

3. Material und Methoden

Dynabeads

Dynabeads sind gleichförmige und monodisperse Kugeln, die alle einen magnetischen Kern aus δ - Fe_2O_3 und Fe_3O_4 mit daraus resultierenden paramagnetischen Eigenschaften enthalten. Diese symmetrischen Kugeln sind mit einer dünnen Polystyrolschicht umgeben und haben einen Durchmesser zwischen 0,5-100 μm je nach verwendeter Sorte. Dynabeads sind paramagnetisch, d.h. sie verfügen erst über magnetische Eigenschaften, wenn sie sich in einem magnetischen Feld befinden und verlieren sie, sobald sie dieses wieder verlassen. So kann gewährleistet werden, daß es außerhalb des Feldes zu keinen Effekten aufgrund des Magnetismus zwischen den Kugeln und den Zielmolekülen kommen kann.

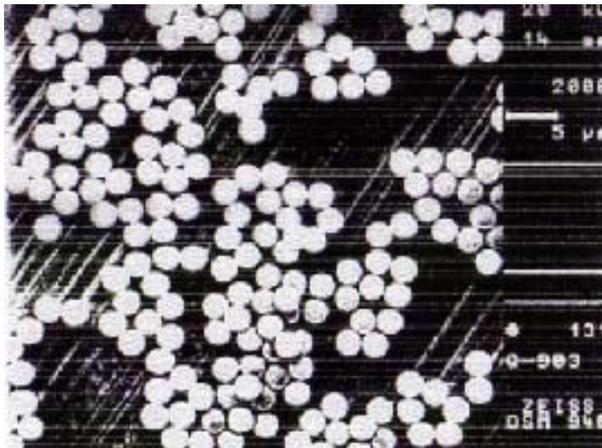


Abb.3: Gleichförmige und gleichgroße Dynabeads

Die gleichförmige und definierte Oberfläche aller Dynabeads ist die Voraussetzung dafür, daß die physikalischen und chemischen Eigenschaften sich nicht verändern können, sondern konstant bleiben. Somit enthält jeder Milliliter einer Suspension von Dynabeads laut Hersteller die gleiche Anzahl an Kugeln. Durch die gleichförmige Struktur wird das Risiko eines nicht spezifischen Bindungsvermögens verringert. Im Gegensatz dazu enthält man optimale Bindungsbedingungen zwischen den Kugeln und den Target-Molekülen, wodurch eine rasche und effiziente Bindung in den meisten Fällen schon nach wenigen Minuten eintritt.

Für die Versuche eingesetzt wurden Dynabeads, deren Oberfläche mit spezifischen Liganden beladen wurden. Es handelte sich zum einen um solche, die über 25 Nukleotid lange dT (Desoxythymidin) Ketten verfügen als auch um Kugeln, an deren Oberfläche Streptamydin-Moleküle gebunden wurden.

Direkter Einfang des Zielmoleküls durch die Polystyrolkugeln (Direct capture)

Im ersten Abschnitt der Reaktion findet eine Kopplung zwischen den Liganden der Dynabeads (Streptamydin oder Oligo dT) mit der Kopplung der spezifischen Sonde (Biotin oder Oligo dA) statt. Anschließend müssen die Versuchsbedingungen so gewählt werden, daß eine Hybridisierung zwischen der gesuchten Nukleinsäure und dem dazu komplementären Abschnitt der Sonden-Liganden-Kopplung möglich ist.

Indirekter Einfang des Zielmoleküls durch die Polystyrolkugeln (Indirect capture)

Anders als beim direkten wird beim indirekten Einfang zunächst die Sonde an das komplementäre Gegenstück auf der Nukleinsäure hybridisiert. Erst danach erfolgt die Kopplung zwischen den Liganden der Kugeln und den Liganden der Sonden-Nukleinsäure-Hybriden. Es handelt sich hierbei definitiv um ein zweistufiges System, da sowohl die Bindung zwischen Nukleinsäure und komplementärer Sonde als auch die Kopplung zwischen den Liganden untereinander in zwei verschiedenen Reaktionsräumen stattfinden sollte.

Isolierung von Nukleinsäuren nach dem QIAGEN-Prinzip

Eine weitere Methode für die Isolierung und Reinigung von viraler RNA ist die Präparation mit Hilfe eines speziellen Kits von QIAGEN (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland). Es beruht auf dem Prinzip der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an Silikagel-Membranen in Kombination mit einer Zentrifugation. Die virale RNA kann aus Plasma, Serum, Fäzes aber auch aus Wasserproben isoliert werden. Das Volumen der zu isolierenden Proben liegt normalerweise bei 140 µl, für größere Ansätze gibt es vom Hersteller spezielle Versuchsvorschriften.

Die Probe wird zunächst mit Hilfe eines speziellen Puffers (AVL) und carrier RNA lysiert. Dies geschieht unter denaturierenden Bedingungen, um vorhandene RNasen zu inaktivieren und um sicherzustellen, daß die RNA intakt isoliert werden kann. Die Aufgabe der carrier RNA ist die Verhinderung möglicher Degradationen der RNA. Diese Pufferbedingungen gewährleisten außerdem das optimale Bindungsvermögen der RNA an die spezielle Membran der Gelsäulen. Durch die Salzkonzentration, den pH Wert und die daraus resultierende gute Bindung an die Matrix ist es nun möglich, daß andere störende Bestandteile, die möglicherweise eine Inhibition von downstream enzymatischen Reaktionen hervorrufen, effizient mittels verschiedener Waschschriffe und Waschpuffer aus dem System entfernt werden. Die isolierte RNA soll nun, laut Hersteller, frei von Proteinen, Nukleasen und anderen Zellbestandteilen bzw. Inhibitoren sein, ohne daß man auf den Gebrauch von Phenol/Chloroform Extraktionen oder Fällungen mit Alkohol zurückgreifen muß. Mit Hilfe des Puffers AVE kann die freie und reine RNA von der Membran der Gelsäule wieder in einem definierten Volumen (in der Regel 50-60 µl) in Lösung gebracht werden. Dieser AVE-Puffer enthält neben Natriumazid (0,004%), um mikrobiologisches Wachstum vorzubeugen, auch 10 mM Tris HCl.

Diese Drei-Stufen-Methode ist entworfen worden, um Kreuzkontaminationen zwischen den einzelnen Proben zu unterbinden und erlaubt somit eine sichere und saubere Handhabung von potentiell infektiösen Proben.

3.3. Southern Blotting

Da man unmittelbar auf dem Agarosegel keine DNA-Fragmente handhaben kann, muß man sie vor einer Analyse auf einen Träger überführen, an dem nun die Hybridisierungsreaktion stattfinden kann. Dazu denaturiert man die DNA, so daß aus den vormals doppelsträngigen Fragmenten einzelsträngige entstehen. Diese werden dann aus dem Agarosegel auf einen Filter, bestehend aus einer Nylonmembran oder aus Nitrocellulose übertragen, auf denen sie haften bleiben. Das Gel wird auf ein mit einer konzentrierten Salzlösung getränktes Filterpapier gelegt und mit der Membran luftblasenfrei bedeckt. Schichten mit trockenen Filter- oder Saugpapieren sowie das Beschweren des Stapels mit einem Gewicht, gewährleisten einen Kapillareffekt.

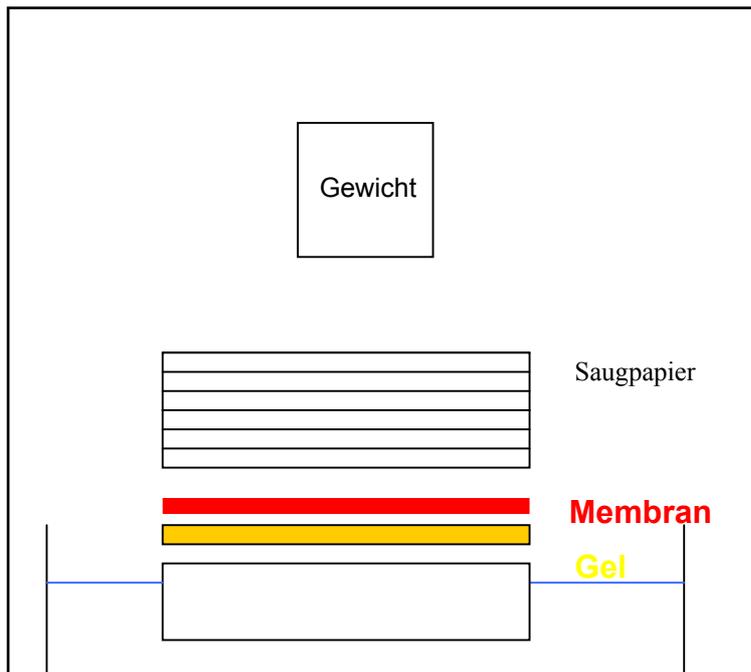


Abb. 4: Versuchsaufbau für das Blot-Verfahren (Kapillartransfer)

Das Prinzip beruht darauf, daß das trockene Filterpapier die Salzlösung ansaugt und sie durch das Gel und die Membran zieht. Dabei wird die DNA mitgerissen und von der Membran festgehalten. Die Nukleinsäure verbleibt somit auf der Membran und zwar an der gleichen Stelle, die sie schon im Gel eingenommen hatte. Es besteht nun die Möglichkeit, die einzelsträngige DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde zu hybridisieren, deren Sequenz komplementär zu einem Teilbereich des DNA-Fragmentes und durch Autoradiographie nachweisbar ist.

Des weiteren wird die Übertragung von RNA auf eine spezielle Membran als Northern Blotting bezeichnet, wobei die Hybridisierung mit einer Lösung erfolgt, die eine DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz zu einem Abschnitt auf der RNA enthält [30].

Gelelektrophorese

Viele biologische Systeme, wie z.B. Aminosäuren, tragen ionisierbare Gruppen und können deshalb in Lösung als elektrisch geladene Verbindungen entweder als Anion oder Kathion vorliegen. Dies bildet eine Basis für eine differenzierte Wanderung geladener Teilchen im Feld [60]. In einem leitenden Medium, das zahlreiche negative

wie positive Ionen enthält, fließt ein Strom. Um zu gewährleisten, daß die Elektronen die negative Elektrode verlassen können, müssen sämtlich eingesetzten Trägermaterialien und Proben in eine Pufferlösung getränkt sein.

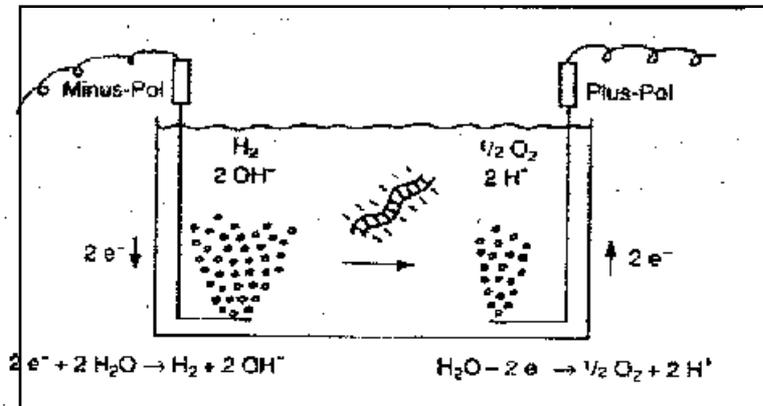


Abb. 5: Schematischer Aufbau einer Gelelektrophorese

Meist verwendet man als leitende Ionen schwache Säuren wie Acetate oder Phosphate, welche die von den Elektroden freigesetzten Protonen und Hydroxylionen abpuffern können, so daß die Gefahr einer Denaturierung der aufzutrennenden Nukleinsäuren durch einen eventuell extremen pH Wert nicht mehr gegeben ist.

Nukleinsäuren sind negativ geladene Moleküle und werden daher bei ihrer Wanderung in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Elektrode (Anode) transportiert. Die Schnelligkeit dieses Prozesses ist abhängig sowohl von der Stärke der angelegten Spannung, als auch von der Größe und der Gestalt der Nukleinsäure. Die für die Elektrolyse eingesetzten Träger bestehen aus einer Matrix, die von einem Puffer umschlossen wird. Sie enthält zahlreiche Poren, durch welche die Nukleinsäuren wandern müssen, wobei sich kleinere Moleküle schneller bewegen als größere, da diese häufiger mit der Matrix kollidieren [40]. Als Matrix verwendet wird ein langkettiges Polysaccharid aus repetitiven Untereinheiten aus D-Galactose und 3,6 Anhydro-1-Galactose und wird aus hochgereinigten Agar gewonnen. Durch das Verflüssigen des Agars in einem Elektrophoresepuffer besteht nun die Möglichkeit, unterschiedlich konzentrierte Gele herzustellen. In der Regel werden 0,8-1% Gele für eine Auftrennung der Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld verwendet. Ist es jedoch notwendig größere Moleküle aufzutrennen, so muß die Konzentration des Gels niedriger sein, da somit auch die Porengröße erweitert wird [40].

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das PCR-Verfahren geht von einem doppelsträngigen DNA-Molekül aus, welches die gesuchte Sequenz enthält und somit als Matrize dient. Der Doppelstrang wird durch Temperaturen, die höher sind als die Schmelztemperaturen der DNA-Stränge, in zwei einzelne Stränge getrennt. Man spricht vom Denaturierungsschritt. Die entstehenden Einzelstränge werden mit zwei kurzen Oligonukleotiden (Primer) hybridisiert, die mindestens 20 Nukleotide lang sein sollten. Man spricht vom Annealing.

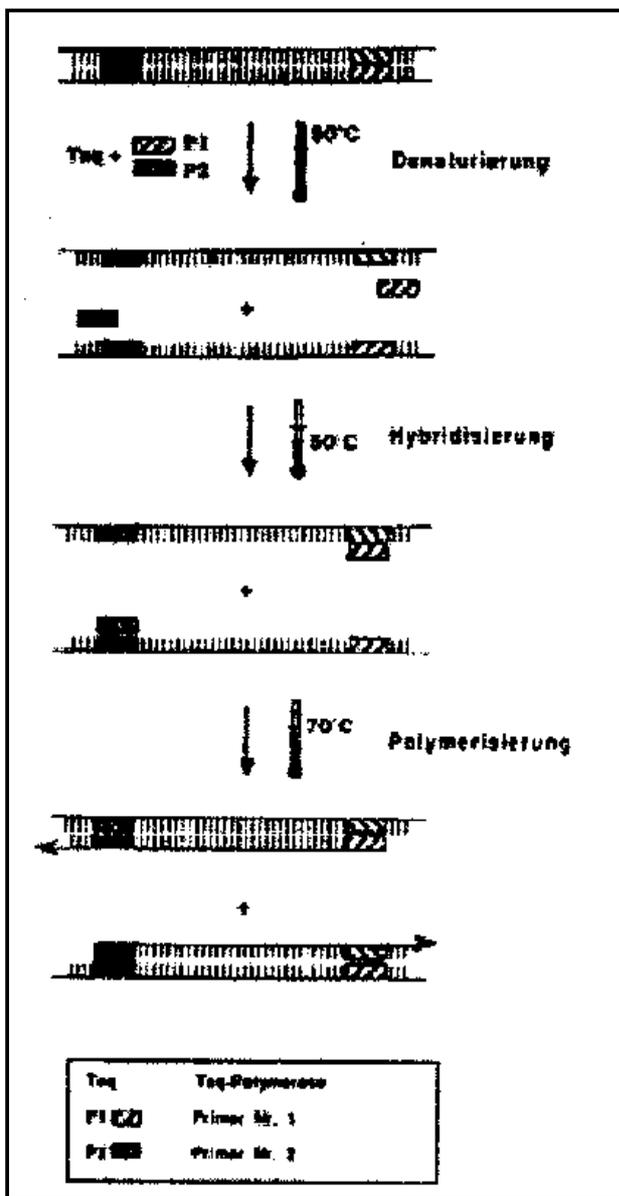


Abb. 6: Schema der einzelnen PCR-Schritte

Durch eine DNA-Polymerase erfolgt eine Strangverlängerung in 5'-3'-Richtung (Polymerisation). Die Primer dienen dabei als Starter der DNA-Synthese und enthalten Sequenzen, welche die gesuchte Sequenz einrahmen. Sie müssen so gewählt werden, daß der eine komplementär zum Plus-, der andere jedoch komplementär zum Minusstrang ist. Von jedem der beiden Primer wird ein DNA-Strang synthetisiert, der wiederum als Matrize für den jeweils anderen Primer dienen kann. Mit jedem Zyklus, der durchlaufen wird, verdoppelt sich somit die Zahl der vorhandenen DNA-Moleküle.

Die Festlegung der Reaktionstemperaturen während der einzelnen Schritte ist abhängig von der Sequenz der beiden Primer. Je höher der Gehalt an G/C Basen ist, desto höher sollten die Annealings- und Polymerisationstemperaturen veranschlagt werden [32,24]. Für eine Optimierung der PCR müssen insgesamt verschiedene Parameter wie Temperatur, Zyklenzahl, pH Wert, Primerwahl, Ionenkonzentration etc. angepaßt werden [24]. In der Regel werden 30-40 Zyklen durchlaufen, danach wird das Reaktionsprodukt entweder mittels Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung, mittels Southern Blot Verfahren oder aber mittels Sequenzierung analysiert.

Reverse Transkription (RT)

Eine Erweiterung der PCR ist es, neben DNA- auch RNA-Moleküle wie mRNA aus Pro- und Eukaryonten, virale RNA etc. zu analysieren. Um diese amplifizieren zu können, muß zunächst eine Umschreibung von RNA in eine „copy-DNA“ (cDNA) erfolgen. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Das Enzym wird von Retroviren zur Herstellung eines RNA-DNA-Hybrides für die Replikation ihres RNA-Genoms verwendet. Die RT synthetisiert einen DNA-Strang komplementär zu der entsprechenden RNA-Matrize, sofern ein geeigneter Primer zur Verfügung steht. Er muß durch Basenpaarung mit der RNA verbunden sein und eine freie 3'-OH-Gruppe besitzen [54]. Im Anschluß kann nun die PCR durchgeführt werden. Durch diese Variante der PCR wird es möglich, die Genanalyse auf das Niveau der Funktionsanalyse zu heben. Es sind nun Aussagen über den Expressionszustand einzelner Gene, aber auch bei Virussequenzen eine Unterscheidung zwischen aktiver und latenter Infektion, möglich.

PCR mit geschachtelten Primern (Nested PCR)

Wie der Laboralltag gezeigt hat, können bei Produkten mit einer Länge von weniger als 500 Nukleotiden immer wieder Amplifikate auftreten, die zwar über die gesuchte Größe verfügen, in ihrer Sequenz jedoch nicht mit dem gesuchten Produkt übereinstimmen. Dies hat unter anderem mit dem Umstand zu tun, daß solche Moleküle statistisch gesehen am ehesten entstehen können. Um eine Identifikation eindeutiger durchzuführen, verwendet man geschachtelte Primer (nested PCR). Bei einer weiteren PCR des Produktes wird ein Teilbereich durch ein weiteres Primerpaar, das innerhalb der gesuchten Sequenz liegt, amplifiziert.

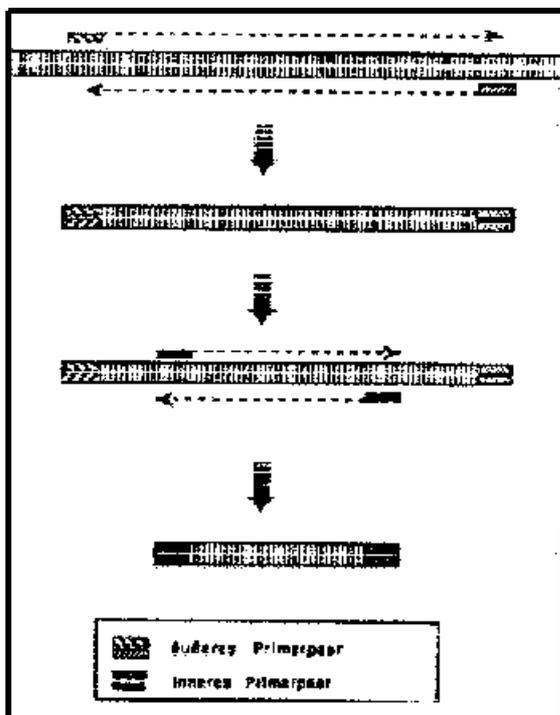


Abb. 7: Überblick über den Ablauf der nested PCR

Die Gesamtreaktion stützt sich demnach auf vier unabhängige, aber koordinierte Hybridisierungsergebnisse, durch welche die Reaktion eine maßgebliche Steigerung der Spezifität erfährt. Ebenso wird durch eine Verdünnung des ersten PCR-Produkts im zweiten Ansatz unspezifische Sequenzen, die eventuell entstanden sind, bis unter die Nachweisgrenze verdünnt.

Real-time PCR

Neben dem rein qualitativen Nachweis der DNA-Produkte (Ja-Nein-Aussage) wird zunehmend der Anspruch erhoben, auch eine Aussage zur Ausgangs-DNA-Menge (Kopienzahl) zu machen. Endpunktmessungen von kompetitiven PCR-Systemen haben den Nachteil, daß eine Quantifizierung sehr zeit- und materialaufwendig sind und, daß eine Quantifizierung nur über den Bereich möglich ist, in dem die Reaktion exponentiell verläuft. In jeder Reaktion folgt die PCR daher nur über einen kleinen Zeitraum dem mathematischen Modell, nach dem mit jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung der DNA erfolgt. Für eine hohe DNA-Ausgangsmenge kann dieser lineare Amplifikationsbereich in den frühen Zyklen 15 bis 20 erfolgen, für geringere DNA-Mengen in den Zyklen 28 bis 32. Die Proben mit einer hohen DNA-Konzentration befinden sich dann aber bereits in der Plateauphase. Sie folgen dann einer anderen Kinetik als solche mit einer geringeren DNA-Konzentration zum selben Zeitpunkt. Um beide Proben quantitativ miteinander vergleichen zu können, muß die Messung zu einem Zeitpunkt erfolgen, zu dem beide noch der gleichen, exponentiellen Kinetik folgen. Dies gelingt durch die Verwendung von Fluoreszenzmarkierten DNA-Hybridisierungssonden, die an die komplementären Regionen der Zielstrang-DNA binden und dadurch eine meßbare Fluoreszenzzunahme während der Reaktion anzeigen. Fluoreszenzsonden funktionieren nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers, bei dem ein nach Anregung durch kurzwelliges Licht fluoreszierendes Donatormolekül seine Emissionsenergie auf ein zweites Molekül, nämlich das Akzeptormolekül überträgt. Dieses reagiert darauf mit der Emission von längerwelligem Licht. Das Reportermolekül (FAM) gibt Auskunft über die Produktzunahme während der PCR. Das Quencher-molekül (TAMRA) absorbiert hingegen die Fluoreszenzsignale des FAM, solange beide Moleküle an der Hybridisierungssonde direkt benachbart zueinander liegen.

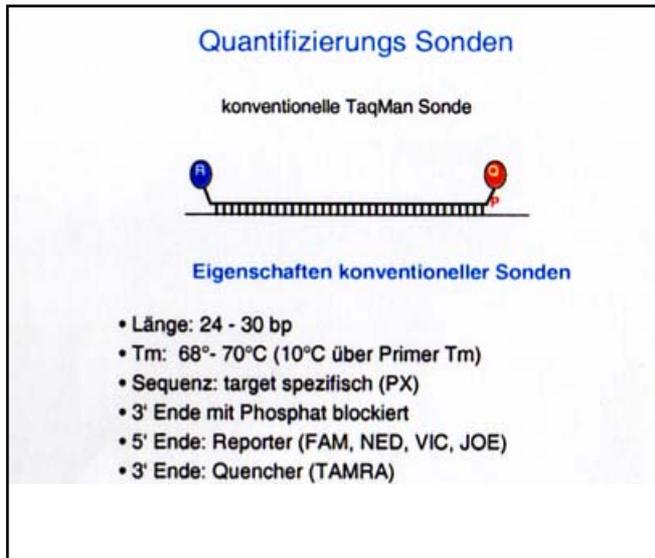


Abb. 8: Aufbau einer konventionellen TaqMan Sonde

In diesem Grundzustand ist die Emissionsstrahlung des Reportermoleküls für den Detektor, mit dem die Produktzunahme in der PCR gemessen wird, unsichtbar. Erst mit der Zunahme der PCR-Produkts erfolgt eine räumliche Trennung von FAM und TAMRA. FAM wird detektierbar.

Beim TaqMan Prinzip, auch 5'-Nuclease Assay genannt, binden die Fluoreszenz markierten Hybridisierungssonden am komplementären Zielstrang zwischen den Primerbindungsstellen. Bei der Neustrangsynthese wird die Hybridisierungssonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten und aus dem Zielstrang freigesetzt.

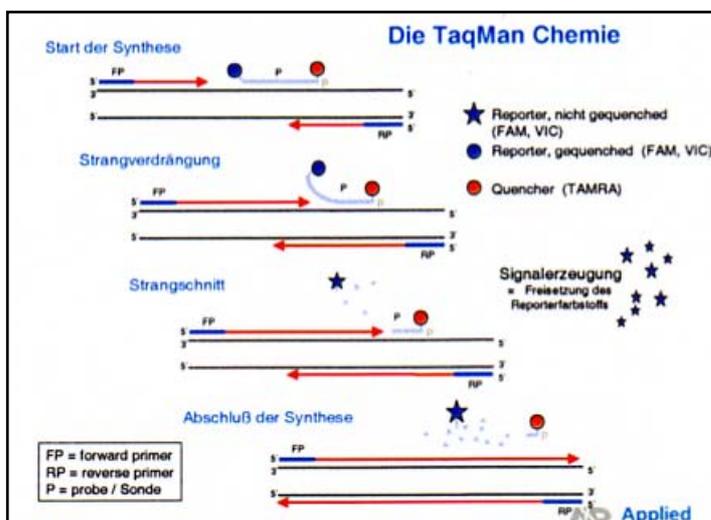


Abb. 9: Darstellung des Prinzips der real-time PCR mit einer TaqMan Sonde

Reporter- (FAM) und Quencher-molekül (TAMRA) liegen getrennt im Reaktionsmix vor, und die gemessene Reporterfluoreszenz in jedem PCR-Zyklus korreliert direkt mit der PCR-Produktzunahme. Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird erst an einem DNA-Doppelstrang freigesetzt. Somit besteht nicht die Gefahr, daß die nicht hybridisierten Sonden-moleküle aus DNA-Einzelsträngen nicht vorzeitig abgebaut werden und es zu keinen falschen Fluoreszenzsignalen kommen kann.

Um unbekannte Proben zu quantifizieren, müssen DNA-Standarts mit bekannter Kopienzahl eingesetzt werden. Ist die Fluoreszenzzunahme größer als der Schwellenwert (Threshold), d.h. der Bereich, der sich aus der Schwankungsbreite der Basisfluoreszenz der PCR-Reaktionen während der ersten Zyklen errechnet, und auch mehrere Zyklen meßbar ist, so wird dieser Zyklus der jeweiligen Probe als C_t Wert (Threshold Cyclus) zugewiesen. Mittels der C_t Werte für die Standards läßt sich eine Korrelationsgerade (Eichstandart) ableiten.

Herstellung von Phosphor 32

Phosphor 32 ist ein reiner β -Strahler mit einer Energie von $E_{\max}=1,7$ MeV. Es wird daher auch als harter β -Strahler bezeichnet. Hergestellt wird es u.a. durch eine Bestrahlung von KCl im Kernreaktor, wodurch eine $^{35}\text{Cl}(n,\alpha)\text{P}^{35}$ Reaktion stattfindet. Die physikalische Halbwertszeit des so entstandenen P-32 beträgt 14,3 Tage. In einem β - Zerfall wird es zu stabilen Schwefel-32 umgewandelt. Das Isotop P-32 findet vor allem Verwendung in der Molekularbiologie, in der Biochemie und in der Nuklearmedizin, wo es z.B. für eine Markierung der Phosphatgruppen von Nukleinsäuren eingesetzt wird.

Plasmid pHKB als Matrix für die RNA-Transkripte

Das für die Transkription mit radioaktiv markierten UTP eingesetzte Plasmid pHKB verfügt im ganzen über eine Länge von 10,36 kb. Dabei umfaßt es die in der multicloning site vollständige Poliovirus Serotyp 1 cDNA von 7,441 kb, während die restlichen 2,919 kb auf die weiteren Sequenzen des Vektors fallen.

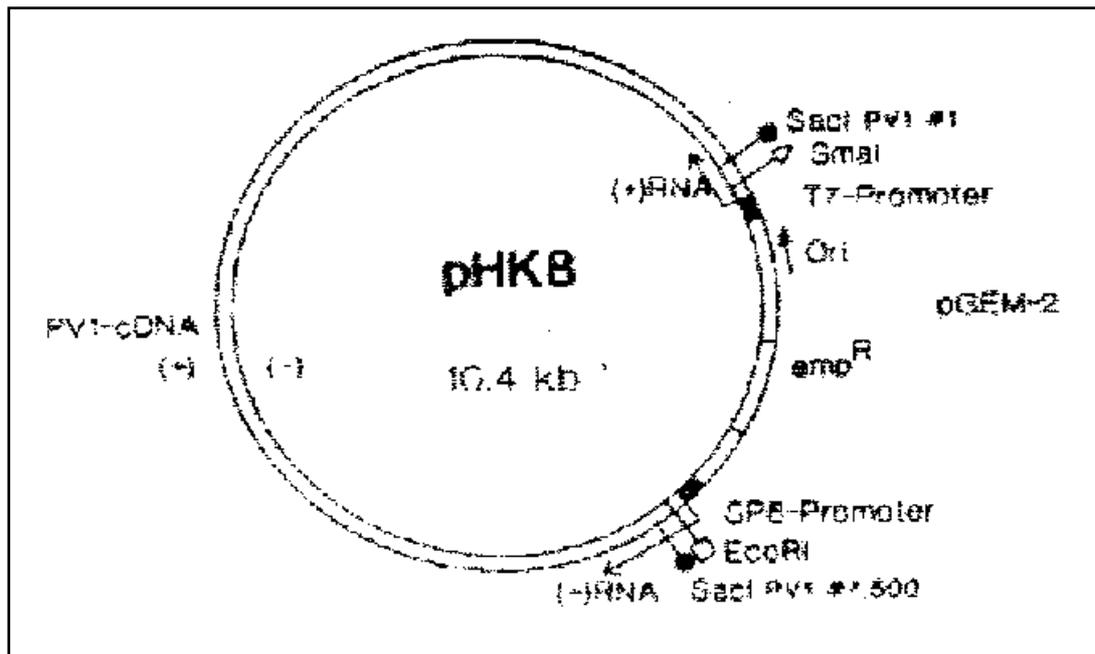


Abb. 10: Aufbau des Vektors und der multicloning site

Letztere enthalten neben einem Ampicillin-Resistenzgen auch je eine Promotorregion für die SP6- und die T7-Polymerase. Durch diese zwei verschiedenen Promotoren besteht nun die Möglichkeit, mit Hilfe der entsprechenden Polymerase plus- oder minusstrangspezifische RNA des Poliovirus zu transkribieren. Um eine Linearisierung des Plasmids zu ermöglichen, enthält es ebenfalls eine Restriktionsschnittstelle mit der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI.

Herstellung der verwendeten Poliovirus-RNA-Transkripte mit radioaktiv markierten UTP

Das Plasmid wird zunächst linearisiert, in dem es an den entsprechenden Restriktionsschnittstellen mit EcoRI geschnitten wird. Anschließend wird phenolisiert, mit Ethanol ausgefällt und das gereinigte Plasmid in Puffer aufgenommen.

Für die Transkription wird ein Nukleotidgemisch eingesetzt, welches neben ATP, CTP, GTP und UTP auch α - ^{32}P markiertes UTP enthält. Der Start der Transkription wird durch die Zugabe des Enzyms T7-Polymerase erreicht, welche ihren Startpunkt am T7-Promotor hat, der vor dem zu kodierenden Bereich liegt. Zum Stoppen der Reaktion und um das Plasmid enzymatisch abzubauen, wird RQ1-DNase zugesetzt, deren Aktivität später durch die Zugabe von EDTA wieder beendet wird. In Folge der Transkription wird neben den nicht markierten Triphosphaten auch das α - ^{32}P markierte UTP eingebaut.

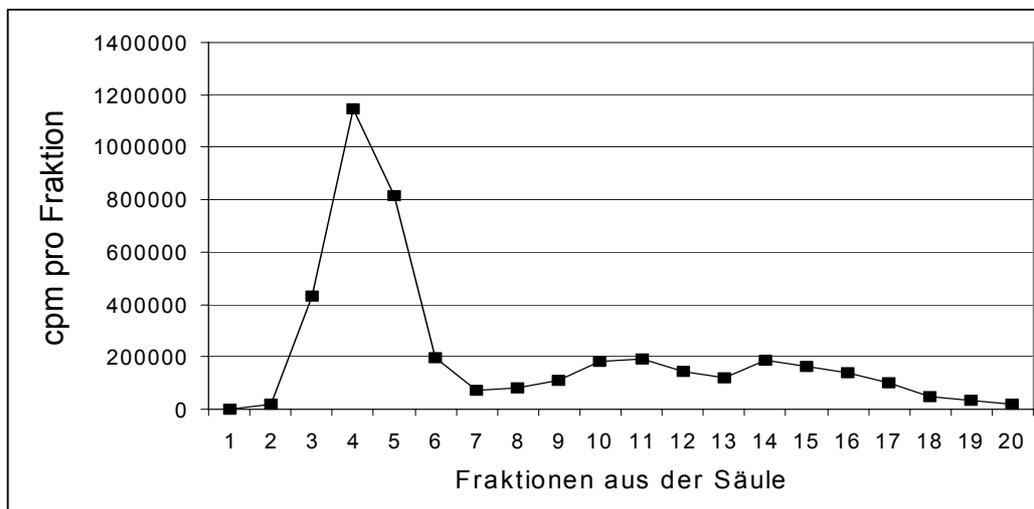


Abb. 11: Transkription einer mit α - ^{32}P UTP markierten (16,5 μCi) RNA. Die Proben (immer je 3 Tropfen pro Eppendorf-Gefäß) des ersten Peaks enthalten die transkribierte RNA, danach werden auch die unspezifischen Signale in den Fraktionen im Szintillator erfaßt. Vereinigt werden die Proben 2-6. Die Einbaurate beträgt 49,8%.

Freie, radioaktive Nukleotide können mittels Gelfiltrationschromatographie (Sephadex G50-Säulen; NickColumn, Pharmacia) aus dem Reaktionsansatz herausgehalten werden. Somit ist es möglich, die Berechnung der Transkript-Konzentration über die Einbaurate durchzuführen. Die höchsten gemessenen Fraktionen des ersten Peaks werden vereinigt und 5 μl in 5 ml einer

Szintillatorflüssigkeit (Quicksafe-A, Zinsser) in einem LSC (Packard Tri-Carb Modell a 300C) gemessen.

DNA 3' Endmarkierung mit [α - 32 P] ddATP

Mit dem DNA 3'-End Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim GmbH können DNA-Fragmente in einer Ein-Schritt-Methode radioaktiv markiert werden. Die 3'-Endmarkierung von DNA-Fragmenten mit P-32 markierten Didesoxynucleotiden kann für die DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert und für die S1-Nuklease-Kartierung angewendet werden. 3'-Endmarkierte DNA findet außerdem bei verschiedensten Hybridisierungstechniken Verwendung. Für eine Markierung von [α - 32 P] ddATP mit einem mindestens 20 Nukleotid langem Oligonukleotid (Primer) wird das Enzym Terminale Desoxynucleotidyltransferase (kurz Terminale Transferase) verwendet. Es katalysiert in einer Template-unabhängigen Reaktion die Verknüpfung von ddNTPs mit 3'-OH-Enden von Doppel- oder Einzelstrang-DNA. In Anwesenheit von Co^{2+} -Ionen können hierbei glatte, überhängende oder rezessive 3'-OH-Enden als DNA-Substrat dienen. Die 3'-Endmarkierung ist von der Qualität des [α - 32 P] ddATP, der Reinheit der DNA und von der DNA-Konzentration abhängig. Der Einsatz von ddATP gewährleistet die gleichmäßige Markierung mit nur einem Nukleotid pro 3'-Ende. Die Reinigung erfolgt wie schon unter 3.8. beschrieben mit Hilfe einer Sephadex G50 Säule mittels Gelfiltrationschromatographie. Die Fraktionen werden zuerst mittels Szintillator gemessen, die höchsten gemessenen Fraktionen des ersten Peaks werden vereinigt, 5 μl werden für eine spätere Bestimmung der Konzentration des Oligonukleotids über die Einbaurrate im LSC gemessen.

Liquid-Scintillation-Counter (LSC)

Das Prinzip eines Szintillators zur Detektion von radioaktiven Strahlen (α -, β - und γ -Strahlen) beruht auf seinem Aufbau. So besteht ein Szintillator aus einer Substanz (kristallin anorganisch oder organisch, sowie organischen Lösungen), welche die Energie der auftreffenden Strahlung in Lichtquanten umwandeln kann. Treffen diese Lichtquanten auf eine Photokathode, so werden durch den Aufprall Elektroden freigesetzt. Mit Hilfe eines Multipliers erfolgt eine Verstärkung um einen Faktor von 10^5 bis 10^7 , in dem Sekundärelektronen gebildet werden, die das ursprüngliche Signal verstärken [25]. Flüssige Szintillatoren machen es möglich, u.a. die Aktivität

weicher β -Strahler zu messen. Dabei wird die Probe direkt in der Szintillatorflüssigkeit aufgelöst, wodurch eine Messung ohne Selbstabsorptionsverluste möglich ist. Wichtig ist, daß es sich um einen guten Energieträger handeln muß, der jedoch nur wenig Licht absorbieren darf und auch keine Löschwirkung (Quench-Effekt) hervorrufen soll.

Autoradiographie

Ionisierende Strahlen wirken auf eine fotografische Emulsion ähnlich wie auch das sichtbare Licht ein und hinterlassen dort eine Abbildung. Bei der Wechselwirkung der Strahlung mit dieser Emulsion werden Elektronen freigesetzt, durch welche die enthaltenen Silberhalogenide zu elementarem Silber reduziert werden. Man spricht von einer Schwarzfärbung. Legt man auf eine geeignete fotografische Schicht radioaktiv markierte Materialien, so lassen sich nach der Entwicklung des Films Schwärzungen feststellen, deren Muster mit der Verteilung der radioaktiven Substanzen übereinstimmt [60]. Mittels Autoradiographie können somit Radioisotope auf verschiedenen Materialien wie z.B. Nylon- oder Cellulosemembranen lokalisiert werden.

Sequenzanalyse

Von den positiven Produkten der nested Amplifikate enteraler Viren erfolgt für eine repräsentative Auswahl die Sequenzierung mittels eines ABI Prism 377 DNA Sequencer und dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Mix von Perkin Elmer. Als Primer für die Reaktion werden die jeweiligen inneren sense Primer eingesetzt. Nach der Bearbeitung der Sequenzen mit dem Sequencher Sequenzanalyseprogramm Version 3.1.1., werden die erhaltenen Sequenzen in der Genbank abgeglichen [1].

Anzucht von Enteroviren in Wasserproben auf Zellkulturen

Für den Versuch der Anzucht von Enteroviren auf permanenten Zellkulturen werden Wasserproben ausgewählt, die vorher in der nested PCR als positiv detektiert wurden. Die konzentrierten Proben durchlaufen zunächst einer Chloroformextraktion, bevor sie auf die RD-Zellen (Human Rhabdomyosarkoma Zellen) gegeben werden.

Die Anzucht erfolgt auf Mikrotiterplatten mit Hilfe eines speziellen Puffers, der 2% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin + 1% Glutamin sowie 1% nicht essentielle Aminosäuren + 0,8% NaHCO₃ enthält. Bei den Proben, die einen cytopathischen Effekt durch das infektiöse Enterovirus aufweisen, erfolgt im Anschluß eine Typisierung durch Mikroneutralisation mittels WHO-Poolseren und monospezifischen in house rabbit Antiseren [59].

Konzentrierung von 10 Liter Wasserproben für die spätere Virusbestimmung

10 Liter (bzw. 5l für Stelle A) Wasser werden gesammelt und unter Rühren mit 10% einer Al₂(SO₄)₃-Lösung versetzt. Der pH Wert soll etwa 5,4 betragen und muß gegebenenfalls mit HCl oder NaOH eingestellt werden. Nach dem Sedimentieren der Flocken über Nacht im Kühlschrank wird der klare Überstand abgesaugt und das lockere Sediment 30 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, das Sediment wird mit Zitronensäure-Natriumcitrat-Puffer pH 4,7 (0,25 M Zitronensäure Monohydrat und 0,75 M Natriumcitrat) versetzt. Die Suspension wird über Nacht bei 4°C kontinuierlich geschüttelt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4°C und 3000 x g wird der Überstand zunächst bei -20°C gelagert, das Pellet jedoch in Phosphatpuffer (pH 8,0) resuspendiert und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 3000 x g bei 4°C wird dieser Überstand mit dem eingefrorenen vereinigt und anschließend bei 146000 x g und 4°C für 4 Stunden ultrazentrifugiert [57]. Das Pellet wird in einem Endvolumen von 4 ml resuspendiert und anschließend in Aliquots von 1,6 ml bei -20°C aufgehoben.

Die 50 ml Abwasserproben der Stelle X (vor dem Klärwerk) werden ausschließlich bei 186000 x g und 4°C für 1,5 Stunden ultrazentrifugiert und das Pellet in 1 ml DEPC Wasser resuspendiert [49].

Während des Untersuchungszeitraumes vom Oktober 2002 bis Dezember 2004 werden 100 Proben an der Stelle A (vor dem Klärwerk), 96 an der Stelle B (nach der Pipeline), 92 an der Stelle C (Westufer Werbeliner See) und 39 an der Stelle X (vor dem Klärwerk) auf das Vorkommen von gastroenteralen Viren (Adenoviren AdV, Astroviren AstV, Enteroviren EntV, Hepatitis A HAV, Noroviren NoV und Rotaviren RoV) untersucht.