78 Flotho, S., Einsatz neuartiger NIR-Fluoreszenzfarbstoffe zum Nachweis von DNA-DNA-Hybridisierung mit Hilfe eines Evaneszent-Feld-Biosensors. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2001
- 79 Schult, K., Entwicklung von fluoreszenzoptischen Evaneszent-Feld-Biosensoren zur Immun- und Nukleinsäure-Analytik in Realzeit. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2000
- 80 Peterson, A.W., Wolf, L.K., Georgiadis, R.M., Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14601-14607
- 81 Erickson, D., Li, D., Krull, U.J., Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips. *Anal. Biochem.* 317 (2003) 186-200
- 82 O'Shannessy, D.J., Brigham-Burke, M., Soneson, K.K., Hensley, P., Brooks, I., Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. *Anal. Biochem.* 212 (1993) 457-468
- 83 Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (1995) 467-470
- 84 Ramaswamy, S., Tamayo, P., Rifkin, R., Mukherjee, S., Yeang, C.H., Angelo, M., Ladd, C., Reich, M., Latulippe, E., Mesirov, J.P., Poggio, T., Gerald, W., Loda, M., Lander, E.S., Golub, T.R., Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (2001) 15149-15154

- 85 Liu, E.T., Classification of cancers by expression profiling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13 (2003) 97-103
- 86 Chin, K.V., Kong, A.N., Application of DNA microarrays in pharmacogenomics and toxicogenomics. *Pharm. Res.* 19 (2002) 1773-1778
- 87 Rushmore, T.H., Kong, A.N., Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* 3 (2002) 481-490
- 88 Bugelski, P.J., Gene expression profiling for pharmaceutical toxicology screening. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5 (2002) 79-89
- 89 Geiss, G.K., Bumgarner, R.E., An, M.C., Agy, M.B., van't Wout, A.B., Hammersmark, E., Carter, V.S., Upchurch, D., Mullins, J.I., Katze, M.G., Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* 266 (2000) 8-16
- 90 Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., Golub, T.R., Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signalling and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 3260-3265
- 91 Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R., Smith, L.M., Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucl. Acids Res.* 22 (1994) 5456-5465
- 92 Hacia, J.G., Brody, L.C., Chee, M.S., Fodor, S.P.A., Collins, F.S., Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat. Genet.* 14 (1996) 441-447
- 93 Cutler, D.J., Zwick, M.E., Carrasquillo, M.M., Yohn, C.T., Tobin, K.P., Kashuk, C., Mathews, D.J., Shah, N.A., Eichler, E.E., Warrington, J.A., Chakravarti, A., High-throughput variation detection and genotyping using microarrays. *Genome Res.* 11 (2001) 1913-1925
- 94 Michael, K.L., Taylor, L.C., Schultz, S.L., Walt, D.R., Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays. *Anal. Chem.* 70 (1998) 1242-1248
- 95 Ferguson, J.A., Steemers, F.J., Walt, D.R., High-density fiber-optic DNA random microsphere array. *Anal. Chem.* 72 (2000) 5618-5624
- 96 Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J.E., Snesrud, E., Lee, N., Quackenbush, J., A concise guide to cDNA microarray analysis. *BioTechniques* 29 (2000) 548-562

- 97 Holloway, A.J., van Laar, R.K., Tothill, R.W., Bowtell, D.D.L., Options available – from start to finish – for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat. Genet.* 32 (2002) 481-489
- 98 Heller, M.J., DNA microarray technology: devices, systems and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4 (2002) 129-153
- 99 Allemand, J.F., Bensimon, D., Jullien, L., Bensimon, A., Corquette, V., pH-dependent specific binding and combining of DNA. *Biophys. J.* 73 (1997) 2064-2070
- 100 Carré, A., Lacarrière, V., Birch, W., Molecular interactions between DNA and an aminated glass substrate. *J. Colloid Interface Sci.* 260 (2003) 49-55
- 101 Lamture, J.B., Beattie, K.L., Burke, B.E., Eggero, H.D., Ehrlich, D.J., Fowler, R., Hollis, M.A., Kosicki, B.B., Reich, R.K., Smith, S.R., Varma, R.S., Hogan, M.E., Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucl. Acids Res.* 22 (1994) 2121-2125
- 102 Beier, M., Hoheisel, J.D., Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucl. Acids Res.* 27 (1999) 1970-1977
- 103 Zammattéo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L., Remacle, J., Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal. Biochem.* 280 (2000) 143-150
- 104 Beaucage, S.L., Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications. *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1213-1244
- 105 Pressemitteilung IP/03/906 der Europäischen Kommission vom 26.06.2003 (<http://www.europa.eu.int/rapid/start/cgi/guesten.ksh>)
- 106 Momcilovic, D., Rasooly, A., Detection and analysis of animal materials in food and feed. *J. Food. Protect.* 63 (2000) 1602-1609
- 107 Hofmann, K., Nachweis der Tierart bei Fleisch und Fleischerzeugnissen, 1. Mitteilung. *Fleischwirtschaft* 77 (1997) 38-40
- 108 Hofmann, K., Nachweis der Tierart bei Fleisch und Fleischerzeugnissen, 2. Mitteilung. *Fleischwirtschaft* 77 (1997) 151-154
- 109 King, N.L., Kurth, L.J., Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme-staining of isoelectric focusing gels. *J. Food Sci.* 47 (1982) 1608-1612
- 110 McCormick, R.J., Collins, D.A., Field, R.A., Moore, T.D., Identification of meat from game and domestic species. *J. Food Sci.* 57 (1992) 516-520

- 111 Jemmi, T., Schlosser, H., Tierartbestimmung aus mariniertem und erhitztem Fleisch mittels isoelektrischer Fokussierung. *Fleischwirtschaft* 73 (1993) 600-602
- 112 Rehbein, H., Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 191 (1990) 1-10
- 113 Jemmi, T., Schlosser, H., Tierartbestimmung bei erhitztem Fleisch von Haus- und Wildwiederkäuern mittels isoelektrischer Fokussierung. *Fleischwirtschaft* 71 (1991) 1191-1195
- 114 Ouchterlony, O., Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol.* 26 (1949) 507-515
- 115 Berger, R.G., Mageau, R.P., Schwab, B., Johnston, R.W., Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. AOAC Int.* 71 (1988) 406-409
- 116 Andrews, C.D., Berger, R.G., Mageau, R.P., Schwab, B., Johnston, R.W., Detection of beef, sheep, deer and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. AOAC Int.* 75 (1992) 572-576
- 117 Hofmann, K., Proof of proper heating at meat-and-bone meal. *Fleischwirtschaft* 76 (1996) 1037-1039
- 118 Unglaub, W., Müller, R., Jemmi, T., Stuker, G., BSE-Prophylaxis. Heat inactivation proof of meat-and-bone meal prepared from by-products of food processing using the ELISA principle. *Fleischwirtschaft Int.* 99 (1999) 34-37
- 119 Meyer, R., Candrian, U., PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 29 (1996) 1-9
- 120 Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T., Kato, S., Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Sci.* 27 (1990) 119-128
- 121 Hunt, D.J., Parkes, H.C., Lumley, I.D., Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. *Food Chem.* 60 (1997) 437-442
- 122 Buntjer, J.B., Lamine, A., Haagsma, N., Lenstra, J.A., Species identification by oligonucleotide hybridization: the influence of processing of meat products. *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 53-57
- 123 Ebbelhøj, K.F., Thomsen, P.D., Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Sci.* 30 (1991) 359-366

- 124 Rüggeberg, H., Gaede, W., Tschirdewahn, B., Booke, A., Müller, M., Tierartendifferenzierung bei gekochten Fleischproben – Ein methodischer Vergleich der PCR-Analyse, der DNA-Sonden-Technik und der isoelektrischen Fokussierung. *Fleischwirtschaft* 77 (1997) 732-734
- 125 Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalés, P., López-Pérez, M.J., Pérez-Martos, A., Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2829-2832
- 126 Calvo, J.H., Osta, R., Zaragoza, P., Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pâté. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5265-5267
- 127 Lahiff, S., Glennon, M., O'Brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M., Shilton, N., Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Mol. Cel. Probe.* 15 (2001) 27-35
- 128 Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y., A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* 51 (1999) 143-148
- 129 Rea, S., Chikuni, K., Branciarri, R., Sangamayya, R., Ranucci, D., Avellini, P., Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *J. Dairy Res.* 68 (2001) 689-698
- 130 Bellagamba, F., Valfrè, F., Panseri, S., Moretti, V.M., Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J. Food Protect.* 66 (2003) 682-685
- 131 Quinteiro, J., Vidal, R., Izquierdo, M., Sotelo, C.G., Chapela, M.J., Pérez-Martín, R.I., Rehbein, H., Hold, G.L., Ruddell, V.J., Pryde, S.E., Rosa, C., Santos, A.T., Rey-Méndez, M., Identification of hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5108-5114
- 132 Vawter, L., Brown, W.M., Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* 234 (1986) 194-196
- 133 Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6196-6200

- 134 Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32 (1991) 128-144
- 135 Chikuni, K., Tabata, T., Saito, M., Monma, M., Sequencing of mitochondrial cytochrome *b* genes for the identification of meat species. *Anim. Sci. Technol.* 65 (1994) 571-579
- 136 Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., Candrian, U., Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1542-1551
- 137 Bellagamba, F., Moretti, V.M., Comincini, S., Valfrè, F., Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3775-3781
- 138 Branciarri, R., Nijman, I.J., Plas, M.E., Di Antonio, E., Lenstra, J.A., Species origin of milk in italian mozzarella and greek feta cheese. *J. Food Protect.* 63 (2000) 408-411
- 139 Burgener, M., Hübner, P., Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 261-263
- 140 Wolf, C., Rentsch, J., Hübner, P., PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J. Agric. Food. Chem.* 47 (1999) 1350-1355
- 141 Wolf, C., Burgener, M., Hübner, P., Lüthy, J., PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: Differentiation of fish species. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 33 (2000) 144-150
- 142 Russell, V.J., Hold, G.L., Pryde, S.E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Méndez, M., Sotelo, C.G., Pérez-Martín, R.I., Santos, A.T., Rosa, C., Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2184-2188
- 143 Hold, G.L., Russell, V.J., Pryde, S.E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Vidal, R., Rey-Méndez, M., Sotelo, C.G., Pérez-Martín, R.I., Santos, A.T., Rosa, C., Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1175-1179
- 144 Sotelo, C.G., Calo-Mata, P., Chapela, J., Pérez-Martín, R.I., Rehbein, H., Hold, G.L., Russell, V.J., Pryde, S., Quinteiro, J., Izquierdo, M., Rey-Méndez, M., Rosa, C., Santos, A.T., Identification of flatfish (*Pleuronectiforme*) species using DNA-based techniques. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4562-4569

- 145 Tang, Y.W., Procop, G.W., Persing, D.H., Molecular diagnostics of infectious diseases. Clin. Chem. 43 (1997) 2021-2038
- 146 Jansson, J.K., Prosser, J.I., Quantification of the presence and activity of specific microorganisms in nature. Mol. Biotechnol. 7 (1997) 103-120
- 147 De Boer, E., Beumer, R.R., Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 50 (1999) 119-130
- 148 Bergeron, M.G., Ouellette, M., Preventing antibiotic resistance using rapid DNA-based diagnostic tests. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 19 (1998) 560-564
- 149 Edwards, C., Problems posed by natural environments for monitoring microorganisms. Mol. Biotechnol. 15 (2000) 211-223
- 150 Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59 (1995) 143-169
- 151 Pace, N.R., A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276 (1997) 734-740
- 152 Schönhuber, W., Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdman, M., Ludwig, W., Amann, R., In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 1259-1267
- 153 Moter, A., Gobel, U.B., Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Methods 41 (2000) 85-112
- 154 Engebretson, J.J., Moyer, C.L., Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 4823-4829.
- 155 Louie, M., Louie, L., Simor, A.E., The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. Can. Med. Assoc. J. 163 (2000) 301-309
- 156 Folgueira, L., Delgado, R., Palenque, E., Aguado, J.M., Noriega, A.R., Rapid diagnosis of *mycobacterium tuberculosis* bacteremia by PCR. J. Clin. Microbiol. 34 (1996) 512-515
- 157 Newcombe, J., Cartwright, K., Palmer, W.H., McFadden, J., PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. J. Clin. Microbiol. 134 (1996) 1637-1640

- 158 Song, J.H., Cho, H., Park, M.Y., Na, D.S., Moon, H.B., Pai, C.H., Detection of *salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 1439-1443
- 159 Woese, C.R., Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51 (1987) 221-271
- 160 Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Murrell, J.C., Radajewski, S., Weilharter, A., Sessitsch, A., Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 566-582
- 161 Wu, L., Thompson, D.K., Li, G., Hurt, R.A., Tiedje, J.M., Zhou, J., Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 5780-5790
- 162 Keramas, G., Bang, D.D., Lund, M., Madsen, M., Rasmussen, S.E., Bunkenborg, H., Telleman, P., Christensen, C.B., Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter spp.* *Mol. Cell. Probes* 17 (2003) 187-196
- 163 Wilson, W.J., Strout, C.L., DeSantis, T.Z., Stilwell, J.L., Carrano, A.V., Andersen, G.L., Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol. Cell. Probe.* 16 (2002) 119-127
- 164 Rudi, K., Flateland, S.L., Hanssen, J.F., Bengtsson, G., Nissen, H., Development and evaluation of a 16S ribosomal DNA array-based approach for describing complex microbial communities in ready-to-eat vegetable salads packed in a modified atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 1146-1156
- 165 Hamels, S., Gala, J.L., Dufour, S., Vannuffel, P., Zammateo, N., Remacle, J., Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species and methicillin resistance. *BioTechniques* 31 (2001) 1364-1372
- 166 Chizhikov, V., Wagner, M., Ivshina, A., Hoshino, Y., Kapikian, A.Z., Chumakov, K., Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 2398-2407
- 167 Bodrossy, L., Diagnostic oligonucleotide microarrays for microbiology, in : A beginner's guide to microarrays and bioinformatics. Blalock, E. (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, New York, 2003
- 168 Knoblauch, C., Jorgensen, B.B., Harder, J., Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in arctic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4230-4233

-
- 169 Teske, A., Ramsing, N.B., Habicht, K., Fukui, M., Kuver, J., Jorgensen, B.B., Cohen, Y., Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 2943-2951
- 170 Langendijk, P.S., Hanssen, T.J., van der Hoeven, J.S., Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 27 (2000) 943-950
- 171 Tee, W., Dyal-Smith, M., Woods, W., Eisen, D., Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 1760-1764
- 172 McDougall, R., Robson, J., Paterson, D., Tee, W., Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 1805-1808
- 173 Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamcyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.H., Wagner, M., Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 5064-5081
- 174 Arbeitskreis § 35 – Entwicklung von molekularbiologischen Methoden in der Pflanzen- und Tierartendifferenzierung: Ringversuch zum Nachweis von Schwein, Rind, Huhn und Pute und zum Nachweis von Soja in Brühwurst, 1999
- 175 Cras, J.J., Rowe-Taitt, C.A., Nivens, D.A., Ligler, F.S., Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 683-688
- 176 Meier, F., Entwicklung eines Immunosensors zur Bestimmung von Herbiziden auf Basis der Evaneszent-Feld-Fluoreszenzmessung. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1996
- 177 Pilevar, S., Davis, C.C., Portugal, F., Tapered optical fiber sensor using near-infrared fluorophores to assay hybridization. *Anal. Chem.* 70 (1998) 2031-2037
- 178 Lipkin, E., Shalom, A., Khatib, H., Soller, M., Friedmann, A., Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 2025-2032
- 179 Cortese, J.D., Microarray readers: pushing the envelope. *The Scientist* 15 (2001) 36-39
- 180 Henegariu, O., Bray-Ward, P., Ward, D.C., Custom fluorescent-nucleotide synthesis as an alternative method for nucleic acid labelling. *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 345-348

- 181 Peter, C., Entwicklung eines DNA-optischen Biosensors zum Nachweis multipler Hybridisierungsereignisse. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2000
- 182 Shchepinov, M.S., Case-Green, S.C., Southern, E.M., Steric factors influencing hybridization of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucl. Acids Res.* 25 (1997) 1155-1161
- 183 Peterson, A.W., Heaton, R.J., Georgiadis, R.M., The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nuc. Acids Res.* 29 (2001) 5163-5168
- 184 Dolan, P.L., Wu, Y., Ista, L.K., Metzner, R.L., Nelson, M.A., Lopez, G.P., Robust and efficient synthetic method for forming DNA microarrays. *Nucl. Acids Res.* 29 (2001) E107-7
- 185 Cho, J.C., Tiedje, J.M., Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 1425-1430
- 186 Steel, A.B., Levicky, R.L., Herne, T.M., Tarlov, M.J., Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys. J.* 79 (2000) 975-981
- 187 Graham, C.R., Leslie, D., Squirrell, D.J., Gene probe assays on a fiber-optic evanescent wave biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 7 (1992) 487-493
- 188 Jensen, K.K., Ørum, H., Nielsen, P.E., Nordén, B., Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. *Biochem.* 36 (1997) 5072-5077
- 189 Sauer, M., Brecht, A., Charissé, K., Maier, M., Gerster, M., Stemmler, I., Gauglitz, G., Bayer, E., Interaction of chemically modified antisense oligonucleotides with sense DNA: a label-free interaction study with reflectometric interference spectroscopy. *Anal. Chem.* 71 (1999) 2850-2857
- 190 Kleinjung, F., Sensorik und Kinetik biochemischer Nukleinsäure-Wechselwirkungen an Oberflächen. Dissertation, Universität Potsdam, 1998
- 191 Okahata, Y., Kawase, M., Niikura, K., Ohtake, F., Furusawa, H., Ebara, Y., Kinetic measurements of DNA hybridization on an oligonucleotide-immobilized 27-MHz quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.* 70 (1998) 1288-1296

- 192 McKendry, R., Zhang, J., Arntz, Y., Strunz, T., Hegner, M., Lang, H.P., Baller, M.K., Certa, U., Meyer, E., Güntherodt, H.J., Gerber, C., Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (2002) 9783-9788
- 193 Bier, F.F., Kleinjung, F., Feature-size limitations of micorarray technology – a critical review. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 151-156
- 194 Kai, E., Ikebukuro, K., Hoshina, S., Watanabe, H., Karube, I., Detection of PCR products of *Escherichia coli* O157:H7 in human stool samples using surface plasmon resonance (SPR). *FEMS Immunol. Med. Mircobiol.* 29 (2000) 283-288
- 195 Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., Buchardt, O., Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254 (1991) 1497-1500
- 196 Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Chicharro, M., Parrado, C., Dontha, N., Begleiter, A., Mowat, M., Palecek, E., Nielsen, P.E., Detection of point mutation in the *p53* gene using a peptide nucleic acid biosensor. *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 111-118
- 197 Minunni, M., Tombelli, S., Mariotti, E., Mascini, M., Biosensors as new analytical tool for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 589-593
- 198 Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23 (1997) 504-511
- 199 Plath, A., Krause, I., Einspanier, R., Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 205 (1997) 437-441
- 200 Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., Rasmussen, O.F., Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17 (1992) 37-45
- 201 Klotz, A., Einspanier, R., Development of a DNA-based screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-RFLP-EIA-technique. *Milchwissenschaft* 56 (2001) 67-70
- 202 Calvo, J.H., Osta, R., Zaragoza, P., Species-specific amplification for detection of bovine, ovine and caprine cheese. *Milchwissenschaft* 57 (2002) 444-446
- 203 Brunnert, H., Quantitative Nachweismethoden für Proteine und DNA aus gentechnisch veränderten Organismen in Lebensmitteln. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2002

- 204 Urakawa, H., Noble, P.A., Fantroussi, S.E., Kelly, J.J., Stahl, D.A., Single-base-pair discrimination of terminal mismatches by using oligonucleotide microarrays and neural network analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 235-244
- 205 Moody, H.M., van Genderen, M.H., Koole, L.H., Kocken, H.J., Meijer, E.M., Buck, H.M., Regiospecific inhibition of DNA duplication by antisense phosphate-methylated oligodeoxynucleotides. *Nucl. Acids Res.* 17 (1989) 4769-4782
- 206 Lagally, E.T., Medintz, I., Mathies, R.A., Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. *Anal. Chem.* 73 (2001) 565-570
- 207 Paegel, B.M., Blazej, R.G., Mathies, R.A., Microfluidic devices for DNA sequencing: sample preparation and electrophoretic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 42-50
- 208 Figeys, D., Adapting arrays and lab-on-a-chip technology for proteomics. *Proteomics* 2 (2002) 373-382
- 209 Meyer, R., Candrian, U., Lüthy, J., Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77 (1994) 617-622
- 210 Laube, I., Butschke, A., Zagon, J., Spiegelberg, A., Schauzu, M., Bögl, K.W., Kroh, L.W., Broll, H., Nachweisverfahren für Rindfleisch in Lebensmitteln unter Anwendung der TaqMan™-Technologie. *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz* 44 (2001) 326-330
- 211 Patel, D.J., Kozlowski, A.A., Marky, L., Rice, J.A., Broka, C., Dallas, J., Itakura, K., Breslauer, K.J., Structure, dynamics, and energetics of deoxyguanosine-thymidine wobble base pair formation in the self-complementary d(CGTGAATTCGCG) duplex in solution. *Biochemistry* 21 (1982) 437-444
- 212 Ikuta, S., Takagi, K., Wallace, R.B., Itakura, K., Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs. *Nucl. Acids Res.* 15 (1987) 797-811
- 213 Sugimoto, N., Nakano, M., Nakano, S., Thermodynamics-structure relationship of single mismatches in RNA/DNA duplexes. *Biochemistry* 39 (2000) 11270-11281
- 214 Liu, W.T., Mirzabekov, A.D., Stahl, D.A., Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. *Environ. Microbiol.* 3 (2001) 619-629

-
- 215 Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 (1991) 7276-7280
- 216 Lyon, W.J., TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1 and Non-O139 in pure cultures, raw oysters and synthetic seawater. Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 4685-4693

Die experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Oktober 2000 bis Mai 2003 am Lehrstuhl für Analytische Chemie des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Cammann angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Karl Cammann bedanke ich mich für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit, mein Dissertationsthema frei zu gestalten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Torsten Borchers für die ausgezeichnete Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen, welche sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch Herrn Dr. Markus Meusel danke ich dafür, dass er als Ansprechpartner immer zur Verfügung stand und bei Problemen engagiert geholfen hat.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Karl Cammann und den Mitarbeitern des Instituts für Chemo- und Biosensorik GmbH sei für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit während der letzten drei Jahre gedankt. Besonders möchte ich mich bei Herrn Hermann vom Bruch, Frau Silke Flotho, Frau Viola Podsadlowski, Herrn Dr. Tobias Polifke und Frau Angela Zellmer für das freundschaftliche Laborklima und ihre Unterstützung bei vielen Fragestellungen bedanken.

Herrn Eric Frauendorfer danke ich für die Optimierung der Software *Exprimage* und die stete Hilfsbereitschaft bei den größeren und kleineren computertechnischen Problemen.

Herrn Frank Wienhausen, Herrn Marco Schmitz und Herrn Jochen Uckelmann bin ich sehr dankbar für die Wartung und die Optimierung des DNA-Biosensorsystems sowie ihre Hilfestellung und Geduld bei allen technischen Fragen und Problemen.

Frau Dr. Claudia Brünen-Nieweler und ihren Mitarbeitern vom Chemischen Landes- und Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt danke ich für die Bereitstellung der Realproben und die Durchführung der Referenzanalytik.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Dr. Karl Schleifer (Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München) und speziell Frau Dr. Angelika Lehner gilt mein Dank für die Herstellung der PCR-Produkte zur Mikroorganismendetektion.

Herrn PD Dr. H. Funke (Institut für Klinische Chemie der Universität Münster) danke ich für die Möglichkeit, die DNA-Chips am GMS418 Mikroarray-Scanner auslesen zu können.

Ein Dankeschön auch den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Dr. Bernd Brinkmann (Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster) für die Sequenzierung der *cytb*-PCR-Produkte und die Bereitstellung des ALFexpressTM Analysesystems.

Bei der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie e.V. bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Paul Kemper für Verständnis, Geduld und Ermutigung sowie ihre ideelle und materielle Unterstützung während des gesamten Studiums.