

3 Material und Methoden

3.1 MATERIALNACHWEIS

Material, Geräte und Chemikalien	Hersteller
100 bp-DNA-Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt am Main
1kbp-DNA-Größenmarker	Lifetechnologies™Gibco Brl, Galthersburg, USA
250-Lambda-DNA	Boehringer, Mannheim
50 x dNTP-Mastermix (12,5mM / dNTP)	Invitek, Berlin
Agar-Agar	Lifetechnologies™Gibco Brl, Galthersburg, USA
Agarose: MetaPhor®agarose;	Biozym, Hessisch Oldendorf, Biowhittaker
NuSieve®3:1agarose (3 %ige Gele),	Molecular Applications, Rockland, USA
Seakem® LE agarose (1,2 %ige Gele)	
Anti-Pocken-Serum	Animal Health Service, Deventer, Niederlande
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Bühler-Schüttelinkubator	J. Otto GmbH, Hechingen
Columbia-Agar mit Schafblut	Oxoid GmbH, Wesel
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II	Roche, Mannheim
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Biowhittaker Molecular Applications, Rockland, USA
Elektrophoresekammer Horizon®11*14	Lifetechnologies™Gibco Brl, Galthersburg, USA
Entwickler LX24	Kodak Industrie, Chalon sùr Saône
Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe
Filtereinheit 30/0 (45 CA)	Schleicher & Schuell, Dassel
Fixierer AL4	Kodak Industrie, Chalon sùr Saône
Fluorometer Versa Fluor	Bio-Rad, München
Hefeextrakt	Difco, Michigan, USA
Hoechst Dyes 33258	Bio-Rad, München
Hühnerpockenimpfstoff HP-B	Lohmann Animal Health, Cuxhaven
Hybridisierungsflaschen	Biometra, Göttingen
Hybridisierungsnetz	Biometra, Göttingen
Hybridisierungsöfen Compact Line OV4	Biometra, Göttingen

Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitex, Berlin
Kanarienvogelimpfstoff (Peristin)	Intervet, Boxmeer, Niederlande
Küvetten	Bio-Rad, München
Küvetten-Test [®] Photometer LKT	Dr. Lange, Berlin
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau
Lumi-Chemiluminescent Detection-Film	Roche, Mannheim
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Membranvakuumpumpe Typ MZ2C	Vacuubrand GmbH+Co, Wertheim
MgCl ₂	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
MgCl ₂ (50 mM)	Invitex, Berlin
Mikroliterpipetten	Abimed, Langenfeld
Millipore Ultrafree [®] MC	Millipore Corporation, Bedford, USA
Minifuge GL	Heraeus, Hanau
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer, Mannheim
NH ₄ -Reaktionspuffer	Invitex, Berlin
Nylontransfermembran Nytran [®] 0,2	Schleicher&Schuell, Dassel
Pipettierhilfen	Integra Bioscience, Fernwald
Polyallomeröhrchen SW 28, SW 41	Beckman Coulter, California, USA
Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad, München
Power Supply Model 200/2.0	Bio-Rad, München
Primer	Carl Roth, Karlsruhe
Promega pGEM-T Vektor System II	Promega, Madison, USA
Proteinase K (20mg/ml)	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Ready-To-Go [™] PCR Beads	Amersham Pharmacia biotech Europe, Freiburg
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Restriktionsenzympuffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Schüttelbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Schüttelmaschine LS 10	Gerhardt, Bonn
SPF-Hühnereier	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven
T3-Thermozykler	Biometra, Göttingen

Taubenpockenimpfstoff KP-1-V557	Intervet, Boxmeer, Niederlande
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Invitak, Berlin
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Tween®20	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Ultra Turrax Typ TP 18/10	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
Ultrazentrifugen SW 28, SW 41	Beckman Coulter, California, USA
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator Typ UVT 2053	Herolab, Wiesloch
Videodokumentationssystem Bioprint DS und Software BioCapt Vers. 97.05	LTF Labortechnik, Wasserburg
Vortex-Genie™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen Typ 5415C und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße Biopur (0,5ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße Safe-Lock	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (50ml)	TPP, Schweiz

Andere verwendete und hier nicht erwähnte Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth, Karlsruhe, und Merck, Darmstadt bezogen.

3.2 PUFFER, KITS, ZUSÄTZE UND MEDIEN

Puffer für virologische Methoden

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, Phosphate Buffered Saline)

137 mM NaCl
1,47 mM KCl
1,47 mM KH₂PO₄
6,46 mM Na₂HPO₄
pH 7,4

Puffer und Kits für die PCR-Durchführung

QIAamp® DNA Mini Kit zur DNA-Extraktion

Proteinase K (20 mg/ml)
Lysispuffer ATL und AL
QIAamp® Filterröhrchen
Waschpuffer AW 1 und AW 2
Elutionspuffer AE

Tris-Natrium-EDTA Puffer (TNE-Puffer) für die DNA-Konzentrationsbestimmung

10 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
1 mM EDTA-Dinatriumsalz
pH 7,4

Ready-To-Go™ PCR Beads

PCR-Gefäße, die im vorgesehenen Endvolumen von 25 µl enthalten:
1,5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase
10 mM Tris-HCl (pH 9,0)
50 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
Stabilisatoren, einschließlich Bovines Serumalbumin (BSA)
200 µM je dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat; dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

Puffer und Zusätze für die Gelelektrophorese

Tris-Borat-Elektrophorese (10x; TBE-Puffer)

890 mM Tris-HCl
890 mM Borsäure
25 mM EDTA Dinatriumsalz
pH 7,5

Probenladepuffer

0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
30,0% Glycerin
in TBE-Puffer

Größenmarker 100 bp

30 µl 100 bp-DNA-Größenmarker (0,5 µg DNA/µl)
30 µl Probenladepuffer
185 µl ddH₂O

Größenmarker 1 kbp

30 µl 1 kbp-DNA-Größenmarker (1 µg DNA/µl)
50 µl Probenladepuffer
200 µl ddH₂O

Zusätze, Kits und Medien zur KlonierungInvisorb Spin DNA Extraction Kit zur Aufreinigung von PCR-Produkten

Gel-Lösungspuffer (Gel Solubiliser S)
Bindungspuffer (Binding Enhancer)
Filtersäulen
Waschpuffer
Elutionspuffer

Millipore Ultrafree[®] MC- Kit zur Aufreinigung von PCR-Produkten

Filtersäulen

Promega pGEMT-T Vektor System II

Ligationspuffer (2 x Rapid)
pGEM[®]-T-Vektor (50 ng/µl)
T4 DNA Ligase (3 U/µl)
Bakterienzellen JM 109 High Efficiency Competent Cells (1 x 10⁸ cfu/µg DNA)

Salz-optimiertes Medium (Salt Optimized Broth, SOB Medium) pH 7,5

6,0 g Trypton
1,5 g Hefe
600 µl NaCl (5 M)
750 µl KCl (1 M)
ddH₂O auf 300ml, nach Autoklavieren: pro 100 ml 1 ml MgCl₂/MgSO₄ (1M)

Salz-optimiertes Medium mit Glukose (Salt Optimized + Carbon, SOC Medium)

100 ml SOB Medium
1 ml Glukose (2M)

Luria Bertani (LB-Medium) pH 7,5

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl

Flüssiges LB-Ampicillin-Medium

LB-Medium
50 µg/ml Ampicillin

Platten für Bakterienkulturen

15 g Agar
1000 ml LB-Medium
50 µg/ml Ampicillin
20 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galactopyranosid (X-Gal) 50mg/ml-Lösung
100 µl Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid (IPTG)

Puffer und Kits für die Präparation von Plasmid-DNAResuspensionspuffer (steril filtrieren)

2,5 ml Tris-HCl (1 M)
2,0 ml EDTA-Dinatriumsalz (0,5 M)
2,5 ml Glukose (2 M)
ddH₂O auf 100 ml

Lysispuffer

10 ml NaOH (1 M)
5 ml SDS (10 %)
ddH₂O auf 50 ml

Neutralisationspuffer

29,4 g Kaliumazetat
11,5 ml Eisessig
ddH₂O auf 100 ml

QIAgen™ Plasmid Midi Kit

Resuspensionspuffer (Puffer 1)
Lysispuffer (Puffer 2)
Neutralisationspuffer (Puffer 3)
QIAfilterCartridge
Equilibrierungspuffer QBT
Qiagen-tip (Filter)
Waschpuffer QC
Elutionspuffer QF

Tris-EDTA Puffer (TE-Puffer) pH 7,4-9,0

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA-Dinatriumsalz

Puffer und Zusätze für die VirusreinigungTrishydroxymethylaminomethan (Tris-HCl) pH 8,0

2 M Tris

Sucrosekissen (36%ig, 20-60%ig) pH 7,4

10 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
1 mM EDTA-Dinatriumsalz
Sucrose 36 % (w/v), 20/60 % (w/w)

Proteinase K-Puffer, pH 7,4

100 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
1 mM EDTA-Dinatriumsalz
1 % SDS

Puffer, Kits und Zusätze für das Dot Blot-VerfahrenDIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II

DIG High Prime Mix
DIG Easy Hyb Granulat, in dH₂O gelöst als Hybridisierungspuffer
Blocking Solution (10x conc.)
Anti Digoxigenin AP Conjugate
CSPD ready-to-use-Lösung

Standard-Natrium-Citrat Puffer (saline-sodium-citrat; 20x; SSC-Puffer)

3,0 M NaCl
0,3 M NaCitrat

Maleinsäurepuffer, pH 7,5

0,10 M Maleinsäure
0,15 M NaCl

Waschpuffer

Maleinsäurepuffer
0,3 % Tween[®]20 (v/v)

Blockierungspuffer

Waschpuffer
10 % Blocking Solution (aus DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II)

Antikörper-Lösung

Blockierungspuffer
Anti Digoxigenin AP Conjugate 1:10000 (75mU/ml) (aus DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II)

Detektionspuffer (pH 9,5)

100 mM Tris-HCl
100 mM NaCl

3.3 VIROLOGISCHE METHODEN

3.3.1 Virusisolierung und Vermehrung

Zur Virusisolierung wurde Organmaterial mit PBS 1:10 verdünnt und mittels des UltraTurrax-Gerätes homogenisiert. Nach zweimaligem Wechsel von Einfrieren und Auftauen erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm (1000xg, 10 min). Der Überstand wurde in ein Zentrifugengefäß (1,5ml) überführt und erneut für 10 min bei 5000 rpm (2000xg) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand filtriert (Porengröße 45µm). Nach Durchführung einer Sterilkontrolle durch Ausstrich auf Columbia-Agar mit Schafblut wurde der Überstand auf die Chorioallantoismembranen (CAM) von 10-12 Tage alten spezifisch pathogen-freien (SPF-) Hühnerembryonen inokuliert (200 µl/CAM) (Abb. 4). Nach 5-7 Tagen Bebrütung bei 37°C wurde die CAM mikroskopisch auf pockenvirus-spezifische Läsionen wie Nekroseherde untersucht. Anschließend wurde das Probenmaterial geerntet, homogenisiert und bis zur Verarbeitung bei -70°C eingefroren.

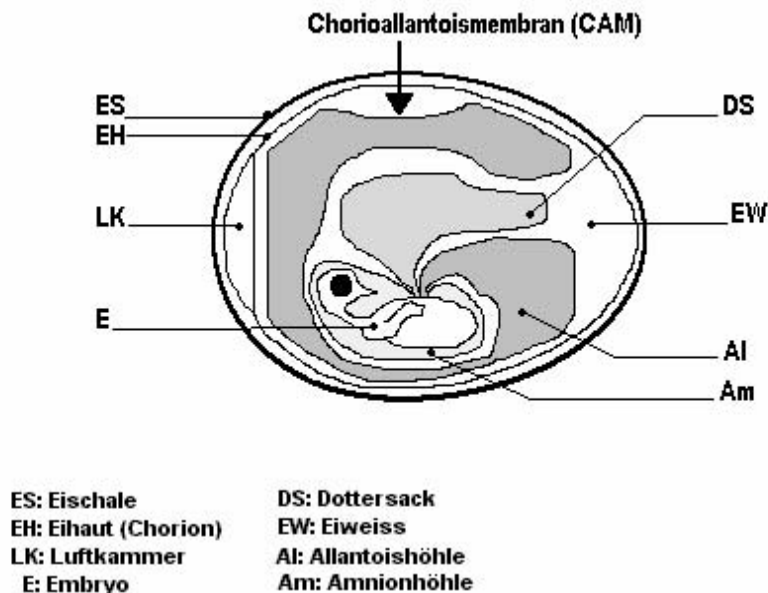


Abb. 4 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

3.3.2 Agargelpräzipitationstest (AGP) zum Virusnachweis und zur Identifizierung

Der Agargelpräzipitationstest (AGP) wurde nach den Angaben von WOERNLE (1966) durchgeführt. Zur Herstellung von Agar wurden 5g Agar-Agar in 495ml NaCl-Lösung (8%ig) unter Erwärmen aufgelöst und auf pH 7,5 eingestellt. Nach Autoklavieren (20 min, 121°C) erfolgte eine Senkung des pH-Wertes auf 7,2 sowie eine Inkubation für 20 min bei 100°C. Von diesem noch flüssigen Agar wurden 15ml in eine Petrischale (Durchmesser 8,5cm) gegossen. Über Nacht verfestigte sich der Agar und wurde anschließend bis zur Testdurchführung bei 4°C aufbewahrt. Vor der Benutzung wurden mit einer geeigneten Stanze sieben Vertiefungen mit einem Durchmesser von 5mm im Abstand von 4mm ausgehoben. Die Anordnung dieser Vertiefungen bestand aus sechs peripheren Vertiefungen, kreisförmig um eine zentrale siebte Vertiefung. Durch Einsatz in eine Vakuumkammer wurde mit 0,8 bar ein Unterdruck erzeugt, um die Haftung des Agars zu ermöglichen. Zur Testdurchführung wurden in die peripheren Löcher 0,03ml homogenisiertes Probenmaterial bzw. CAM und in das zentrale Loch 0,03ml spezifisches Anti-Pocken-Serum pipettiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Test visuell über einer Lichtquelle ausgewertet, wobei sich ein positives Ergebnis als Reaktion zwischen Antigen und präzipitierenden Antikörper durch eine feine Präzipitationsbande im Agar darstellte.

3.3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung (EM)

Zur elektronenmikroskopische Untersuchung (EM) wurde das Probenmaterial an das Landesamt für Verbraucherschutz und Landwirtschaft Potsdam eingesendet und freundlicherweise von Herrn Dr. Soike untersucht.

3.4 ETABLIERUNG EINER POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) ZUM NACHWEIS VON GEFLÜGELPOCKEN

3.4.1 Verwendete Virusstämme und Isolate

Die zur Etablierung einer PCR zum Nachweis von Geflügelpocken verwendeten Pockenvirusstämme und Isolate sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5 Zur Etablierung verwendetes Virusmaterial

Bezeichnung	Virusmaterial
HP-B	Hühnerpockenimpfstoff
HP-1	Hühnerpockenvirusstamm
GB 48-01	Pockenvirus-Feldisolat (Mastelertier)
GB 49-01	Pockenvirus-Feldisolat (Mastelertier)
GB 50-01	Pockenvirus-Feldisolat (Mastelertier)
GB 64-01	Pockenvirus-Feldisolat (Legehennen)
GB 79-01/1	Pockenvirus-Feldisolat (Mastelertier)
GB 134-01	Pockenvirus-Feldisolat (Putenelertier)
GB 156-01	Pockenvirus-Feldisolat (Legehennen)
GB 304-01	Pockenvirus-Feldisolat (Legehennen)
GB 320-01	Pockenvirus-Feldisolat (Legehennen)
GB 404-01	Pockenvirus-Feldisolat (Legehennen)
GB 415-01	Pockenvirus-Feldisolat (Legehennen)
GB 439-01	Pockenvirus-Feldisolat (Legehennen)
REV	Retikuloendotheliosevirus
ILTV	Virus der Infektiösen Laryngotracheitis
CAV	Virus der Infektiösen Anämie der Küken
FAV-1	Hühneradenovirus-1

Der Hühnerpockenimpfstoff HP-B stammt von Lohmann Animal Health (LAH), Cuxhaven. Der Hühnerpockenvirusstamm HP-1 wurde freundlicherweise von Prof. Czerny, Universität Göttingen, überlassen. Die Feldisolate entstammten aus den Einsendungen zur Diagnostik

des Institutes aus dem Jahr 2001 und wurden parallel mittels konventioneller Nachweismethoden von Geflügelpocken (Elektronenmikroskopie, Virusisolierung und Identifizierung bzw. Antigennachweis mittels AGP) untersucht. Um ein spezifisches Diagnostikverfahren zum Nachweis von Geflügelpocken im gesamten Wirtschaftsgeflügelbereich zu etablieren, war es notwendig, mit diesem Verfahren Pockenviren auch bei Geflügel unterschiedlicher Nutzungsrichtungen zu erfassen. Daher wurden verschiedene Feldisolate, von Hühnern unterschiedlicher Nutzungsrichtungen sowie von Puten, bei denen bereits zuvor eine Geflügelpockeninfektion mittels konventioneller Verfahren nachgewiesen werden konnte, zur Etablierung der PCR verwendet.

3.4.2 Untersuchungsablauf

Zur Etablierung der PCR wurde die Spezifität überprüft und die Sensitivität bestimmt. Die Spezifität wurde durch Restriktionsenzymanalyse (REA) und Sequenzierung anhand des entstandenen PCR-Produktes vom Hühnerpockenimpfstoff (HP-B) untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine weitere Überprüfung der Spezifität durch Untersuchung von Isolaten mit bestätigter Geflügelpockeninfektion. Des Weiteren wurde DNA weiterer aviärer Viren in der PCR untersucht. Darüber hinaus wurden die Sensitivitäten von PCR und von den parallel durchgeführten konventionellen Diagnostikverfahren EM, Virusisolierung und AGP verglichen. Die Sensitivität wurde durch Untersuchung einer DNA-Verdünnungsreihe des FWPV-Stammes HP-1 mittels Gelelektrophorese und Dot Blot-Verfahren bestimmt.

DURCHFÜHRUNG DER POLYMERASEKETTENREAKTION

3.4.3 Aufbereitung

In PBS gelöste Impfstoffe und Virussuspensionen wurden bei -70 °C bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt. Die Gewebeproben wurden von pockenartig veränderten Hautstellen am Übergang zur unveränderten Haut bzw. von diphtheroiden Belägen im Rachenraum oder aus Tracheen entnommen. Sie wurden bis zur DNA-Extraktion bzw.

Virusisolierung am gleichen Tag bei 4 °C gekühlt. Bei längerer Zeitspanne bis zur Verarbeitung erfolgte die Aufbewahrung bei -20 °C.

3.4.4 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mittels QIAamp® DNA Mini Kit durchgeführt. Die Bezeichnungen der Puffer stammen vom Hersteller. Zur Zentrifugation wurde eine Eppendorfzentrifuge (5415C) und zum Mischen der Proben das Vortex-Genie™ auf Stufe 6 eingesetzt. Die Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, sofern es nicht anders erwähnt wird.

3.4.4.1 DNA-Extraktion bei Impfstoffen, Virussuspensionen und Homogenaten

Bei Impfstoffen, Virussuspensionen und Homogenaten von Chorioallantoismembranen wurden pro 200 µl Probe 20 µl Proteinase K und 200 µl Lysispuffer AL zugegeben. Nach kräftigen Mischen wurde der Ansatz zunächst 1 h im Wasserbad bei 56 °C und anschließend 10 min im Wasserbad mit 70 °C schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl eiskaltem, absolutem Ethanol und erneutes Mischen. Dieses Gemisch wurde auf das mitgelieferte Filterröhrchen überführt und für 1 min bei 8000 rpm (5200 x g) zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und 500 µl Waschpuffer AW1 auf den Filter gegeben. Nach erneuter, gleichtouriger Zentrifugation wurde wieder das Filtrat verworfen. Anschließend erfolgten ein zweiter Waschschrift durch Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW2 und eine hochtourige Zentrifugation für 3 min bei 14000 rpm (15800 x g). Das Filtrat wurde verworfen. Nach Zugabe von 100 µl des bei 70 °C vorgewärmten Elutionspuffers AE auf den Filter erfolgte eine zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 8000 rpm (5200 x g) aus dem Filter eluiert.

3.4.4.2 DNA-Extraktion bei Gewebeproben

Eine Probe von 25 mg wurde in ein Zentrifugengefäß (2 ml) überführt und mit einer sterilen Schere grob zerkleinert. Zu dem Organmaterial wurden 20 µl Proteinase K und 180 µl des Lysispuffers ATL gegeben und gemischt, um anschließend bei 56 °C im Schüttelbad über

Nacht zu inkubieren. Am folgenden Tag wurden 200 µl Lysispuffer AL zugeführt und die Suspension nach kurzem Aufmischen 10 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl eiskaltem, absolutem Ethanol wurde der Ansatz gemischt und die Suspension auf das mitgelieferte Filterröhrchen überführt und für 1 min bei 8000 rpm (5200 x g) zentrifugiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte analog zu 3.4.4.1.

3.4.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte in einem Fluorometer mit einem optischen Exzitationsfilter für 340-380 nm und einem optischen Emissionsfilter für 455-465 nm Lichtwellenlänge. Als Eichlösung wurden 2 µl 250-Lambda-DNA mit einer Konzentration von 0,25 µg/µl in 2 ml TNE-Puffer mit 0,2 µl des Farbstoffes Hoechst Dyes 33258 verwendet. Von der zu messenden DNA-Probe wurden ebenfalls 2 µl mit 2 ml des oben beschriebenen TNE-Puffers in einer Küvette vermengt. Der vom Fluorometer gemessene und angezeigte Wert für die DNA-Konzentration entsprach einer Angabe in ng/µl. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass bei der oben angegebenen Methode zur DNA-Extraktion die Gesamt-DNA gemessen wurde, wobei der Anteil an viraler DNA nicht näher bestimmt werden konnte.

3.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Ready-To-Go™ PCR Beads-Kit

Zusätzlich zur PCR zum Nachweis von Geflügelpocken (FP1/FP2-PCR) wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere PCR-Verfahren etabliert: eine XL-1/XL2-PCR zur Herstellung einer spezifischen FWPV-DNA-Sonde (3.4.6.2) und eine A1/A2-PCR zur Überprüfung der Qualität extrahierter DNA (3.4.6.3). Aufgrund gleicher Methodik werden diese drei PCR-Verfahren hier zusammen beschrieben. Die Durchführungen der PCR-Amplifikationen erfolgten unter Verwendung des Kits Ready-To-Go™ PCR Beads. Die verwendeten Primer wurden bei der Firma C. Roth, Karlsruhe, synthetisiert und sind in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Tab. 6 Übersicht über die verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Polarität	Nukleotid- position	Amplifikat	Primer- konzentration
FP 1/FP 2-PCR Zielgen: FWPV-Core Protein 4b ²					
FP 1	CAGCAGGTGCTAAACAACA ¹	V	458- 477 ²	578 bp	je 12,5 pmol/μl
FP 2	CGGTAGCTTAACGCCGAATA ¹	R	1016- 1035 ²		
XL1/XL 2-PCR Zielgen: FWPV-Core Protein 4b ²					
XL 1	CAGGAAAAGGGTATTATGTT ACCAG	V	158- 182 ²	1272 bp	je 25,0 pmol/μl
XL 2	CGTTAAGCGGTTGGTAAGGA	R	1410- 1429 ²		
A 1/A 2-PCR Zielgen: β-Aktin beim Huhn ³					
A 1	TCCGTTGGAGTTGATCCTTC	V	1933- 1952 ³	398 bp	je 25,0 pmol/μl
A 2	CAAAAAGGGAGAAGTGGTG	R	2330- 2311 ³		

V: vorwärts gerichteter Primer, R: rückwärts gerichteter Primer

¹ Die Primer wurden der Veröffentlichung von LEE und LEE (1997) entnommen.

^{2,3} Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf die veröffentlichte Sequenz von ² BINNS et al. (1989) bzw. ³ KOST et al. (1983).

In die PCR-Gefäße des Kits wurden 2 μl des jeweiligen Primerpaarmixes pipettiert und das Gesamtvolumen von 25 μl abzüglich der einzusetzenden DNA-Menge mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Bei Impfstoffen, Virussuspensionen und Chorioallantoismembranhomogenaten wurden 50 ng DNA, bei Gewebeproben und Hauthomogenaten 1000 ng DNA in der PCR eingesetzt. Die Zugabe der DNA erfolgte zur Vermeidung von Kontaminationen räumlich getrennt. Die Durchführung der PCR erfolgte im T3-Thermostyzykler. Die Temperaturprofile der einzelnen PCR-Verfahren sind in der Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7 Temperaturprofile der durchgeführten PCR-Verfahren

PCR	Temperaturprofil			
FP 1/FP 2-PCR	Initiale Denaturierung: 2 min 94 °C			
	35 Zyklen	Denaturierung 1 min 94 °C	Anlagerung 1 min 60 °C	Synthese 1 min 72 °C
	Finale Synthese: 2 min 72 °C			
XL 1/XL 2-PCR	Initiale Denaturierung: 4 min 94 °C			
	35 Zyklen	Denaturierung 1 min 94 °C	Anlagerung 1 min 60 °C	Synthese 1,5 min 72 °C
	Finale Synthese: 2 min 72 °C			
A 1/A 2-PCR	Initiale Denaturierung: 2 min 94 °C			
	35 Zyklen	Denaturierung 1 min 94 °C	Anlagerung 1 min 55 °C	Synthese 1 min 72 °C
	Finale Synthese: 2 min 72 °C			

3.4.6.1 FP 1/FP 2-PCR

Die FP 1/FP 2-PCR wurde zum Nachweis von Geflügelpocken verwendet. Die Primer FP 1 und FP 2 entstammten der Veröffentlichung von LEE und LEE (1997) und basieren auf der Gensequenz des FWPV-Core Proteins 4b (ORF 167) (BINNS et al., 1989). Das durch die PCR zu erwartende Amplifikat besaß eine Größe von 578 bp.

3.4.6.2 XL 1/XL 2-PCR

Zur Herstellung einer spezifischen FWPV-DNA-Sonde wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die sich außerhalb des in der FP 1/FP 2-PCR amplifizierten Bereiches anlagerten und somit zur Vervielfältigung eines größeren DNA-Abschnitts innerhalb des Core Protein 4b Gens führten, der dessen Sequenz aber beinhaltete (Abb. 5). Die Primer XL 1 und XL 2 wurden auf Grundlage der FWPV-Gensequenz des Core Proteins 4b nach BINNS et al. (1989) ausgewählt. Es war ein Amplifikat mit der Größe von 1272bp zu erwarten.

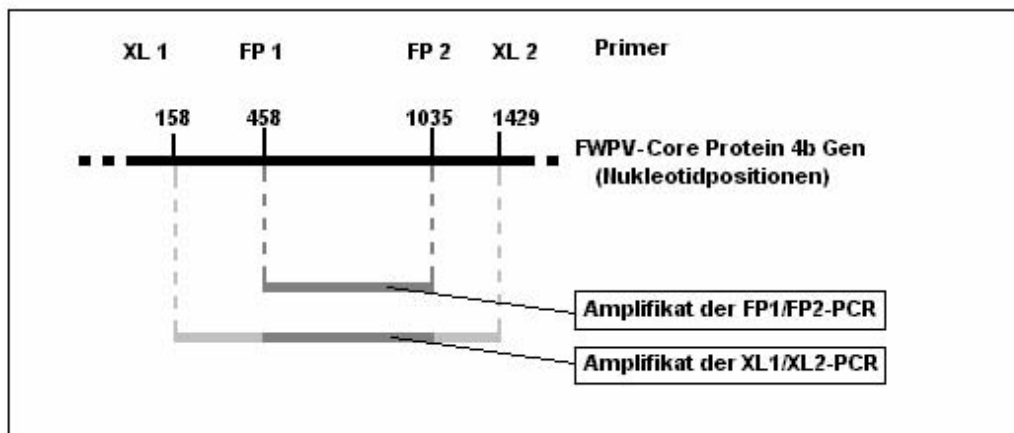


Abb. 5 Vergleich der Amplifikate der FP 1/FP 2-PCR und der XL 1/XL 2-PCR

3.4.6.3 A 1/A 2-PCR

Zur Überprüfung der Qualität extrahierter DNA wurde bei negativem Ergebnis der FP 1/FP 2-PCR eine PCR mit spezifischen Primern für die Gensequenz von β -Aktin durchgeführt. β -Aktin ist ein Zellstrukturprotein, das im Zytoskelett aller eukaryontischen Zellen vorkommt. Nur wenn die PCR für β -Aktin positiv verläuft, kann davon ausgegangen werden, dass die DNA-Extraktion erfolgreich war und in der Probe keine Inhibitoren vorlagen. Die Primer A 1 und A 2 wurden basierend auf der Gensequenz des β -Aktins beim Huhn (KOST et al., 1983) gewählt und synthetisieren ein Amplifikat von 398 bp.

3.4.7 PCR ohne Verwendung des Ready-To-Go™ PCR Beads-Kits

In einigen Fällen wurde die FP 1/FP 2-PCR ohne Verwendung des Ready-To-Go™ PCR-Kits durchgeführt, um eine größere Menge an PCR-Produkt für die anschließende Restriktionsenzymanalyse zu erhalten. Ein solcher Ansatz bestand aus 2 μ l des Primerpaares FP 1 und FP 2 (je 25 pmol/ μ l), 5 μ l NH_4 -Reaktionspuffer, 1,5 μ l MgCl_2 , 1 μ l 50x dNTP-Mastermix und 0,5 μ l TaqDNA Polymerase. Durch Auffüllen mit nukleasefreiem Wasser erhielt man ein Endvolumen von 50 μ l. Das weitere Verfahren erfolgte analog zu 3.4.6.

3.4.8 Qualitätssicherung der PCR

Die routinemäßige Durchführung der PCR birgt durch die hohe Sensitivität ein Risiko der Kontamination, welches durch folgende Maßnahmen verringert wurde: separierte Arbeitsräume für die DNA-Extraktion, für die Zugabe der PCR-Reagenzien, für das Zuführen der DNA sowie für die PCR-Produktanalyse, Herstellung der Reagenzien und Lösungen in nur dafür vorgesehenen Räumen und Gefäßen, getrennte Reagenzien und Lösungen für jeden Untersucher, Tragen spezieller arbeitsraumabhängiger Laborkleidung und Benutzung von gestopften Einmalpipettenspitzen. Um mögliche Kontaminationen nachzuweisen wurden bei jeder Untersuchung zwei Negativkontrollen mitgeführt: eine Präparationskontrolle, die von Beginn der DNA-Extraktion mitgeführt wurde, und eine zusätzliche PCR-Reagenzienkontrolle, die alle Bestandteile außer der DNA enthielt.

3.4.9 PCR-Produktanalyse

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde die Agarosegelelektrophorese angewendet. Der Prozentgehalt des Gels an Agarose betrug in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße bei XL 1/XL 2-PCR-Produkten 0,5% und bei FP 1/FP 2-PCR sowie A 1/A 2-PCR-Produkten 1,2%. Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (5 µl/100 ml) und zu horizontalen, etwa 5 mm starken Gelen (etwa 11 cm x 14 cm) mit 14 Probenaschen gegossen. Zur Auftrennung wurden jeweils 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Probenladepuffer vermischt und in die Probenaschen des Gels pipettiert. Als molekularer Größenstandard wurden nach Herstellerempfehlung 0,5 µg des 100 bp-DNA-Größenmarkers aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1xTBE-Puffer. Die Elektrophorese fand bei 60 bis 65 Volt über 2 bis 2,5h statt. Die Auswertung erfolgte mittels Videodokumentationssystem Bioprint DS und der Software BioCapt Version 97.05.

ÜBERPRÜFUNG DER SPEZIFITÄT

3.4.10 Restriktionsenzymanalyse (REA) der PCR-Produkte

Für die Restriktionsenzymanalyse (REA) wurden die Endonukleasen *EcoRV* und *NlaIII* anhand der bekannten FWPV-Core Protein 4b Gensequenz (BINNS et al., 1989) ausgewählt. Die verwendeten Enzyme mit ihren entsprechenden Spaltstellen sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8 Verwendete Endonukleasen und ihre Spaltstellen

Enzym	Spaltstelle (/)
<i>EcoRV</i>	5'-GAT/ATC-3'
<i>NlaIII</i>	5'-CATG/-3'

Pro Ansatz wurden etwa 500-1000 ng des PCR-Produktes mit 20 Einheiten des entsprechenden Enzyms und 2 µl des vom Hersteller empfohlenen enzymabhängigen Reaktionspuffer versetzt. Darüber hinaus wurden laut Herstelleranleitung 2 µg des mitgelieferten BSA hineinpipettiert. Der durch dH₂O auf insgesamt 20 µl aufgefüllte Ansatz wurde für 1,5-2 h in einem Thermoblock bei 37°C inkubiert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese auf einem 3%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5 µl/100 ml) aufgetrennt. Hierfür wurde der gesamte Ansatz mit 2 µl Probenladepuffer vermischt und in die Probenaschen des Gels pipettiert. Als molekularer Größenstandard wurden nach Herstellerempfehlung 0,5 µg eines 100 bp-DNA-Größenmarkers aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1xTBE-Puffer. Die Elektrophorese fand bei 60 bis 65 Volt über 3 h statt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgten wie bei der PCR-Produktanalyse (3.4.9).

3.4.11 Klonierung von Amplifikaten

Zur Klonierung eines Amplifikates wurde das gelgereinigte PCR-Produkt in einen Plasmidvektor ligiert und der rekombinante Vektor anschließend in Bakterien transformiert.

3.4.11.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.4.9). Hierzu wurde jedoch abweichend zur beschriebenen PCR-Produktanalyse das gesamte PCR-Produkt (25 µl), vermischt mit 2,5 µl DNA-Probenladepuffer, aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Bande auf einem UV-Transilluminator aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die weitere Verarbeitung erfolgte entweder a) mittels Invisorb Spin DNA Extraction Kit oder b) mittels Millipore Ultrafree®-MC Kit. Die Verfahren wurden nach den jeweiligen Herstelleranleitungen durchgeführt. Die Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, soweit es nicht anders erwähnt wird.

a) Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Invisorb Spin DNA Extraction Kit

Der ausgeschnittene Gelblock wurde in ein Zentrifugengefäß (2 ml) überführt. Zu dem Gelblock wurden 500 µl Gel-Lösungspuffer gegeben und gemischt. Anschließend wurde die Agarose 10 min bei 50 °C auf einem Thermoblock leicht geschüttelt, bis die Agarose vollständig verflüssigt war. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl Bindungspuffer. Nach Überführen des Reaktionsvolumens auf die mitgelieferte Filtersäule und Zentrifugation bei 10000 rpm (10600 x g, 1 min) wurde das Filtrat verworfen. Bei den folgenden zwei Waschschrritten wurden jeweils 500 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und nach anschließender Zentrifugation für 30 sek bei 12000 rpm (15300 x g) das jeweilige Filtrat verworfen. Nach Entfernung der Waschpufferreste aus dem Filter durch hochtourige Zentrifugation (14000 rpm (20800 x g), 4 min) wurde der Filter 5 min bei Raumtemperatur mit 10-20 µl Elutionspuffer equilibriert. Durch abschließende Zentrifugation für 1 min bei 12000 rpm (15300 x g) wurde die DNA eluiert.

b) Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Millipore Ultrafree®-MC Kit

Bei dieser Methode wurde der ausgeschnittene Gelblock ebenfalls in ein Zentrifugengefäß (1,5 ml) überführt. Nach Einfrieren (60 min, -20 °C) und Auftauen (5 min, 37 °C) wurde das Gel ohne Zugabe von Puffern in die mitgelieferte Filtersäule überführt und vorsichtig mit einer sterilen Skalpellklinge zerkleinert. Nach anschließender Zentrifugation bei 7000 rpm

(5200xg) für 5 min befand sich die DNA im Durchlauf und wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen Natriumazetat (3M) sowie von 2 Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol für eine Stunde bei -70 °C gefällt. Daraufhin fanden eine Zentrifugation für 30 min bei 14000rpm (20800xg), ein Waschen des Pellets mit Ethanol (70% ig) und eine zweite Zentrifugation für 5 min bei 14000rpm (20800xg) statt. Das Pellet wurde in 10 µl dH₂O aufgenommen.

3.4.11.2 DNA-Konzentrationsermittlung

Zur DNA-Konzentrationsermittlung wurde 1 µl gelgereinigtes PCR-Produkt (3.4.11.1) mit Probenladepuffer vermischt und in die Taschen eines 1,2%igen Agarosegels pipettiert. In eine weitere Tasche des Gels wurden 0,5 µg eines molekularen Größenstandards (100 bp-DNA-Größenmarker) mit bekannten Konzentrationen der Banden gegeben. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (3.4.9) wurde durch visuellen Vergleich der Bandenstärken die Konzentration des gereinigten PCR-Produktes ermittelt. Diese Methode führt zu einer für das weitere Vorgehen ausreichenden Abschätzung der DNA-Konzentration bei zeitgleicher Überprüfung der Bandengröße.

3.4.11.3 Platten für Bakterienkulturen

Zur Herstellung von Platten für Bakterienkulturen wurden 15 g Agar in 1000 ml LB-Medium aufgelöst. Nach Autoklavieren bei 121 °C für 15 min und Abkühlen verfestigte sich das Gemenge und wurde bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde es durch Erwärmen verflüssigt. Nach Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml) wurden 30 ml in eine Petrischale (Durchmesser 8,5 cm) gegossen. Auf den verfestigten Agar wurden 20 µl X-Gal sowie 100 µl IPTG aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die Platte wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Bis zur Testdurchführung wurde die Platte bei 4 °C aufbewahrt und vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht.

3.4.11.4 Ligation von Amplifikaten in Plasmidvektoren

Zur Ligation und Transformation wurde das Promega pGEM-T Vektor System II nach Herstellerangaben verwendet. Die Bezeichnungen stammen vom Hersteller. Die in den linearen Vektor (Plasmid-DNA) zu ligierende Amplifikat-DNA (Insert) lag gelgereinigt (3.4.11.1) vor. Für die Ligation wurden nach Herstellerempfehlung 10-30ng Amplifikat-DNA eingesetzt, um ein optimales molares Verhältnis (Insert:Vektor-Ratio) von 1:1 bis 1:3 zu erreichen (Berechnung laut Herstellerangaben):

Benötigte Menge Amplifikat-DNA (ng) =

$$\frac{\text{Vektor-DNA (ng)} \times \text{Größe des Amplifikats (kbp)}}{\text{Größe des Vektors (kbp)}} \times \text{Insert : Vektor - Ratio}$$

Das entsprechende Volumen wurde in sterile Gefäße (0,5ml) pipettiert und mit 5µl Ligationspuffer, 50ng pGEM[®]-T-Vektor sowie mit 3 Einheiten des Enzyms T4 DNA Ligase versetzt und durch nukleasefreies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10µl gebracht. Nach leichtem Mischen inkubierte der Ligationsansatz über Nacht bei 4 °C.

3.4.11.5 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Der Ligationsansatz wurde bei 6000 rpm (3800xg) kurz zentrifugiert, ein Aliquot von 2µl in ein steriles Zentrifugengefäß (1,5ml) überführt und mit 50µl auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienzellen (JM 109 High Efficiency Competent Cells) versetzt. Durch vorsichtiges Antippen wurde die Suspension gemischt und anschließend 20 min auf Eis gekühlt. Der Ansatz inkubierte 50 sek bei 42 °C und wurde danach sofort für 2 min wieder auf Eis gekühlt. Zu dem Gemisch wurden 950µl SOC Medium hinzupipettiert. Die Suspension wurde 90 min bei 150 rpm und 37 °C geschüttelt. 100µl der transformierten Bakterien wurden auf Platten für Bakterienkulturen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.4.11.6 Beurteilung des Klonierungserfolges

Aufgrund der Vektoreigenschaften verfügten die Bakterien, die den Vektor aufgenommen hatten, über eine Ampicillin-Resistenz. Folglich konnten auf den mit Ampicillin supplementierten Platten nur transformierte Bakterien wachsen. Darüber hinaus konnten die Bakterien, die den nativen Vektor (ohne Insert) besaßen, das funktionsfähige Enzym β -Galactosidase bilden, welches X-Gal spaltet, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Diese Bakterien konnten an der Bildung blauer Kolonien erkannt werden. Demgegenüber bildeten Bakterienklone mit Vektoren, bei denen durch die Aufnahme des Inserts die codierende Sequenz für das Enzym unterbrochen wurde, nur weiße Kolonien bilden. Diese Blau-Weiß-Selektion ist schematisch in der Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9 Blau-Weiß-Selektion der Bakterienkolonien

	Bakterien		
Transformation	Keine Transformation	Vektor ohne Insert	Vektor mit Insert
Wachstum	-	+	+
Koloniefarbe	-	blau	Weiß

3.4.12 Präparation von Plasmid-DNA

Die weißen Einzelkolonien wurden mittels eines sterilen Holzspießes einzeln gepickt, in 2,5 ml flüssiges LB-Ampicillin-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 150 rpm bebrütet (Übernachtskultur). Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte als Mini-Präparation oder als Midi-Präparation mit dem QIAgenTM Plasmid Midi Kit. Die Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, sofern es nicht anders erwähnt wird.

3.4.12.1 Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Der Überstand der Übernachtskultur wurde in ein Zentrifugegefäß (2 ml) überführt und für 1 min bei 14000 rpm (20800 x g) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes mittels

einer Membranvakuumpumpe wurde das Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden 200 µl Lysispuffer hinzugefügt und die Suspension geschwenkt. Nach Zugabe von 150 µl eiskaltem Neutralisationspuffer und fünfminütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm (20800xg). Der Überstand wurde in ein Zentrifugengefäß (1,5 ml) überführt und mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach leichtem Schwenken (1 min) und wiederholter Zentrifugation erfolgte ein Überführen des Überstandes in ein neues Gefäß. 2 Volumen eiskalter, absoluter Ethanol wurden dazugegeben und gemischt. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zentrifugation wiederholt, der Überstand abgenommen und das Pellet mit Ethanol (70%ig) gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde abschließend in 20 µl TE mit RNase (20 µl/ml) resuspendiert.

3.4.12.2 Präparation von Plasmid-DNA (Präparation mit QIAgen™ Plasmid Midi Kit)

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA für die anschließende Sequenzierung wurde das QIAgen™ Plasmid Midi Kit verwendet. Die Namen der Puffer stammen vom Hersteller. Der plasmidtragende Bakterienklon wurde aus der Übernachtskultur auf einer Platte für Bakterienkulturen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Als Vorkultur wurden 2 ml flüssiges LB-Ampicillin-Medium mit Kulturmaterial beimpft und 5 bis 7 Stunden im Schüttelinkubator bei 300 rpm und 37 °C inkubiert. Je nach Trübung wurden 25-50 µl mit 25 ml flüssigen LB-Ampicillin-Medium versetzt. Anschließend fand die bakterielle Vermehrungsphase bei 37 °C im Schüttelinkubator über Nacht statt. Daraufhin wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch ermittelt. Die Extinktion wurde gegen unbeimpftes flüssiges LB-Ampicillin-Medium gemessen. Durch Zugabe von LB-Ampicillin-Medium wurde ein OD-Wert von 1,5 eingestellt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 6000 rpm (3800xg) für 15 min wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 4 ml Resuspensionspuffer und 4 ml Lysispuffer zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Suspension mit 4 ml kaltem Neutralisationspuffer versetzt und durch Schwenken gemischt. Nach sofortigem Überführen in die QIAfilterCartridge inkubierte der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Suspension auf den bereits mit 10 ml Equilibrierungspuffer QBT vorbereiteten Qiagen-tip (Filter) gegeben. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend erfolgten zwei Waschvorgänge, indem jeweils 10 ml Waschpuffer QC auf den Qiagen-tip

pipettiert wurden. Das durchlaufende Filtrat wurde verworfen. Nach Zugabe von 5 ml Elutionspuffer QF wurde der Durchlauf mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Die Probe wurde bei 25000 rpm (75000xg) für 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit Ethanol (70%ig) gewaschen und erneut zentrifugiert (25000rpm (75000xg), 10min). Der Überstand wurde wiederholt verworfen und das luftgetrocknete Pellet in 50 µl dH₂O aufgenommen.

3.4.12.3 Bestätigung der Insert-Aufnahme

Zur Bestätigung der Aufnahme des kompletten Inserts (Amplifikat-DNA von 578bp) wurden 1 µl der präparierten Plasmid-DNA sowie eine Plasmid-DNA mit entsprechender Vektorgröße mit Probenladepuffer gemischt und in die Probenaschen eines mit 5 µl Ethidiumbromid versetzten 0,7% Agarosegels pipettiert (vgl. 3.4.9). Als Größenstandard wurden 8 µl eines 1 kbp-DNA-Größenmarkers mitgeführt. Erfolgreiche Insert-Aufnahme zeigte sich durch eine durch die Amplifikat-Aufnahme erhöhte Bandenhöhe. Eine genauere Bestätigung der Insert-Aufnahme erfolgte nach fluorometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration (3.4.5) durch Anwendung der FP1/FP2-PCR (3.4.6) und anschließender REA (3.4.10).

3.4.13 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der Plasmid-DNA (3.4.12.2) erfolgte bei einem kommerziellen Sequenzierservice (AGOWA, Berlin) unter Verwendung von SP6 und T7 Promoter Primern.

3.4.14 Untersuchung anderer aviärer Viren

Darüber hinaus wurde die Spezifität der PCR zum Nachweis für hühnerpockenvirus-spezifische DNA mittels Untersuchung weiterer aviärer Viren überprüft. Hierfür wurde DNA des Virus der Infektiösen Laryngotracheitis (ILTV), des Virus der Infektiösen Anämie der Küken (CAV) und des Hühneradenovirus 1 (FAV1) sowie provirale DNA des Retikuloendotheliosevirus (REV) in der FP1/FP2-PCR eingesetzt.

BESTIMMUNG DER SENSITIVITÄT

3.4.15 Virusreinigung und DNA-Extraktion zum Erstellen einer Verdünnungsreihe

Die Virusreinigung von Hühnerpockenvirus-DNA (HP-1) erfolgte nach der von JOKLIK (1962) beschriebenen und von CZERNY und MAHNEL (1990) modifizierten Methode. 400ml des Virusmaterials HP-1 (HEF, 452. Passage) wurden 2h bei 11000rpm (13700xg, SW 28 Rotor) zentrifugiert und das Pellet in 1ml Tris-HCl aufgenommen. Nach dreimaligem Wechsel von Einfrieren (30min, -70°C) und Auftauen (30min, 37°C) sowie Beschallung (dreimal für 10sek) wurde das Gemisch für 10min bei 2500rpm (800xg) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch erneute Zentrifugation für 90min bei 25000rpm (11200xg, SW 28 Rotor) in 10ml eines 36%igen Sucrosekissens pelletiert. Das Pellet wurde in 1ml Tris-HCl resuspendiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Gemisch auf Eis erneut beschallt (dreimal für 10sek). Je 500µl wurden auf 10ml eines linearen, 20-60%igen Sucrosegradienten aufgetragen. Nach Zentrifugation für 90min bei 15000rpm (25000xg, SW 41 Rotor) wurde die sichtbare Virusbande entnommen und mit 2 Volumen Tris-HCl versetzt. Nach Zentrifugation für 1h bei 25000rpm (75000xg, SW 41 Rotor) zur Entfernung der Sucroslösung wurde das Pellet in 400µl ProteinaseK-Puffer aufgenommen und mit 0,4µg ProteinaseK über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Suspension 1 Volumen Phenol (100%) zugeführt, der Ansatz 2min geschwenkt und 2min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10min bei 14000rpm (20800xg), nach der die obere, wässrige Phase abgenommen und mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) durch Schwenken (2min) gemischt wurde. Nach wiederholter Zentrifugation wurde erneut die obere Phase abgenommen und 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugeführt. Nach 2minütigem Schwenken und erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und die darin enthaltene DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen Natriumazetat (3M) und von 2 Volumen eiskalten, absoluten Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt und durch eine 15minütige Zentrifugation bei 14000rpm (20800xg) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 100µl Ethanol (70%ig) gewaschen. Abschließend wurde nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14000rpm (20800xg) das Pellet in 30µl TE-Puffer (pH 7,4) aufgenommen.

3.4.16 Erstellen einer Hühnerpockenvirus-DNA-Verdünnungsreihe

Aus der gereinigten Hühnerpockenvirus-DNA (HP-1) mit einer fluorometrisch gemessenen Konzentration von 270 ng/μl wurde mit nukleasefreiem Wasser eine Ausgangskonzentration von 1 μg DNA/100 μl hergestellt. Die weitere Verdünnung erfolgte in 1:10 Schritten. Ab der Stufe 7 (1 pg DNA/100 μl) erfolgte die Verdünnung in 1:2 Schritten bis 62,5 fg DNA/100 μl (Tab. 10).

Tab. 10 Verdünnungsreihe: DNA-Konzentrationen und Genomäquivalente

Stufe	DNA /100μl	Genomäquivalente* in 100μl	DNA in PCR (10μl)	Genomäquivalente* in PCR (10μl)
1	1,000 μg	$3 \cdot 10^9$	0,100 μg	$3 \cdot 10^8$
2	0,100 μg	$3 \cdot 10^8$	0,010 μg	$3 \cdot 10^7$
3	0,010 μg	$3 \cdot 10^7$	1,000 ng	$3 \cdot 10^6$
4	1,000 ng	$3 \cdot 10^6$	0,100 ng	$3 \cdot 10^5$
5	0,100 ng	$3 \cdot 10^5$	0,010 ng	$3 \cdot 10^4$
6	0,010 ng	$3 \cdot 10^4$	1,000 pg	3000
7	1,000 pg	3000	0,100 pg	300
8	0,500 pg	300	0,050 pg	150
9	0,250 pg	150	0,025 pg	75
10	0,125 pg	75	0,0125 pg	37
11	62,5 fg	37	6,25 fg	18

*berechnete Zahl an Genomäquivalenten anhand Menge (mol) und Größe (bp) der DNA in Anlehnung an Angaben im Eppendorf-Katalog.

3.4.17 Dot Blot-Verfahren

Zur Durchführung des Dot Blot-Verfahrens wurde das DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II verwendet.

3.4.17.1 Herstellung der Sonde

Von der aus dem XL1/XL2-PCR-Produkt (3.4.6.2) durch Gelreinigung (3.4.11.1) erhaltenen DNA wurden 100ng durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 16µl gebracht. Danach erfolgten eine Hitzedenaturierung bei 95°C für 10min mit anschließender sofortiger Kühlung auf Eis sowie die Zugabe von 4µl DIG High Prime Mix. Der Ansatz wurde gemischt und über Nacht bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch zehnmünütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Nach Zugabe von 75 µl Ethanol und zweistündiger Kühlung bei -20°C und Zentrifugation für 15min bei 12000rpm (15300xg) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 50µl kaltem Ethanol (70%ig) gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 50µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.4.17.2 Durchführung des Dot Blot-Verfahrens

8µl des PCR-Produktes wurden 5min bei 95°C in einem Thermoblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Von diesem Ansatz wurden 5µl auf die trockene Nylontransfermembran pipettiert. Die DNA wurde anschließend durch fünfmalige Bestrahlung mittels UV-Stratalinker (jeweils 120mJ/cm², 10sek) auf der Membran fixiert. Die Nylonmembran wurde auf einem Hybridisierungsnetz in eine Hybridisierungsflasche überführt, wobei die Membranoberfläche mit der DNA in das Flascheninnere zeigte. In die Flasche wurden 10ml Hybridisierungspuffer gegeben. Die Prähybridisierung erfolgte über 6h im Hybridisierungssofen bei 42°C. Anschließend wurde der benutzte Hybridisierungspuffer entfernt. Die durch fünfminütige Inkubation bei 95°C denaturierte Sonde wurde in 3,5ml frischem Hybridisierungspuffer (42°C) aufgenommen und auf die Nylontransfermembran gegeben. Bei Aufbewahrung der Sonde bei -15°C bis -25°C ist eine mehrmalige Verwendung möglich, wenn sie vor Benutzung 10min bei 68°C erhitzt wird. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungssofen bei 42°C über Nacht. Nach Rückgewinnen der Sonde wurde die Membran zweimal für 5min in 2xSSC mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur und zweimal für 15min in 0,5xSSC mit 0,1% SDS bei 68°C im Hybridisierungssofen gewaschen. Anschließend erfolgten die weiteren Schritte bei Raumtemperatur auf einem Schüttelapparat. Die Nylontransfermembran inkubierte erst

5 min in 100 ml Waschpuffer und danach 30 min in 100 ml Blockierungspuffer. Anschließend wurde die Membran 30 min in 20 ml Antikörper-Lösung und nach dreimaligem Waschen für jeweils 15 min in je 100 ml Waschpuffer in 20 ml Detektionspuffer (5 min) inkubiert. Auf die aus dem Puffer genommene, noch feuchte Membran wurde 1 ml CSPD Ready-to-use-Lösung gegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Membran luftblasenfrei in Folie versiegelt und zur Exposition auf einen lichtempfindlichen Film gelegt. Die Filmentwicklung erfolgte nach einer Stunde sowie nach Exposition über Nacht durch nacheinanderfolgendes Eintauchen des Filmes in ein Entwicklerbad (3 min), in destilliertes Wasser (1 min) sowie in ein Fixiererbad (2 min).

3.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR EPIDEMIOLOGIE VON GEFLÜGELPOCKEN

3.5.1 Herkunft des Probenmaterials

In der Zeit von Januar 2001 bis Dezember 2003 wurden im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin im Rahmen der Diagnostik 110 Einsendungen mit der Verdachtsdiagnosestellung „Geflügelpocken“ mittels der etablierten FP 1/FP 2-PCR auf hühnerpockenvirus-spezifische DNA untersucht. Als Probenmaterial wurden ganze Tierkörper zur Sektion, Hautproben, diphtheroide Beläge aus der Schnabelhöhle, Tracheen, Tupfer oder Material von Virusanzuchten (homogenisierte Chorioallantoismembranen, Allantoisflüssigkeit) eingesendet (s. Anhang). Des Weiteren wurde bei drei Beständen gleichzeitig zum Verdacht der Geflügelpockeninfektion vorberichtlich Milbenbefall angegeben. Aus diesem Grund wurden von dort Milben als Probenmaterial gesammelt und eingesendet.

3.5.2 Untersuchungsablauf

Die Probenaufbereitung erfolgte analog zu 3.4.3. Aus pockenpositiven Beständen mit gleichzeitig vorliegendem Milbenbefall wurden die Milben in PBS gewaschen und wie Gewebeproben aufbereitet und verarbeitet.

Die DNA wurde wie unter 3.4.4 beschrieben extrahiert und deren Konzentration analog zu 3.4.5 bestimmt. Die Durchführungen der PCR-Verfahren und die Produktanalyse erfolgten wie unter 3.4.6 bzw. 3.4.9 beschrieben. Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurde analog zu 3.4.10 die Restriktionsenzymanalyse (REA) durchgeführt.

Proben, die in der FP 1/FP 2-PCR zu einem negativen Ergebnis führten, wurden anschließend in der A 1/A 2-PCR zum Nachweis des β -Aktin-Gens (3.4.6.3) eingesetzt, um nachzuprüfen, dass die DNA erfolgreich extrahiert wurde und in der Probe keine Inhibitoren vorlagen.

3.6 NACHWEIS UND DIFFERENZIERUNG VON AVIPOCKENVIRUSSPEZIES

3.6.1 Virusmaterial

Die für die Untersuchungen verwendeten Virusstämme und Impfstoffe sind in der Tabelle 11 zusammengestellt. Die Impfstoffe sowie das Isolat vom Agaporniden lagen im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin vor. Die Referenzstämme vom Hühner- (HP-1), Tauben- (TP-2) und Kanarienspockenvirus (KP-1) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Czerny, Tierärztliches Institut der Georg-August-Universität Göttingen, überlassen.

Tab. 11 Verwendete Virusstämme und Impfstoffe

Abk.	Virusname	Herkunft		Referenzen
FWPV	Hühnerpockenvirus (Avipoxvirus gallinae)	HP-1	HEF (450.Passage)	MAYR und MALICKI, 1966
		HP-B	Impfstoff	LAH, Cuxhaven
PGPV	Taubenpockenvirus (Avipoxvirus columbae)	TP-2	HEF (9.Passage)	MAYR und KALCHER, 1960
		Peristin	Impfstoff	Intervet, Boxmeer, Niederlande
CNPV	Kanarienspockenvirus (Avipoxvirus serinae)	KP-1	HEF (4.Passage)	MAYR et al., 1965 MAYR, 1960
		KP-1- V557	Impfstoff	Intervet, Boxmeer, Niederlande

HEF: Hühnerembryofibroblasten

Die Isolate von Hühnern (GB724-01/1-3), Puten (GB724-01/4-18) sowie eines Kanarienvogels (GB724-01/22) und eines Straußes (GB724-01/20) wurden von Intervet, Boxmeer, Niederlande, zur Verfügung gestellt. Das weitere Untersuchungsmaterial bestand aus Gewebe (Haut und Organhomogenat), das zur Diagnostik mit dem Verdacht auf Vogelpocken an das Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin eingesandt wurde. In der Tabelle 12 ist das Virusmaterial nach der Vogelart, von der es stammte, taxonomisch eingeordnet.

Tab. 12 Verwendetes Virusmaterial, geordnet nach der Taxonomie der Vogelart

Ordnung	Familie	Vogelart (Lateinischer Name)	Pockenvirusspezies und Isolate		
			Bezeichnung	Herkunftsland Material	
Phasianiformes	Phasianidae	Huhn (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Stamm HP-1	Deutschland	HEF 450. P.
			Stamm HP-B	Unbekannt	Impfstoff LAH
			Feldisolat GB 724-01/1	Brasilien	CAM 5. P.
			Feldisolat GB 724-01/2	Vietnam	CAM 6. P.
			Feldisolat GB 724-01/3	Bulgarien	CAM 6. P.
		Pute (<i>Meleagris gallopavo</i>)	Feldisolat GB 724-01/4-18	Brasilien	CAM 2. P.
			Feldisolat GB 134-01	Deutschland	Haut
Columbiformes	Columbidae	Taube (<i>Columba sp.</i>)	Stamm TP-2	Unbekannt	HEF 9. P.
Struthioniformes	Struthidae	Strauß (<i>Struthio camelus</i>)	Stamm Peristin	Unbekannt	Impfstoff Intervet
			Feldisolat Z 125-03	Deutschland	Haut
Falconiformes	Falconidae	Falke (<i>Falco sp.</i>)	Feldisolat GB 724-01/20	Brasilien	CAM 2. P.
			Feldisolat GB 362-02/1-6	V. A. E.	Haut
			Feldisolat GB 405-02/1-4	V. A. E.	Haut
			Feldisolat Falken III/1-4	V. A. E.	Haut
			Feldisolat Z 59-02	Deutschland	Haut
Passeriformes	Carduelidae	Kanarienvogel (<i>Serinus canaria</i>)	Feldisolat Z 95-02	Deutschland	Haut
			Stamm KP-1	Unbekannt	HEF 4. P.
			Stamm KP-1-V557	Unbekannt	Impfstoff Intervet
			Feldisolat GB 724-01/22	Brasilien	CAM 2. P.
			Feldisolat GB 411-02	Unbekannt	Haut
			Feldisolat GB 1007-02	Deutschland	Haut
			Feldisolat GB 1400-02	Deutschland	CAM 2. P.
			Feldisolat HS-DD	Deutschland	Haut
			Feldisolat GB 727-02	Deutschland	Haut
			Feldisolat GB 320-02	Deutschland	CAM 1. P.
Charadriiformes	Burhinidae	Triel (<i>Burhinus oedicnemus</i>)	Feldisolat GB 1115-02	Deutschland	Haut
			Feldisolat GB 1170-02	Deutschland	Haut
			Feldisolat GB 182-98	V. A. E.	CAM 2. P.
Accipitriformes	Accipitridae	Habicht (<i>Accipiter gentilis</i>)	Feldisolat Habicht	Niederlande	Haut
			Isolat ApIII	Deutschland	HEF 2. P.
Psittaciformes	Micropsittidae	Agapornide (<i>Agapornis sp.</i>)		Deutschland	
				Deutschland	

V. A. E.: Vereinte Arabische Emirate, HEF: Hühnerembryofibroblasten, CAM: Chorioallantoismembran, P.: Passage

3.6.2 Untersuchungsablauf

Neben der Diagnostik im Bereich für Wirtschaftsgeflügel (Hühner und Puten) wurde mittels der etablierten FP1/FP2-PCR auch weiteres Probenmaterial untersucht, das von anderen Vogelarten stammte. Das zu untersuchende Probenmaterial wurde wie unter 3.4.3 bis 3.4.6 beschrieben bearbeitet und die extrahierte DNA mittels der FP1/FP2-PCR zum Nachweis von Geflügelpocken untersucht. Von dem Material, in dem FWPV-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte, wurde das PCR-Produkt analog zu 3.4.10 mittels den Endonukleasen *EcoRV* und *NlaIII* untersucht. Zur weiteren Differenzierung wurden zusätzlich die Enzyme *MseI* und *DpnII* angewendet. Die entsprechenden Spaltstellen sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

Tab. 13 Weitere verwendete Endonukleasen und ihre Spaltstellen

Enzym	Spaltstelle (/)
<i>MseI</i>	5'-T/TAA-3'
<i>DpnII</i>	5'-/GATC-3'

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden FP1/FP2-PCR-Produkte der Avipockenviren, wie unter 3.4.11 bis 3.4.13 beschrieben in den pGEM-T-Vektor kloniert und sequenziert. Es wurden zehn Feldisolate von acht verschiedenen Vogelarten sowie die zwei Virusstämme HP-B und TP-2 als jeweiliger Vertreter für das Spaltbild bzw. die Vogelart gewählt. Die ermittelten Sequenzen wurden mittels der Software „MultAlin (www.prodes.toulouse.inra.fr)“ (CORPET, 1988) dargestellt, mit dem Computerprogramm ClustalW (Version 1.8) (HIGGINS et al., 1994) auf ihre Homologiegrade zueinander und zu den veröffentlichten Sequenzen des Abschnittes des Core-Proteins 4b von FWPV (Stamm HP-444, GenBank accession number M25781) und CNPV (Stamm WheatleyC93, GenBank accession number NC_005309) untersucht und phylogenetisch analysiert. Die Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des Programmes „Translate-the Sequence Manipulation Suite (www.ualberta.ca)“ (STOTHARD, 2000) in die entsprechenden Aminosäuresequenzen abgeleitet und anschließend die Homologiegrade untereinander verglichen.