

4. Durchführung

4.1. Festlegung der allgemeinen Bedingungen für die 5'NCR Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Kapazität der Dynabeads am Beispiel der Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Es werden zunehmende Mengen des Oligonukleotids PVK (A)₂₀ 510-534 mit der immer gleichbleibenden Menge an Dynabeads zusammengebracht und zehn Gemische mit einer abnehmenden absoluten Konzentration (43 pmol/20µl; 21 pmol/20µl; 11 pmol/µl; 5 pmol/20µl; 2,7 pmol/µl; 1,34 pmol/µl; 0,68 pmol/µl; 0,34 pmol/µl; 0,18 pmol/µl und 0,09 pmol/µl) zusammengestellt, die jedoch alle die gleiche Menge an radioaktiv markierten Primer und daher auch die gleiche Zahl an cpm enthalten. Die Dynabeads werden zunächst zweimal mit einem speziellen Puffer gewaschen, die Überstände werden verworfen. Zu 10 µl Dynabeads werden 20 µl der jeweiligen Ansätze gegeben. Nach 30 minütlicher Inkubation bei Raumtemperatur in einem speziellen Rollgerät, werden zweimal 5 µl der Überstände pro Ansatz abpipettiert und im LSC gemessen (Doppelbestimmungen).

Bindungsvermögen von PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Die Dynabeads (pro Dynabeadssorte je 50 µl) werden zweimal gewaschen (jeweilst benötigter Puffer siehe 10.2.). Ein jeweiliger 150 µl Reaktionsansatz bestehend aus 0,6 pmol/Ansatz Primer und 1x LiCl-Puffer (enthält 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 1M LiCl, 4 mM EDTA und 0,1% SDS) wird hergestellt, vor der Zugabe auf die Dynabeads werden als Nullpunkt 3x 5 µl abpipettiert und im LSC gemessen. Die Reaktionsansätze werden 5 min, 10 min, 15 min und 30 min bei Raumtemperatur im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert. Nach jedem Zeitintervall werden zweimal je 5 µl des Überstands abgenommen und im LSC gemessen (Doppelbestimmung).

Festlegung der Salzkonzentration für die Bindung des Primers PVK (A)₂₀ 510-534 an Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Für diesen Versuchsabschnitt werden 0,5 pmol eines radioaktiv markiertem Primers (mit $2,08 \times 10^6$ cpm/Ansatz) und 0,5 pmol des gleichen, jedoch „kalten“ Primers mit unterschiedlichen Konzentrationen an LiCl an Oligo (dT)₂₅ Dynabeads inkubiert. Als Konzentrationen werden 0 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM, 1000 mM, 1500 mM und 1800 mM LiCl eingesetzt. Zunächst werden pro Ansatz je 10 µl Dynabeads (100 µl enthalten etwa ca. 60 pmol dT Seitenketten) zweimal mit Puffer gewaschen. Vom Reaktionsansatz werden 3x 5 µl für eine Dreifachbestimmung der Nullprobe entnommen. 85 µl werden bei RT für 60 min, 120 min und 240 min im Rollgerät mit Dynabeads versetzt. Nach jedem Zeitintervall werden zweimal je 5 µl des Überstands abgenommen und im LSC gemessen (Doppelbestimmung).

Untersuchung des Lysevermögens von Polioviren bei drei Stunden 65°C am Beispiel PVK (A)₂₀ 510-534 an Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Es werden zunächst zwei Ansätze mit einem Volumen von 77 µl (enthält eine Virussuspension mit 5×10^{-3} Genome /µl, dies entspricht 0,44 pmol/100 µl als Endvolumen im Ansatz, und Lysepuffer) hergestellt. Einer der beiden Ansätze wird zusätzlich mit 50 µg/ml einer Proteinkinase K Lösung versetzt. Für eine Bestimmung des Nullwertes werden 15 µl abgenommen und zunächst in Eis aufbewahrt. Die Proben werden zunächst bei 45°C für 30 min, 60 min und 90 min inkubiert, nach jedem Zeitintervall werden weitere 15 µl der Überstände abgenommen und gleichfalls behandelt wie die Kontrolle. Nach Ende der Reaktionszeit werden je 5 µl aus den zurückgestellten Proben mit dem Hybridisierungsmix (enthält LiCl-Puffer und $1,6 \times 10^{-2}$ pmol/µl radioaktiv markierter Primer) versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Proben werden in einem 1% Agarosegel aufgetragen, die Nukleinsäuren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend eine Autoradiographie durchgeführt. Zur Bestimmung der Aktivität der entsprechenden Abschnitte wird auf der Membran vorsichtig die Umriss der Filmschwärzung markiert, ausgeschnitten und die Abschnitte im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads (Indirect capture)

Das radioaktiv markierte RNA-Transkript ($1,06 \times 10^6$ cpm/250 μ l und 0,54 pmol/250 μ l) wird in einem Ansatz mit 1,5 pmol/250 μ l Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Dynabeads (je 50 μ l) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit den Überständen bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 μ l nach 0 min, 5 min, 10 min, 15 min und 30 min des Überstandes abpipettiert und im LSC gemessen (Doppelbestimmung).

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads (Direct capture)

Dynabeads (je 50 μ l) werden zweimal mit Puffer gewaschen. Die Dynabeads werden mit 3 pmol des jeweiligen Primers bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Im Anschluß wird der Überstand mit den nicht gebundenen Primern entfernt und die Dynabeads zweimal mit kaltem DEPC-Wasser gewaschen. Ein Ansatz mit dem radioaktiv markiertem RNA-Transkript ($1,8 \times 10^6$ cpm/250 μ l und 0,44 pmol/250 μ l) und 1x LiCl Puffer wird dazugegeben und bei 65°C für 30 min, 60 min, 90 min und 120 min im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert. Nach jedem Zeitintervall werden zweimal je 5 μ l des Überstands abgenommen und im LSC gemessen (Doppelbestimmung).

Überprüfung der Effizienz des indirektem Einfangs bei Ansätzen mit verschiedenen Volumen am Beispiel von PVK Biotin (A)₂₀ 510-534-RNA-Hybriden

Als Ansätze werden Volumen von 250 μ l, 500 μ l und 1000 μ l gewählt. Das radioaktiv markierte RNA-Transkript ($1,0 \times 10^6$ cpm/Ansatz und 1,5 pmol/Ansatz) wird mit 1,5 pmol Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die

Dynabeads (je 50 μ l) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit den Überständen bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 μ l nach 0 min, 5 min, 10 min, 15 min und 30 min abpipettiert und im LSC gemessen.

4.2. Festlegung der allgemeinen Bedingungen für die drei Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₃₁ 510-534 und PVK Biotin (A)₄₅ 510-534 an Streptavidin Dynabeads, um durch einen längeren Spacer die Effizienz des direkten Einfangs zu verbessern

Bindungsvermögen von PVK Biotin (A)₂₀, ₃₁ und ₄₅ 510-534 an Streptavidin Dynabeads

Die Dynabeads (pro Spacer je 50 μ l) werden zweimal gewaschen. Ein jeweiliger 150 μ l Reaktionsansatz bestehend aus 0,48 pmol/150 μ l radioaktiv markierten Primer und 1x LiCl-Puffer wird hergestellt, vor der Zugabe auf die Dynabeads werden als Nullpunkt 3x 5 μ l abpipettiert und im LSC gemessen. Die Reaktionsansätze werden 5 min, 10 min, 15 min und 30 min bei Raumtemperatur im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert. Nach jedem Zeitintervall werden zweimal je 5 μ l des Überstands abgenommen und als Doppelbestimmung im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀, ₃₁ und ₄₅ 510-534 an Streptavidin Dynabeads (Indirect capture)

Das radioaktiv markierte RNA-Transkript ($2,7 \times 10^6$ cpm/250 μ l und 0,53 pmol/250 μ l) wird in einem Ansatz mit 1,5 pmol/250 μ l Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Dynabeads (pro Spacer je 50 μ l) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit den Überständen bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 μ l nach 0 min, 5 min, 10 min, 15 min und 30 min der Überstände abpipettiert und im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)_{20, 31} und ₄₅ 510-534 an Streptavidin (Direct capture)

Dynabeads (pro Spacer je 50 µl) werden zweimal mit Puffer gewaschen. Die Dynabeads werden mit 3 pmol des jeweiligen Primers bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Im Anschluß wird der Überstand mit den nicht gebundenen Primern entfernt und die Dynabeads zweimal mit kaltem DEPC-Wasser gewaschen. Ein Ansatz mit radioaktiv markiertem RNA-Transkript ($1,9 \times 10^6$ cpm/250µl und 0,48 pmol/250µl) und 1x LiCl Puffer wird dazu gegeben und bei 65°C für 30 min, 60 min, 90 min und 120 min im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert. Nach jedem Zeitintervall werden zweimal je 5 µl des Überstands abgenommen und als Doppelbestimmung im LSC gemessen.

4.3. Überprüfung und gegebenenfalls auch Festlegung der allgemeinen Bedingungen für andere Genomabschnitte auf dem Polio-Transkript anhand der Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads**Bindungsvermögen von PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads**

Die Dynabeads (pro Primer je 50 µl) werden zweimal gewaschen. Ein jeweiliger 150 µl Reaktionsansatz bestehend aus 0,56 pmol/150 µl radioaktiv markierten Primer und 1x LiCl-Puffer wird hergestellt, vor der Zugabe auf die Dynabeads werden als Nullpunkt 3x 5 µl abpipettiert und im LSC gemessen. Die Reaktionsansätze werden 5 min, 10 min, 15 min und 30 min bei Raumtemperatur im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert. Nach jedem Zeitintervall werden zweimal je 5 µl des Überstands abgenommen und als Doppelbestimmung im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung für 3 Stunden bei 65°C (Indirect capture)

Das radioaktiv markierte RNA-Transkript ($2,97 \times 10^6$ cpm/250µl und 0,55 pmol/250µl) wird in einem Ansatz mit 1,5 pmol/250µl Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Dynabeads (pro Primer je 50 µl) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit den Überständen bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 µl nach 0 min, 15 min, 30 min und 60 min der Überstände abpipettiert und im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung über Nacht bei 45°C (Indirect capture)

Das radioaktiv markierte RNA-Transkript ($2,86 \times 10^6$ cpm/250µl und 0,53 pmol/250µl) wird in einem Ansatz mit 1,5 pmol/250µl Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und über Nacht bei 45°C inkubiert. Die Dynabeads (pro Primer je 50 µl) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit den Überständen bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 µl nach 0 min, 15 min, 30 min und 60 min der Überstände abpipettiert und im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung über Nacht bei 45°C (Direct capture)

Dynabeads (pro Primer je 50 µl) werden zweimal mit Puffer gewaschen. Die Dynabeads werden mit 5 pmol des jeweiligen Primers bei Raumtemperatur für 30

min inkubiert. Im Anschluß wird der Überstand mit den nicht gebundenen Primern entfernt und die Dynabeads zweimal mit 200 µl kaltem DEPC-Wasser gewaschen. Ein Ansatz mit radioaktiv markiertem RNA-Transkript ($2,86 \times 10^6$ cpm/250µl und 0,53 pmol/250µl) und 1x LiCl Puffer wird dazugegeben und bei 45°C über Nacht im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert. Nach 20 Stunden bzw. nach 40 Stunden werden zweimal je 5 µl des Überstands abgenommen und als Doppelbestimmung im LSC gemessen.

Bindungsvermögen von PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads

Die Dynabeads (50 µl) werden zweimal gewaschen. Ein 150 µl Reaktionsansatz bestehend aus 0,56 pmol/150 µl radioaktiv markierten Primer mit $1,23 \times 10^6$ cpm/150µl und 1x LiCl-Puffer wird hergestellt, vor der Zugabe des Hybridisierungsmixes auf die Dynabeads werden als Nullpunkt 3x 5 µl abpipettiert und im LSC gemessen. Der Reaktionsansatz wird 5 min, 10 min, 15 min und 30 min bei Raumtemperatur im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert. Nach jedem Zeitintervall werden zweimal 5 µl des Überstands abgenommen und als Doppelbestimmung im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung für 3 Stunden bei 65°C (Indirect capture)

Das markierte RNA-Transkript ($2,5 \times 10^6$ cpm/250µl und 0,51 pmol/250µl) wird in einem Ansatz mit 1,5 pmol/250µl Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Dynabeads (50 µl) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit dem Überstand bei Raumtemperatur im Rollgerät inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 µl nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min der Überstände abpipettiert und im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung über Nacht bei variablen Temperaturen (Indirect capture)

Das markierte RNA-Transkript ($2,63 \times 10^6$ cpm/250 μ l und 0,51 pmol/250 μ l) wird in einem Ansatz mit 1,5 pmol/250 μ l Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und über Nacht bei 60°, 55°, 50°, 45°, 40° und 35°C inkubiert. Die Dynabeads (pro Temperatur je 50 μ l) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit den Überständen bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 μ l nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min der Überstände abpipettiert und im LSC gemessen.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung über Nacht mit 20% Formamid bei Temperaturen von 40°C und 35°C (Indirect capture)

Das markierte RNA-Transkript ($2,1 \times 10^6$ cpm/250 μ l und 0,41 pmol/250 μ l) wird in einem Ansatz mit 1,5 pmol/250 μ l Primer, 20% Formamid und 1x LiCl-Puffer versetzt und über Nacht bei 40° und 35°C inkubiert. Die Dynabeads (pro Temperaturansatz je 50 μ l) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit den Hybridisierungsmixen bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 μ l nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min der Überstände abpipettiert und im LSC gemessen.

Lyse von Polio Serotyp 1-Virionen unter durch die Wirkung von 1x LiCl Puffer bei drei Stunden bei 65°C sowie Bindung an den Primer PVK 7424-7400

Ein Ansatz mit aufgetauten Polio-1-Virionen mit einem Titer von 10^9 Virionen/ml (0,32 pmol pro 200 μ l) wird mit 0,16 pmol pro 200 μ l, radioaktiv markierten Primer PVK 7424-7400 im Verhältnis 2:1 sowie 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Dynabeads (je 50 μ l) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit dem Oligonukleotid Biotin (dG)₁₀ (dT)₂₀ an die Dynabeads gekoppelt. Nach der Zugabe des Hybridisierungsmixes wird bei Raumtemperatur die

Probe unter leichtem Rollen im Rollgerät inkubiert. Es werden für eine Doppelbestimmung zweimal je 5 µl nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min der Überstände abpipettiert und im LSC gemessen.

4.4. Abkopplung der RNA-Transkripte von den Dynabeads

Das markierte RNA-Transkript ($1,68 \times 10^6$ cpm/250µl und 0,29 pmol/250µl) wird in neun identischen Ansätzen mit 1,0 pmol/250µl Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Dynabeads (je 50 µl pro Ansatz) werden zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend mit dem Hybridisationsmix bei Raumtemperatur im Rollgerät für 60 min inkubiert, nach 0 min, 30 min und 60 min werden zweimal 5 µl pro Zeitintervall anschließend im LSC die Aktivität der Überstände bestimmt. Die Dynabeads werden anschließend zweimal mit 200 µl kaltem DEPC-Wasser gewaschen, anschließend erfolgt die Zugabe von 50 µl Tris HCl (drei Ansätze), DEPC-Wasser (drei Ansätze) und 1xPCR-Puffer (drei Ansätze). Von jedem Elutionsmittel wird eine der drei Proben für 5 min, die zweite für 10 min und die dritte für 30 min bei 90°C inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Reaktionszeiten werden die Überstände sofort entfernt. Je zweimal 5 µl werden im LSC gemessen, je 15 µl werden mittels Gelelektrophorese in einem 2% Agarosegel (bei 87 mV) aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und anschließend mittels Autoradiographie untersucht.

4.5. Überprüfung der Bedingungen mit einer im Anschluß durchgeführten PCR unter Laborbedingungen und an Umweltproben

Überprüfung der Reversen Transkription sowie der angeschlossenen PCR mit Proben, die entweder noch an die Streptavidin Dynabeads gebunden oder durch Eluierung von den Dynabeads abgekoppelt sind

Es werden RNA-Transkripte (10^9 pmol/250µl; 10^4 pmol/250µl: zweimal; 10^3 pmol/250µl; 10^2 pmol/250µl; 10^1 pmol/250µl und 10^0 pmol/250µl) mit 1x LiCl Puffer und 4 pmol PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Streptavidin Dynabeads werden zweimal mit Puffer gewaschen, anschließend werden die Hybridisierungsmixe dazu gegeben und für eine Stunde

unter langsamen Rollen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dynabeads werden dreimal mit 500 μ l kaltem DEPC-Wasser gewaschen. Für 10 min bei 90°C erfolgt die Abkopplung der Primer-RNA-Hybride (Konzentration von den Kugeln: 10^9 pmol; 10^3 pmol; 10^2 pmol; 10^1 pmol/ und 10^0 pmol) in 1x PCR-Puffer. Die beiden Ansätze mit 10^4 pmol verbleiben mit Dynabeads. Die Überstände aus dem Eluierungsprozeß (20 μ l) werden restlos entfernt und im Kühlschrank für die RT-PCR aufgehoben.

Die sieben Ansätze werden zusammen mit vier positiven RNA-Kontrollen (10^9 pmol; 10^3 pmol; 10^2 pmol und 10^0 pmol, sowie eine Probe mit Wasser als Negativkontrolle) mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Alle Ansätze enthalten je 1 mM dNTPs, 5 mM $MgCl_2$, 1 U/ μ l RNase-Inhibitor und 2,5 U/ μ l MuLV-RT und 0,75 μ M PVK 510-534. Einem der beiden 10^4 Ansätze wird der zusätzliche Primer PVK 510-534 nicht zugesetzt. Die Reaktion findet für 5 min bei 42°C, 25 min bei 37°C und 5 min bei 99°C statt. Danach werden die Ansätze auf 5°C gekühlt. Für die PCR werden die vollständigen Ansätze aus der Reversen Transkription eingesetzt zusammen mit 2 mM $MgCl_2$, 2,5 U/100 μ l Taq-Polymerase und 0,15 μ M EntV1 162-182 (PCR-Schema: 5 min 95°C, 40 Zyklen mit 30 sec 95°C, 30 sec 60°C und 30 sec 72°C, zum Abschluß 5 min 72°C, kühlen auf 4°C).

Die Proben werden mittels Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wird ein Southern Blot durchgeführt. Als Hybridisierungssonde wird der mit ddATP markierte Primer PVK 490-509 (1×10^6 cpm/ml) eingesetzt. Eine Autoradiographie wird über Nacht bei -80°C durchgeführt.

Überprüfung der RT-PCR unter Laborbedingungen und an Umweltproben

Es werden drei Ansätze untersucht. Zwei davon dienen als Kontrolle (RNA in bidest. Wasser, RNA mit bidest. Wasser und mit Ultraschall behandelt), bei der dritten handelt es sich um eine Abwasserprobe, der RNA zugesetzt und welche mit Ultraschall für 3 min behandelt wurde. Der anschließende Hybridisierungsmix enthält für alle Proben neben RNA ($6,2 \times 10^4$ pmol) auch RNase-Inhibitor (1U/ μ l), 1x LiCl Puffer und 4 pmol PVK Biotin (A)₂₀ 510-534. Die Reaktionszeit beträgt 3 Stunden bei 65°C. Die Streptavidin Dynabeads werden zweimal mit Puffer gewaschen, anschließend werden die Hybridisierungsmixe dazugegeben und für eine Stunde unter langsamen Rollen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dynabeads werden dreimal mit 500 μ l kaltem 1x PCR Puffer gewaschen. Die an die Dynabeads

gebundenen Proben werden mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Alle Ansätze enthalten je 1 mM dNTPs, 5 mM MgCl₂, 1 U/μl RNase-Inhibitor und 2,5 U/μl MuLV-RT und 0,75 μM PVK 510-534. Die Reaktion findet für 5 min bei 42°C, 25 min bei 37°C und 5 min bei 99°C statt. Danach werden die Ansätze auf 5°C gekühlt. Für die PCR werden die vollständigen Ansätze aus der Reversen Transkription eingesetzt zusammen mit 2 mM MgCl₂, 2,5 U/100 μl Taq-Polymerase und 0,15 μM EntV1 162-182 (PCR-Schema: 5 min 95°C, 40 Zyklen mit 30 sec 95°C, 30 sec 60°C und 30 sec 72°C, zum Abschluß 5 min 72°C, herunter kühlen auf 4°C).

Die Proben werden mittels Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wird ein Southern Blot durchgeführt. Als Hybridisierungssonde wird der mit ddATP markierte Primer PVK 490-509 (1 x 10⁶ cpm/ml) eingesetzt. Eine Autoradiographie wird über Nacht bei -80°C durchgeführt.

4.6. Anwendungsbeispiele mit Proben aus dem Werbelin See einmal mit Dynabeads, aber auch mittels der QIAGEN Methode

Die Umweltproben werden nach 3.14. aufgearbeitet. Anschließend erfolgt die Isolierung der Nukleinsäuren einmal nach 3.2. bzw. mittels indirektem Einfang mit Dynabeads (3.1.2.). Es werden somit mit jeder Isoliermethode parallel fünf Proben (Standort C einmal, B zweimal und A zweimal) auf das Vorhandensein von Enteroviren untersucht. Der Hybridisierungsmix enthält für alle Proben RNase-Inhibitor (1U/μl), 1x LiCl Puffer und 1,35 pmol PVK Biotin (A)₂₀ 510-534. Die Reaktionszeit beträgt 3 Stunden bei 65°C. Die Streptavidin Dynabeads werden zweimal mit Puffer gewaschen, anschließend werden die Hybridisierungsmixe dazu gegeben und für eine Stunde unter langsamen Rollen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dynabeads werden dreimal mit kaltem DEPC-Wasser gewaschen. Für 10 min bei 90°C erfolgt die Abkopplung der Primer-RNA-Hybride mit 1x PCR-Puffer. Die Überstände aus dem Eluierungsprozeß (60 μl) werden restlos abpipettiert. Um den Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 vollständig aus dem System zu entfernen, werden die Überstände erneut 30 min mit frischen Streptavidin Dynabeads inkubiert, die Überstände werden entfernt und bei -20°C für die RT-PCR aufgehoben. Dies ist notwendig, um die neuen RT-PCR Primer (gültig für die nested PCR) zum Einsatz zu bringen.

Von den 60 µl der Eluierungsmixe werden 5 µl (wie für QIAGEN üblich), 10 µl und 20 µl für die Reverse Transkription eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen können den Veröffentlichungen von Pusch *et al.* und Oh *et al.* entnommen werden [47;49]. Bei den Ansätzen mit 10 µl und 20 µl Template wird auch der RT-Mix 1:1 eingesetzt. Im Anschluß wird eine nested PCR entsprechend der Proben durchgeführt [49]. Die Sequenzen aller benötigten Primer und ihre Lage können der Tabelle im Anhang 10.1. entnommen werden. Die Proben werden im 1,5% Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung fotografiert.

4.7. Nachweis von Adenoviren, Astroviren, Enteroviren, HAV, Noroviren und Rotaviren A mittels RT-PCR

Nach der Isolierung der viralen Nukleinsäuren mittels QIAGEN werden mit Ausnahme des DNA-Virus Adenovirus alle RNA-Viren zunächst mittels einer Reversen Transkription mit einem Gesamtvolumen von 10 µl in cDNA umgeschrieben. 5 µl dieser cDNA bzw. für AdV der aufgearbeiteten Wasserprobe werden in der ersten PCR eingesetzt und amplifiziert. Für die nested PCR wird aus dem ersten PCR Durchgang für RoV, NV, AstV und HAV 1 µl, für AdV und EntV 2 µl pipettiert und anschließend erneut amplifiziert. Die benötigten Primer können der Tabelle 5 im Anhang, die Reaktionsbedingungen den Veröffentlichungen von Oh *et al.* [47] und Pusch *et al.* [49] entnommen werden.

4.8. Quantifizierung von Enteroviren EntV, Noroviren NoV und Astroviren AstV mittels real-time PCR

Für die Quantifizierung der oben genannten Viren wird eine real-time PCR (TaqMan) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine spezifische single-tube Methode, die mittels des Quantitect Probe RT-PCR TaqMan kit von QIAGEN durchgeführt wird. Dieser Kit enthält neben einem Enzymmix, bestehend aus zwei verschiedenen Reverse Transkriptasen auch ein Puffer-Enzym-Mix (Puffer, 8 mM MgCl₂, dNUTP, HotStar Polymerase, ROX). Die Konzentration der Primer und FAM-TAMRA-markierten Sonden können bei Höhne *et al.* [22] und Pusch *et al.* [49] entnommen werden. Quantifiziert wird die Mehrheit an Proben, die bereits positiv in der nested PCR sind. Das Umschreiben der RNA durch die Reversen Transkriptasen in cDNA

findet für alle untersuchten Viren für 30 min. bei 50°C statt. Für die Inaktivierung der Transkriptasen und die anschließende Aktivierung der HotStar Polymerase, erfolgt eine Inkubation für 15 min. bei 95°C. Es schließt sich dann eine PCR Amplifikation für 45 Zyklen an (15 sec. 94°C, 1 min. 60°C)

4.9. Überprüfung der PCR positiven Ergebnisse mittels Sequenzanalyse

Von den positiven Produkten der nested Amplifikate von NV-, EntV, HAV, AdV-, AstV und RoV (VP6) 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.

4.10. Anzucht von Enteroviren in Wasserproben auf Zellkulturen

Für den Versuch der Anzucht von Enteroviren auf permanenten Zellkulturen werden 26 Wasserproben ausgewählt, die vorher in der nested PCR als positiv detektiert wurden. Drei dieser Proben entstammen aus dem See (C), neun werden nach der Pipeline (B) und 14 nach dem Ablauf aus der Kläranlage Rosental/Leipzig (A) ausgewählt. 200 µl der konzentrierten Proben durchlaufen zunächst einer Chloroformextraktion, bevor sie auf die RD-Zellen (Human Rhabdomyosarkoma Zellen) gegeben wurden. 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.