

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der DNS- Isolierung

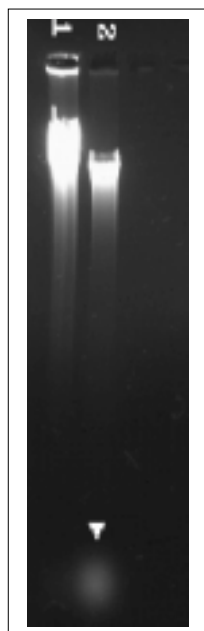
Sowohl mit dem Easy DNA™ Kit, als auch mit dem Puregene DNA Isolation Kit wird DNA nach den unter Pkt. 3.2.3 und Pkt. 3.2.4 beschriebenen Methoden mehrfach aus unterschiedlichen Stämmen von *Bacillus anthracis* isoliert. Beim Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit ist die Ausbeute bei der Isolierung von DNA aus Stämmen von *Bacillus anthracis* aber sehr gering. Die Qualitätskontrollen der mit dem Easy DNA™ Kit, dem Puregene DNA Isolation Kit und dem Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit isolierten DNA-Lösungen führen zu folgenden Ergebnissen:

- Ergebnisse der Konzentration der DNA- Lösungen

Bei der Gewinnung von DNA mit dem Easy DNA™ Kit (s. Pkt. 3.2.3) aus dem wie unter Pkt. 3.2.2 hergestellten Pellet aus einer Reinkultur von den Stämmen A6 bzw. A73 ergeben sich bei 260 nm Wellenlänge gemessene OD- Werte von 0,122 bis 0,188. Das entspricht DNA Konzentrationen von 1,22 µg/µl bis 1,88 µg/µl (s. Pkt. 3.2.6). Bei der Vorschrift 1 zur Gewinnung von DNA mit dem Puregene DNA Isolation Kit (s. Pkt. 3.2.4) aus den Stämmen A6 und A73 ergeben sich Konzentrationen von 470 bis 800 ng/µl (s. Pkt. 3.2.6). Wird die DNA nach der Vorschrift 2 (s. Pkt. 3.2.4) isoliert, so liegen die DNA Konzentrationen ca. doppelt so hoch, 1,2 bis 1,5 µg/µl und bei der Vorschrift 3 (s. Pkt. 3.2.4) beträgt die DNA Konzentration von 470 bis 600 ng/µl. Die Gewinnung von DNA aus dem wie unter Pkt. 3.2.2 hergestellten Pellet aus einer Reinkultur vom Stamm A6 mit dem Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit gelingt trotz mehrfacher Wiederholung nicht. Bei der Gewinnung von DNA aus 1 ml der 6 h Kultur aus einer Reinkultur vom Stamm A6 ergibt sich eine DNA Konzentration von 10 ng/µl und bei der Gewinnung von DNA aus ca. einem Drittel des nach Pkt. 3.2.2 hergestellten Pellets ergibt sich eine DNA Konzentration von 180 ng/µl. Die ermittelten DNA Konzentrationen zeigen, daß die mit dem Easy DNA™ Kit und dem Puregene DNA Isolation Kit erreichte Ausbeute bei der Isolierung von DNA aus *Bacillus anthracis* sehr gut ist.

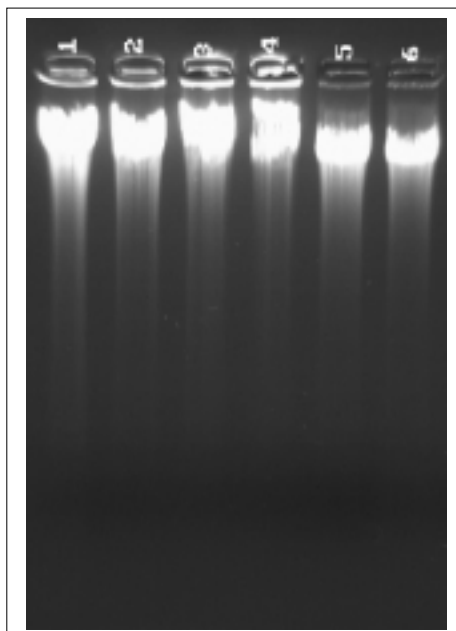
- Ergebnisse der Kontrolle der Intaktheit der DNA

Um festzustellen, ob die DNA während der Präparation teilweise durch Endonukleasen abgebaut wurde, wird sie gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Pkt. 3.2.6). Bei einem Abbau durch Endonukleasen stellt sich die DNA als undeutlich begrenzter, stark nach unten ausgezogener Streifen dar.



1 = A6
2 = A73
▽= RNA

Abbildung 5:
Gelelektrophorese der DNA, die mit dem EASY DNA™ Kit präpariert wurde



1 = A6
2 = A6
3 = Erdprobe
4 = Erdprobe
5 = A23
6 = A23

Abbildung 6: Gelelektrophorese der DNA, die mit dem Puregene DNA Isolation Kit präpariert wurde

Die Abbildung 5 stellt die mit dem Easy DNA™ Kit (s. Pkt. 3.2.3) präparierte DNA dar. Auf der Abbildung 6 ist die mit dem Puregene DNA Isolation Kit (s. Pkt. 3.2.4) präparierte DNA nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel abgebildet (s. Pkt. 3.2.6). Die Banden der DNA sind deutlich begrenzt. Die Konzentration der DNA-Lösung ist aber sehr hoch, so daß das Agarosegel leicht überladen ist. Dadurch sind die Banden der DNA leicht nach unten ausgezogen. Bei der von dem Pfeil angezeigten, kleinen, wolkigen Aufhellung auf der Abbildung 5, handelt es sich um RNA. Bei beiden Präparationsmethoden ist die DNA nicht abgebaut.

- Ergebnisse der Reinheitskontrolle der präparierten DNA- Lösung (s. Pkt. 3.2.6)

Die optische Dichte der DNA- Lösung wird im Spektralphotometer beginnend bei 220 nm bis 300 nm gemessen und in einer Kurve wird der OD Wert gegen die Wellenlänge aufgetragen.

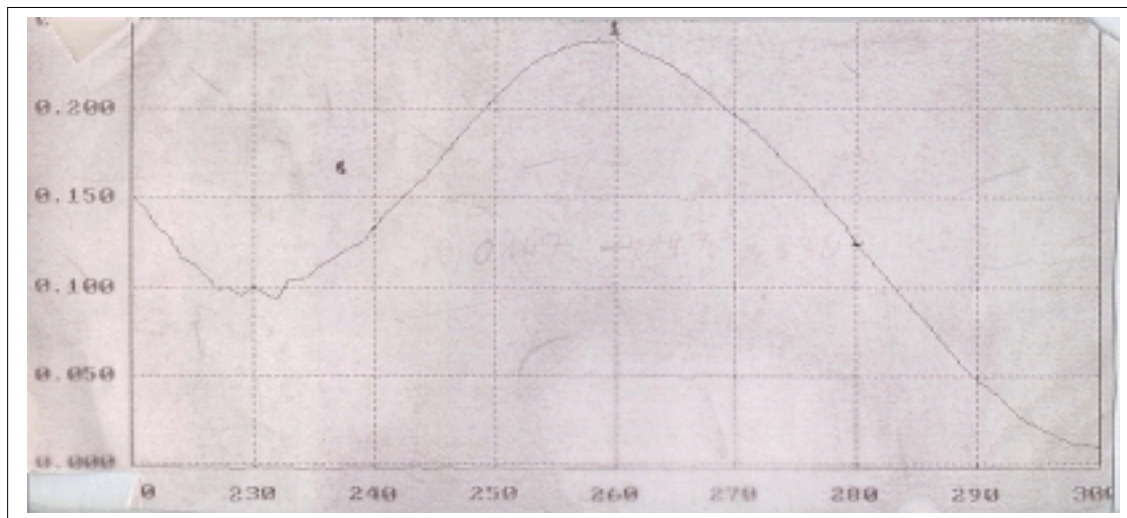


Abbildung 7: Kurve der Absorptionwerte der mit dem Easy DNA™ Kit präparierten DNA vom Stamm A6

Die Absorptionwerte sind auf der X- Achse und die Wellenlängen sind auf der Y- Achse aufgetragen.

$$\begin{aligned} A_{230} &= 0,1 & A_{230} : A_{260} &= 0,42 \\ A_{260} &= 0,239 & A_{280} : A_{260} &= 0,52 \\ A_{280} &= 0,125 & A_{260} : A_{280} &= 1,912 \end{aligned}$$

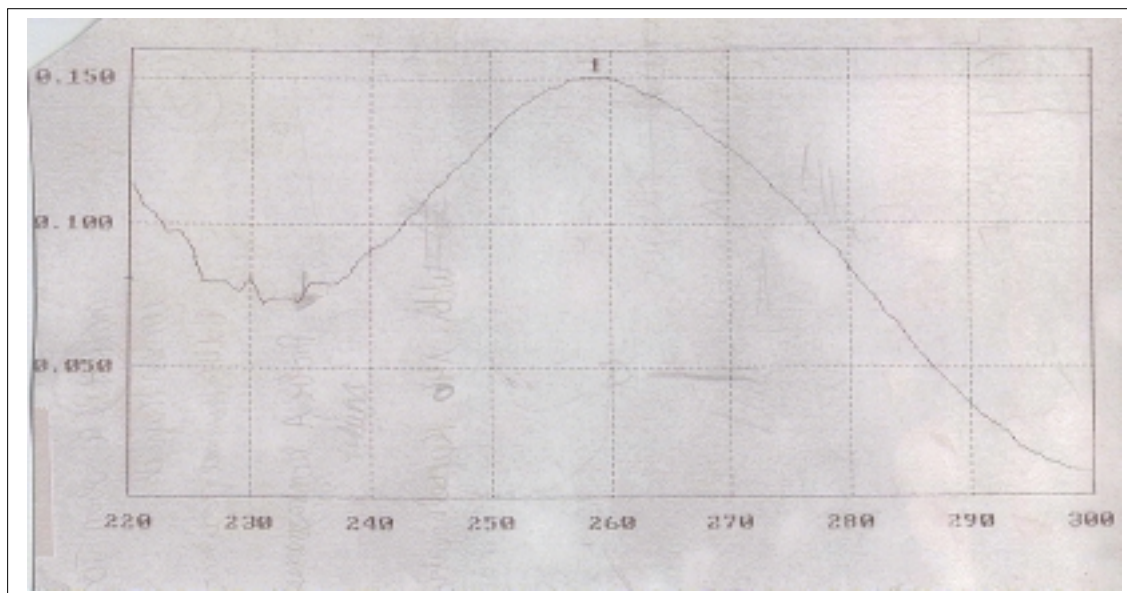


Abbildung 8: Kurve der Absorptionwerte der mit dem Puregene DNA Isolation Kit präparierten DNA vom Stamm A6

Die Absorptionwerte sind auf der X- Achse und die Wellenlängen sind auf der Y- Achse aufgetragen.

$$\begin{aligned} A_{230} &= 0,068 & A_{230} : A_{260} &= 0,45 \\ A_{260} &= 0,151 & A_{280} : A_{260} &= 0,53 \\ A_{280} &= 0,080 & A_{260} : A_{280} &= 1,888 \end{aligned}$$

Die mit beiden Präparationskits präparierte DNA ist sehr rein. Die Quotienten aus den Absorptionwerten A260 und dem A280 Wert liegen zwischen 1,8 und 1,95, die Quotienten aus A230 : A260 liegen unter 0,45 und die Quotienten aus den Werten A280 : A260 liegen unter 0,55.

- Ergebnisse der Untersuchung über das Vorhandensein der nativen Plasmide von *Bacillus anthracis* in der DNA- Lösung

Um festzustellen, ob die mit den beiden Präparationskits hergestellten DNA- Lösungen auch die nativen Plasmide von *Bacillus anthracis* enthalten, werden die DNA- Lösungen bis auf 10 fg pro μl verdünnt und es wird eine nested PCR durchgeführt (s. Pkt. 3.2.6).

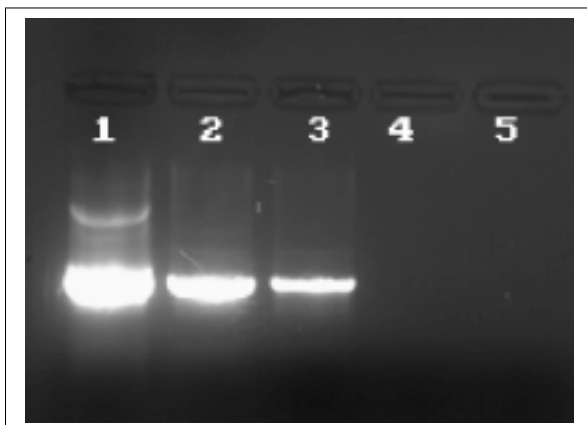


Abbildung 9: Nachweisgrenze der nested PCR für die mit dem Easy DNA Kit präparierte DNA

1 = 10 ng, A6; 2 = 100 fg, A6;
3 = 10 fg, A6; 4 = Negativkontrolle
der 1. PCR; 5 = Negativkontrolle der nested PCR

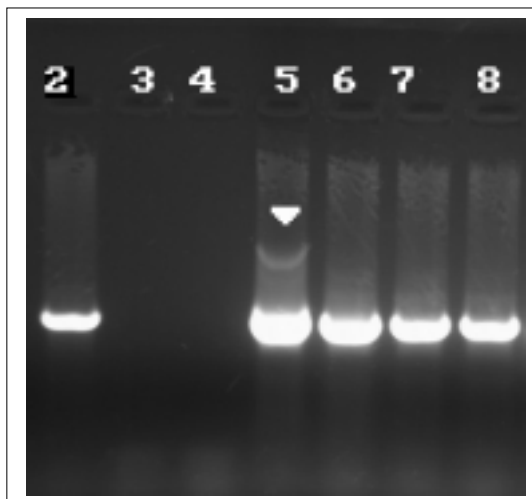


Abbildung 10: Nachweisgrenze der nested PCR für die mit dem Puregene DNA Isolation Kit präparierte DNA

2 = 10 fg, A37; 3 = Negativkontrolle der nested PCR; 4 = Negativkontrolle der 1. PCR; 5 = 10 ng, A6; 6 = 10 pg, A6; 7 = 100 fg, A6; 8 = 10 fg, A6; der Pfeil weist auf eine Bande hin, die bei sehr hohen DNA Konzentrationen erscheint

10 fg DNA des Stammes A6, die entweder mit dem Easy DNA™ Kit oder dem Puregene DNA Isolation Kit präpariert wird, genügen für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit der nested PCR.

4.2 Ergebnisse der Untersuchung über die Reinigung von DNA- Lösungen mit dem Quia quick PCR Spin Purification Kit

Die DNA- Verluste bei der Reinigung der DNA- Lösungen mit dem Quia quick PCR Spin Purification Kit werden mit Hilfe der Konzentrationsbestimmung mittels UV- Absorption und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese untersucht (s. Pkt. 3.2.7):

- Bestimmen der Konzentration der DNA- Lösung vor und nach der Reinigung mit dem QIA quick Spin PCR Purification Kit.

Um festzustellen, ob die bei der Reinigung an eine Säule gebundene DNA auch ausreichend wieder eluiert wird, bzw. wieviel DNA durch die Reinigung verloren geht, wird die Konzentration der DNA- Lösung vor und nach der Reinigung mit der UV- Absorption (s. Pkt. 3.2.7) bestimmt:

Tabelle 4: Konzentrationsbestimmung von DNA- Lösungen vor und nach der Reinigung mit dem Quia quick PCR Spin Purification Kit

DNA von	vor der Reinigung		nach der Reinigung	
	Konz.	Farbe	Konz.	Farbe
A68	25 ng/μl	Klar	10 ng/μl	Klar
A1	135 ng/μl	Klar	80 ng/μl	Klar
Erdprobe 1	130 ng/μl	Trübes grau	25 ng/μl	Klar
Erdprobe 2	545 ng/μl	Klar	270 ng/μl	Klar
Erdprobe 3	1,221 μg/μl	Braun	235 ng/μl	Klar

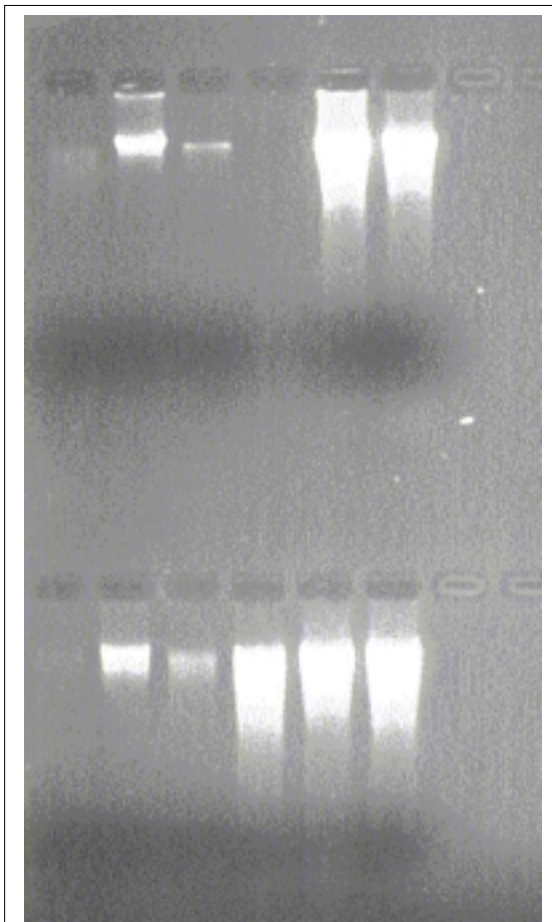
Konz. = Konzentration

Durch die Reinigung der DNA- Lösung mit dem Quia quick PCR Spin Purification Kit geht die mittels UV- Absorption gemessene DNA Konzentration bei klaren DNA- Lösungen um ca. 50 % zurück. Eine grautrübe oder braune DNA- Lösung erscheint nach der Reinigung klar.

- Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA- Lösung vor und nach der Reinigung mit dem QIA quick Spin PCR Purification Kit

Um festzustellen, wieviel DNA durch die Reinigung verloren geht und ob die DNA während der Reinigung beschädigt wird, wird die DNA- Lösung vor und nach der Reinigung gelelektrophoretisch (s. Pkt. 3.2.7) aufgetrennt.

1 2 3 4 5 6 7



In der oberen Hälfte des Gels ist die DNA- Lösung vor der Reinigung aufgetragen und exakt darunter ist sie zum Vergleich nach der Reinigung aufgetragen.

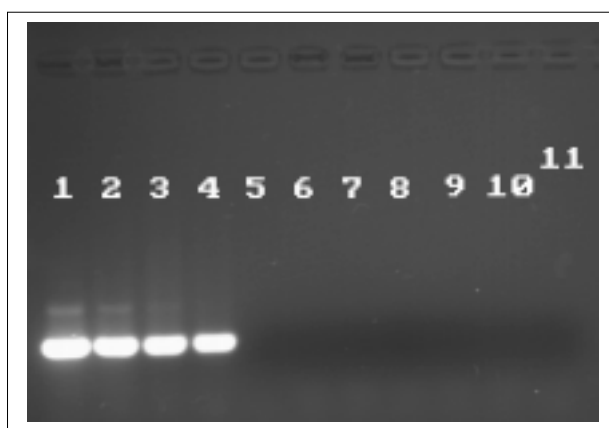
1 = A 68, 2 = A1, 3 = Erdprobe 1, 4 = oben leer, unten Erdprobe 4, 5 = Erdprobe 2, 6 = Erdprobe 3, Zu den Konzentrationen der DNA- Lösungen vor und nach der Reinigung s. Tab. 4. Die Konzentration der Erdprobe 4 wurde nicht bestimmt.

Abbildung 11: Vergleich der DNA- Lösungen vor und nach der Reinigung mit dem Quia quick PCR Purification Kit mit der Agarosegelelektrophorese

Die DNA- Lösung wird durch die Reinigung mit dem Quia quick PCR Spin Purification Kit nicht abgebaut, sie ist auch nach der Reinigung als gut abgegrenzte Bande sichtbar. Die Banden sind vor der Reinigung nur wenig stärker ausgeprägt, als nach der Reinigung. Der Verlust an DNA während der Reinigung ist deutlich unter 50 %.

4.3. Ergebnis des Einsatzes der Uracil- DNA Glykosylase zur Vermeidung von carry-over Kontaminationen

Um die Effizienz des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase beim Abbau von carry-over Kontaminationen beurteilen zu können, wird eine PCR zunächst gezielt künstlich mit dem Produkt einer vorhergehenden PCR kontaminiert. Als Ziel- DNA für die PCR wird eine Verdünnungsreihe des PCR Produktes aus 10 fg DNA eingesetzt (s. Pkt. 3.2.9, Abb. 4). Das Ergebnis der nested PCR wird dargestellt. Es demonstriert die Anfälligkeit der nested PCR gegenüber carry-over Kontaminationen.



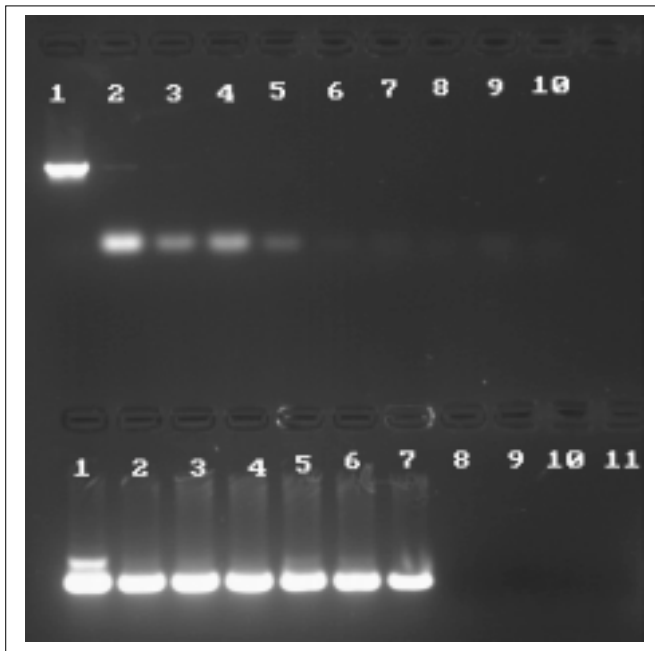
- 1 = Verdünnungsstufe 10^{-1}
- 2 = Verdünnungsstufe 10^{-6}
- 3 = Verdünnungsstufe 10^{-7}
- 4 = Verdünnungsstufe 10^{-8}
- 5 = Verdünnungsstufe 10^{-9}
- 6 = Verdünnungsstufe 10^{-10}
- 7 = Verdünnungsstufe 10^{-11}
- 8 = Verdünnungsstufe 10^{-12}
- 9 = TE- Puffer mit dem die Verdünnungsreihe hergestellt wird, ohne DNA
- 10 = Negativkontrolle der 1. PCR
- 11 = Negativkontrolle der nested PCR

Abbildung 12: Darstellung der künstlichen carry-over Kontamination der nested PCR

Das Produkt der nested PCR ist bis einschließlich der Verdünnungsstufe 10^{-8} nachweisbar.

- Ergebnis für den Abbau der carry-over Kontamination mit der Uracil- DNA Glykosylase

Als Ziel- DNA für die PCR wird eine Verdünnungsreihe des PCR Produktes aus 10 fg DNA eingesetzt. Die Uracil- DNA Glykosylase wirkt vor Ablauf der 1. PCR auf die carry-over Kontamination ein (s. Pkt. 3.2.9, Abb. 4). Das Ergebnis der nested PCR ist dargestellt.



Auf der oberen Hälfte des Gels ist die 1. PCR aufgetragen und auf der unteren Hälfte die nested PCR.

- 1 = 10 ng A41,
- 2 = Verdünnungsstufe 10^{-1}
- 3 = Verdünnungsstufe 10^{-2}
- 4 = Verdünnungsstufe 10^{-3}
- 5 = Verdünnungsstufe 10^{-4}
- 6 = Verdünnungsstufe 10^{-5}
- 7 = Verdünnungsstufe 10^{-6}
- 8 = Verdünnungsstufe 10^{-7}
- 9 = Verdünnungsstufe 10^{-8}
- 10 = Negativkontrolle der 1. PCR
- 11 = Negativkontrolle der nested PCR

Abbildung 13: Abbau der carry- over Kontamination durch die Uracil- DNA Glykosylase

Das Produkt der nested PCR aus dem verdünnten PCR Produkt der 1. PCR ist bis einschließlich der Verdünnungsstufe 10^{-6} nachweisbar. Das PCR Produkt in den Verdünnungsstufen 10^{-7} und 10^{-8} wurde durch die Uracil- DNA Glykosylase abgebaut.

- Ergebnisse des PCR ELISA mit den Verdünnungsstufen, die durch die Uracil- DNA Glykosylase abgebaut werden

Mit den Verdünnungsstufen des PCR Produktes, die in dem wie unter Pkt. 3.2.9 (Abb.4) beschriebenen Versuch durch die Uracil- DNA Glykosylase abgebaut werden, wird der PCR Dig Detection Kit durchgeführt (s. Pkt. 3.2.10.1). Es soll untersucht werden, ob die Uracil- DNA Glykosylase carry- over Kontaminationen in einem Bereich abbaut, der mit dem PCR ELISA nachweisbar ist.

Tabelle 5: Nachweis von carry- over Kontaminationen, die durch den Einsatz der Uracil- DNA Glykosylase verhindert werden können, mit dem PCR ELISA.

Verdünnungsstufe, DNA	Extinktionswerte	
	Nachweis des Toxin- plasmids	
	Wert 1*	Wert 2*
A 68, 1 ng	1,601	1,577
Verd.- st. 10^{-7}	0,070	0,077
Verd.- st. 10^{-8}	0,055	0,046
Negativ	0,060	0,066

Verd.- st. = Verdünnungsstufe,
* s. Pkt.3.2.10

Die Verdünnungsstufen 10^{-7} und 10^{-8} , die von der Uracil- DNA Glykosylase abgebaut werden, sind mit dem PCR Dig Detection Kit nicht nachweisbar.

4.4 Ergebnisse des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis von *Bacillus anthracis*

Der PCR Dig Detection Kit wird routinemäßig in der Diagnostik von Salmonellen aus Lebensmitteln eingesetzt (MEIXNER, 1995).

- Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2 und des Chromosoms von *Bacillus anthracis*

Um festzustellen, wieviel DNA von *Bacillus anthracis* in der PCR mindestens eingesetzt werden muß, um einen positiven Nachweis von *Bacillus anthracis* mit dem PCR Dig Detection Kit zu erreichen, werden folgende Versuche durchgeführt:

Tabelle 6: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1

DNA, Menge	Extinktionswerte							
	1. Versuch Stamm A7		2. Versuch Stamm A7		3. Versuch Stamm A7		4. Versuch Stamm A68	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 ng	1,615	1,477	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
1 pg	1,029	1,144	0,818	0,762	0,858	0,825	0,686	0,538
100 fg	<u>0,303</u>	<u>0,367</u>	<u>0,129</u>	<u>0,127</u>	<u>0,209</u>	<u>0,199</u>	<u>0,223</u>	<u>0,213</u>
10 fg	0,074	0,086	0,040	0,042	n. b.	n. b.	0,066	0,065
Negativ	0,039	0,042	0,035	0,036	0,04	0,036	0,050	0,048

Fortsetzung Tab. 6:

DNA, Menge	Extinktionswerte	
	5. Versuch Stamm A7	
	Wert 1*	Wert 2*
100 fg	<u>0,134</u>	<u>0,122</u>
10 fg	0,063	0,064
Negativ	0,058	0,053

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b.= nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle der PCR; Cut- off = 0,065; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR Dig Detection Kit nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 7: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2

DNA, Menge	Extinktionswerte							
	1. Versuch Stamm A6		2. Versuch Stamm A68		3. Versuch Stamm A68		4. Versuch Stamm A6	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 ng	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	1,096	1,058
1 pg	0,665	0,638	0,635	0,764	0,205	0,234	n. b.	n. b.
100 fg	<u>0,179</u>	<u>0,147</u>	<u>0,097</u>	<u>0,103</u>	<u>0,102</u>	<u>0,111</u>	<u>0,137</u>	<u>0,140</u>
10 fg	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	0,061	0,063	0,045	0,042
Negativ	0,051	0,043	0,039	0,041	0,042	0,040	0,042	0,036

Fortsetzung Tab. 7

DNA, Menge	Extinktionswerte			
	5. Versuch Stamm A7		6. Versuch Stamm A68	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 ng	0,913	1,007	1,442	1,282
1 pg	0,652	0,812	0,336	0,348
100 fg	<u>0,101</u>	<u>0,189</u>	<u>0,131</u>	<u>0,121</u>
10 fg	0,038	0,045	n. b.	n. b.
Negativ	0,042	0,040	0,049	0,048

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b.= nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle der PCR; Cut- off = 0,065; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR Dig Detection Kit nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 8: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis der DNA des Chromosoms

DNA, Menge	Extinktionswerte					
	1. Versuch Stamm A68		2. Versuch Stamm A68		3. Versuch Stamm A68	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
100 pg	0,845	0,975	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
10 pg	0,337	0,346	0,668	0,512	n. b.	n. b.
1 pg	<u>0,121</u>	<u>0,130</u>	<u>0,163</u>	<u>0,176</u>	<u>0,088</u>	<u>0,089</u>
1 pg	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	<u>0,160</u>	<u>0,147</u>
1 pg	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	<u>0,097</u>	<u>0,096</u>
100 fg	0,049	0,055	0,059	0,054	0,042	0,038
Negativ	0,046	0,046	0,053	0,048	0,034	0,036

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b.= nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle der PCR; Cut- off = 0,065; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR Dig Detection Kit nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Die Nachweisgrenze für die DNA des Plasmids pXO1 (s. Tab. 6) und des Plasmids pXO2 (s. Tab. 7) mit dem PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.2.10.1) beträgt 100 fg. Die Nachweisgrenze für die DNA des Chromosom (s. Tab. 8) beträgt 1 pg.

- Ergebnisse nach Kürzung der Inkubationszeiten für das Anti Dig POD- Konjugat und für das ABTS Substrat

Um die Gesamtdauer des PCR Dig Detection Kit zu kürzen, werden die Inkubationszeiten für das Anti Dig POD- Konjugat und für das ABTS Substrat je um die Hälfte gekürzt (s. Pkt. 3.2.10.1).

Tabelle 9: Vergleich zwischen den Werten nach 15 bzw. 30 Min. Inkubation mit dem Anti Dig POD- Konjugat und dem ABTS Substrat

DNA, Menge Stamm A68	Extinktionswerte**							
	Versuchsdurchführung 1*				Versuchsdurchführung 2*			
	15' POD- Konj.		30' POD- Konj.		15' POD- Konj.		30' POD- Konj.	
	15' ABTS	30' ABTS	15' ABTS	30' ABTS	15' ABTS	30' ABTS	15' ABTS	30' ABTS
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 pg	0,091	0,087	0,132	0,118	0,134	0,104	0,186	0,172
1 pg	0,097	0,092	0,139	0,140	0,138	0,119	0,193	0,193
Negativ	0,055	0,052	0,062	0,062	0,052	0,040	0,071	0,06

* = s. Pkt. 3.2.10; ** = Die Werte werden mit dem PCR ELISA für den Nachweis des Chromosoms ermittelt; POD- Konj. = Anti Dig POD- Konjugat; Min. = Minuten; ` = Minuten (Inkubation mit dem); Negativ = Negativkontrolle der PCR; Cut- off = 0,065.

Bei einer Inkubationsdauer von je 30 Minuten mit dem Anti Dig POD Konjugat und 30 Minuten mit dem ABTS Substrat liegen die gemessenen Werte deutlich höher.

- Ergebnisse nach Kürzung der Hybridisierungsdauer

Um die Gesamtdauer des PCR Dig Detection Kit zu kürzen, wird die Hybridisierungsdauer von drei auf 1,5 bzw. eine Stunde gekürzt und mit den Extinktionswerten nach 3 h Hybridisierungsdauer verglichen (s. Pkt. 3.2.10.1).

Tabelle 10: Vergleich zwischen den Werten des PCR ELISA für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 nach 3 h und nach 1,5 h (bzw. 1h) Hybridisierungsdauer

DNA, Menge	Extinktionswerte							
	1. Versuch, A68				2. Versuch, A68			
	Versuchsdurchführung 1*, Hyb.dauer: 1,5 Stunden		Versuchsdurchführung 2*, Hyb.dauer: 3 Stunden		Versuchsdurchführung 1*, Hyb.dauer: 1,5 h		Versuchsdurchführung 2*, Hyb.dauer: 3 h	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
100 ng	1,285	1,322	1,447	1,493	1,733	1,741	1,380	1,329
1 pg	0,246	0,262	0,287	0,274	0,295	0,307	0,210	0,220
100 fg	<u>0,098</u>	<u>0,097</u>	<u>0,091</u>	<u>0,104</u>	<u>0,142</u>	<u>0,194</u>	<u>0,125</u>	<u>0,134</u>
10 fg	0,053	0,056	0,048	0,053	0,071	0,077	0,070	0,073
Negativ	0,056	0,056	0,051	0,047	0,084 ¹	0,098 ¹	0,088 ¹	0,084 ¹

Fortsetzung Tab. 10

DNA, Menge	Extinktionswerte							
	3. Versuch, A68				4. Versuch, A68			
	Versuchsdurchführung 1*, Hyb.dauer: 1,5 Stunden		Versuchsdurchführung 2*, Hyb.dauer: 3 Stunden		Versuchsdurchführung 1*, Hyb.dauer: 1 Stunde		Versuchsdurchführung 2*, Hyb.dauer: 3 Stunden	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
100 pg	0,634	0,591	0,680	0,679	0,977 ²	0,870 ²	1,004 ²	0,92 ²
1 pg	0,313	0,306	0,264	0,217	0,332	0,316	0,304	0,285
100 fg	<u>0,194</u>	<u>0,186</u>	<u>0,190</u>	<u>0,214</u>	<u>0,120</u>	<u>0,178</u>	<u>0,165</u>	<u>0,158</u>
10 fg	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Negativ	0,057	0,054	0,055	0,057	0,054	0,055	0,059	0,057

* = s. Pkt. 3.2.10; ¹ = Die PCR ist kontaminiert; ² = Es werden 10 ng DNA vom Stamm A68 als Template in der PCR eingesetzt; Hyb.dauer = Hybridisierungsdauer; n. b. = nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle der PCR; Cut- off = 0,065; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR Dig Detection Kit nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 11: Werte des PCR ELISA für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 nach 1,5 h Hybridisierungsdauer

DNA, Menge	Extinktionswerte	
	Hyb.dauer: 1,5 h	
	Wert 1*	Wert 2*
10 pg	0,635	0,764
100 fg	<u>0,097</u>	<u>0,103</u>
10 fg	0,038	0,041
Negativ	0,045	0,040

* = s. Pkt. 3.2.10; Hyb.dauer = Hybridisierungsdauer; n. b.= nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle der PCR; Cut- off = 0,065; Für den PCR ELISA werden 60 µl des PCR Produktes verwendet. Die Extinktionswerte werden nach 1 h Hybridisierungsdauer, ohne direkten Vergleich zu den Werten nach 3 h Hybridisierungsdauer bestimmt. Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR Dig Detection Kit nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 12: Vergleich zwischen den Werten des PCR ELISA für den Nachweis der DNA des Chromosoms nach 3 h und nach 1h Hybridisierungsdauer

DNA, Menge	Extinktionswerte						
	1. Versuch			2. Versuch			
	Hybridisierungsdauer 1 h			Versuchsdurchführung 1*		Versuchsdurchführung 2*	
	Wert 1*	Wert 2*		Hybridisierungsdauer 1 h	Hybridisierungsdauer 3 h	Wert 1*	Wert 2*
10 pg	0,533	0,459		n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
1 pg	<u>0,156</u>	<u>0,184</u>		<u>0,147</u>	<u>0,137</u>	<u>0,119</u>	<u>0,121</u>
1 pg	<u>0,102</u>	<u>0,139</u>		<u>0,081</u>	<u>0,076</u>	<u>0,074</u>	<u>0,102</u>
Neg.	0,048	0,043		0,048	0,043	0,045	0,044

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b.= nicht bestimmt; Neg. = Negativkontrolle der PCR; Cut- off = 0,065; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR Dig Detection Kit nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt. Für die Werte der ersten Spalte werden 60 µl des PCR Produktes für den PCR ELISA verwendet. Die Extinktionswerte werden nach 1 h Hybridisierungsdauer ohne direkten Vergleich zu den Werten nach 3 h Hybridisierungsdauer bestimmt.

Nach 1,5 h Hybridisierungsdauer können mit dem PCR ELISA für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2 100 fg DNA von *Bacillus anthracis* nachgewiesen werden (s. Tab. 10 und 11). Bereits nach einer Hybridisierungsdauer von einer Stunde können mit dem PCR ELISA für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 100 fg DNA von *Bacillus anthracis* nachgewiesen werden. Der Nachweis von 1 pg DNA von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA gelingt nach einer Hybridisierungsdauer von einer Stunde (s. Tab. 12).

- Ergebnisse für die Durchführung eines PCR ELISA aus einer PCR im Volumen von fünfzig Mikroliter

Um die Kosten für den PCR ELISA zu senken, wird die PCR im Volumen von 50 µl statt im Volumen von 100 µl durchgeführt (s. Pkt. 3.2.10.1):

Tabelle 13: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit aus einer PCR im Volumen von 50 µl

DNA, Menge	Extinktionswerte					
	1. Versuch		2. Versuch		3. Versuch	
	Nachweis des Plasmids pXO2, Stamm A6		Nachweis des Plasmids pXO2, Stamm A6		Nachweis des Plasmids pXO1, Stamm A37	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 pg	n. b.	n. b.	0,439	0,514	0,305	0,288
<u>100 fg</u>	<u>0,118</u>	<u>0,122</u>	<u>0,103</u>	<u>0,103</u>	<u>0,131</u>	<u>0,138</u>
10 fg	0,072	0,070	0,080	0,069	0,068	0,064
Neg.	0,043	0,048	0,054	0,054	0,055	0,054

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; neg. = Negativkontrolle der PCR; Cut-off = 0,067; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR Dig Detection Kit nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Die Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kits für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2 aus einer PCR im Volumen von 50 µl beträgt 100 fg DNA.

- Ergebnisse der Überprüfung von Erdproben auf das Vorhandensein von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA und der nested PCR

Die Ergebnisse der Überprüfung von Erdproben auf das Vorhandensein von *Bacillus anthracis*, die mit der nested PCR (s. Pkt. 3.2.8.3) gewonnen werden, werden mit den Ergebnissen des PCR ELISA (s. Pkt. 3.2.10.1) verglichen.

Tabelle 14: Vergleich zwischen der nested PCR und dem PCR ELISA anhand von Erdproben, die auf das Vorhandensein von *Bacillus anthracis* überprüft werden.

Pr.- Nr.	Nachweis des Plasmids pXO1				Nachweis des Plasmids pXO2				Nachweis des Chromosoms***		
	Extinktions- werte		ELI SA **	n. PCR	Extinktions- werte		ELI SA **	n. PCR	Extinktions- werte		ELI SA **
	Wert 1*	Wert 2*			Wert 1*	Wert 2*			Wert 1*	Wert 2*	
1	0,055	0,058	-	(+)	0,037	0,040	-	-	0,05	0,055	-
2	1,405	1,570	+	+	0,039	0,038	-	+	1,425	1,280	+
3	1,592	1,519	+	+	0,087	0,076	(+)	+	1,367	1,306	+
4	0,268	0,290	+	+	0,180	0,156	+	+	1,464	1,524	+
5	0,049	0,051	-	(+)	0,049	0,045	-	-	0,060	0,059	-
6	1,214	1,287	+	+	0,047	0,033	-	-	1,459	1,392	+
7	1,141	1,234	+	+	0,039	0,037	-	-	0,727	0,702	+
8	0,163	0,152	+	+	0,037	0,037	-	-	0,920	0,980	+
9	1,742	1,717	+	+	0,049	0,046	-	-	1,120	1,046	+
10	0,048	0,054	-	(+)	0,050	0,046	-	-	0,837	0,889	+
11	0,323	0,279	+	+	0,108	0,112	+	+	0,837	0,909	+
12	0,094	0,091	+	+	0,056	0,048	-	+	1,026	1,096	+
n. E.	0,048	0,060	-	-	0,050	0,040	-	-	0,760	0,700	+
Neg.	0,051	0,046	-	-	0,047	0,038	-	-	0,059	0,063	-

Pr.- Nr. = Probennummer; (+) = der PCR ELISA oder die nested PCR ist schwach positiv (die Bande der nested PCR ist gerade eben sichtbar); n. E. = negative Erdprobe als Kontrolle über die DNA Präparation; Neg. = Negativkontrolle der PCR; * = s. Pkt. 3.2.10; ** PCR Dig Detection Kit, s. Pkt. 3.2.10.2; *** Ein Vergleich mit den Ergebnissen der nested PCR ist für den Nachweis der chromosomalen DNA nicht möglich, da für den Nachweis der DNA des Chromosoms keine inneren Primer existieren; Cut-off = 0,065

Für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 sind die Proben 1, 5 und 10 in der nested PCR schwach positiv (eine Bande in Höhe der Positivkontrolle ist gerade eben sichtbar). Die Proben 1, 5 und 10 sind im PCR ELISA negativ. Die Proben 2 und 12 sind für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 im PCR ELISA negativ und in der nested PCR positiv. Für den Nachweis der DNA des Chromosoms mit dem PCR ELISA sind die Probe 10 und die negative Erdprobe positiv. Die negative Erdprobe und die Probe 10 sind jedoch negativ für den Nachweis der Plasmide pXO1 und pXO2 mit dem PCR Dig Detection Kit (Probe 10 ist schwach positiv für den Nachweis des Plasmids pXO1 mit der nested PCR). Für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2 und für den Nachweis von Sequenzen des des Chromosoms sind die Proben 3, 4 und 11 in beiden Nachweisverfahren (PCR ELISA und nested PCR) positiv. Beim Nachweis von *Bacillus anthracis* mit der nested PCR sind alle Erdproben (1- 12) positiv. Beim Nachweis von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA sind die Proben 1 und 5 negativ.

4.5 Ergebnisse des Vergleichs zwischen dem PCR Dig Detection Kit und dem PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD

Um festzustellen, ob der Nachweis von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD sensitiver ist, als der Nachweis mit dem PCR Dig Detection Kit, wird folgender Versuch durchgeführt (s. Pkt. 3.2.10.2):

Tabelle 15: Vergleich der Sensitivität des PCR Dig Detection Kit mit dem PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD

DNA, Menge	1. Versuch, Nachweis des Plasmids pXO1, Stamm A37							
	Versuchsdurchführung 1*, Ex-tinktionswerte		Versuchsdurchführung 2*, relative Einheiten					
	30 Minuten Inkubation mit ABTS		10 Minuten Inkubation mit CSPD		15 Minuten Inkubation mit CSPD		45 Minuten Inkubation mit CSPD	
Ablesezeitpunkt	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
100 ng	Over	Over	823,29	775,00	845,79	806,50	960,90	909,09
1 pg	1,602	1,602	243,2	222,60	256,70	233,10	305,89	279,29
100 fg	0,243	0,305	49,79	38,36	53,01	41,27	68,54	55,44
10 fg	0,078	0,094	4,312	4,3960	4,63	4,8	5,948	6,042
Neg. ^c	0,072 ^c	0,074 ^c	3,964 ^c	3,426 ^c	4,29 ^c	3,79 ^c	5,59 ^c	5,192 ^c

Fortsetzung Tab. 15

DNA, Menge	2. Versuch, Nachweis des Plasmids p XO1, Stamm A37								
	Versuchsdurch- führung 1*, Extinktionswerte			Versuchsdurchführung 2*, relative Einheiten					
Ablese- zeit- punkt	30 Minuten Inkubation mit ABTS		10 Minuten Inkubation mit CSPD		15 Minuten Inkubation mit CSPD		45 Minuten Inkubation mit CSPD		
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	
10 ng	1,476	1,325	302,7	267,98	358,79	289,96	463,79	416,80	
1 pg	0,284	0,305	18,67	27,67	25,050	33,360	37,80	44,44	
100 fg	<u>0,116</u>	<u>0,115</u>	<u>3,304</u>	<u>4,21</u>	<u>4,547</u>	<u>5,3080</u>	<u>7,5</u>	<u>8,048</u>	
10 fg	0,057	0,043	0,443	0,3650	0,4940	0,4700	0,843	0,716	
Neg.	0,052	0,051	0,320	0,5690	0,3810	0,6390	0,630	1,010	

* = s. Pkt. 3.2.10; ' = die PCR ist kontaminiert; Neg. = Negativkontrolle der PCR; Cut- off für den PCR Dig Detection Kit = 0,065; Cut- off für den PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD nach 15 Minuten Inkubation = 0,808; Over = die Extinktionswerte liegen außerhalb des oberen Meßbereichs des ELISA Readers; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Der PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD ist nicht sensitiver als der PCR Dig Detection Kit. Die Nachweisgrenze für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 mit dem PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD beträgt 100 fg.

4.6 Ergebnisse des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis von *Bacillus anthracis*

Der PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat ist für den Nachweis von *Bacillus anthracis* geeignet (s. Pkt. 3.2.10.3).

- Ergebnis der Versuche zur optimalen Lagerungstemperatur für die Substratlösung

Soll die Substratlösung längere Zeit gelagert werden, so schwanken die Negativwerte (Untergrundwerte) je nach den Bedingungen für die Temperatur und die Dauer der Lagerung sehr stark. Um die optimale Lagerungstemperatur für die Substratlösung zu ermitteln, werden Substratlösungen, die je 3 Tage bei Raumtemperatur, bei 4- 8 °C oder bei -80°C gelagert wurden, miteinander verglichen (s. Pkt. 3.2.10.3).

Tabelle 16: Bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerte Substratlösungen werden direkt auf die Mikrottestplatte aufgetragen

Tempera- turen	Relative Fl.- Einheiten			
	Direkt gem.		Nach 2,5 h gem.	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
20°C	0,993	0,968	1,088	1,026
4°-8°C	0,699	0,677	0,742	0,698
-80°C	0,622	0,627	0,660	0,655

* = Es werden stets 2 Vertiefungen der Mikrottestplatte mit je 200 µl der unterschiedlich gelagerten Substratlösungen gefüllt; Fl.- Einheiten = Fluoreszenzeinheiten; direkt gem. = sofort nach Eintragen des

Substrates in die Vertiefung der Mikrottestplatte werden die Werte gemessen; nach 2,5 h gem. = für 2,5 h wird die Mikrottestplatte mit der Substratlösung bei 37 °C im Dunkeln auf dem Mikrottestplattenschwenker gelagert, danach werden die Werte erneut abgelesen

Tabelle 17: PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat mit unterschiedlich gelagerten Substratlösungen

Relat. Fluoreszenz-Einheiten*		Lagerung bei
Pos.	Neg.	
9,999	2,409	20 °C
9,999	2,145	4- 8 °C
9,999	1,871	-80 °C

Pos = Positivwert, * = 10 ng DNA vom Stamm A 68 werden als Template in die PCR eingesetzt; Neg. = Negativwert; Relat. = Relative

Die Substratlösung ist bei der Lagerung bei – 80 °C länger haltbar, die Negativwerte sind bei dieser Lagerungstemperatur am niedrigsten.

- Ergebnis der Untersuchung über die optimale Dauer der Inkubationszeit der Substratlösung auf der Mikrottestplatte bis zum Ablesezeitpunkt

Es soll getestet werden, ob eine verlängerte Inkubation mit der Substratlösung zu einer Senkung der Nachweisgrenze für das Plasmid pXO2 führt (s. Pkt. 3.2.10.3).

Tabelle 18: Auswertung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nach 30 Minuten und nach 18 Stunden Inkubation mit der Substratlösung.

DNA, Menge, A6	relative FL.- Einheiten			
	30 Minuten Inkubation		18 h Inkubation	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 pg	5,324	5,716	9,999	9,999
10 fg	1,333	1,790	2,209	2,843
Negat.	1,904	1,855	3,142	2,953

* = s. Pkt. 3.2.10; FL.- Einheiten = Fluoreszenzeinheiten; Negat. = Negativkontrolle der PCR; Cut- off (nach 30 Minuten Inkubation) = 1,899

Auch nach 18 Stunden Inkubation mit der Substratlösung sind 10 fg DNA von *Bacillus anthracis* für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 nicht nachweisbar. Um die optimale Inkubationsdauer mit der Substratlösung für die Auswertung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat zu ermitteln, werden die Ergebnisse alle 15 Minuten abgelesen (s. Pkt.3.2.10.3):

Tabelle 19: Extinktionswerte des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit der Substratlösung.

DNA, Menge	relative Fluoreszenz- Einheiten*									
	15 Minuten Inkubation		30 Minuten Inkubation		45 Minuten Inkubation		60 Minuten Inkubation		1 h 15 Min. Inkubation	
	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]
100 pg	7,208	7,176	9,999	9,999	9,999	9,999	9,999	9,999	9,999	9,999
10 pg	<u>2,775</u>	<u>2,797</u>	4,030	3,987	5,240	5,207	6,143	6,011	6,880	6,742
1 pg	1,721	1,612	<u>2,040</u>	<u>1,895</u>	<u>2,390</u>	<u>2,185</u>	<u>2,635</u>	<u>2,392</u>	<u>2,824</u>	<u>2,603</u>
Negat.	1,242	1,268	1,279	1,248	1,312	1,283	1,284	1,241	1,267	1,239

Fortsetzung Tab. 19

DNA, Menge, A6	relative Fluoreszenz- Einheiten*							
	1 h 30 Min. Inkubation		1 h 45 Min. Inkubation		2 h Inkubation		18 h Inkubation	
	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]	Wert 1 [‘]	Wert 2 [‘]
100 pg	9,999	9,999	9,999	9,999	9,999	9,999	9,999	9,999
10 pg	7,430	7,368	8,125	7,922	8,848	8,861	9,999	9,999
1 pg	<u>3,003</u>	<u>2,732</u>	<u>3,175</u>	<u>2,888</u>	<u>3,396</u>	<u>3,040</u>	<u>8,177</u>	<u>7,236</u>
Negat.	1,274	1,231	1,249	1,209	1,257	1,211	2,021	1,971

* Die Untersuchung wird am Beispiel des Nachweises für das Chromosom durchgeführt; [‘] = s. Pkt. 3.2.10; Min. = Minuten; Negat. = Negativkontrolle der PCR; Cut- off (nach 30 Minuten Inkubation) = 1,305; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt

Bereits nach 30 Minuten Inkubation mit der Substratlösung können 1 pg chromosomaler DNA nachgewiesen werden.

- Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2 und für den Nachweis der DNA des Chromosoms von *Bacillus anthracis*

Um festzustellen, wieviel DNA von *Bacillus anthracis* in der PCR mindestens eingesetzt werden muß, um einen positiven Nachweis mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat zu erreichen, werden folgende Versuche durchgeführt:

Tabelle 20: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1.

DNA, Menge	Relative Fluoreszenz- Einheiten			
	1. Versuch, Stamm A 68		2. Versuch, Stamm A 68	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 pg	n. b.	n. b.	9,618	8,410
100 fg	3,266	3,417	n. b.	n. b.
10 fg	<u>2,308</u>	<u>2,226</u>	<u>2,306</u>	<u>2,283</u>
Negat.	1,567	1,520	1,705	1,723

* =s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; Negat. = Negativkontrolle; Cut- off = 1,725; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt

Tabelle 21: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2

DNA, Menge	relative Fluoreszenz- Einheiten					
	1. Versuch, Stamm A6		2. Versuch, Stamm A6		3. Versuch, Stamm A6,	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 pg	n. b.	n. b.	2,565	2,099	2,210	2,757
100 fg	<u>1,599</u>	<u>1,606</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
100 fg	<u>1,515</u>	<u>1,484</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
100 fg	<u>1,441</u>	<u>1,463</u>	<u>1,610</u>	<u>1,568</u>	<u>1,533</u>	<u>1,675</u>
10 fg	1,247	1,249	n. b.	n. b.	1,123	1,200
Negat.	1,119	1,226	1,149	1,212	1,171	1,138

* =s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; Negat. = Negativkontrolle; Cut- off = 1,255; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 22: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis der DNA des Chromosoms

DNA, Menge	relative Fluoreszenz- Einheiten					
	1. Versuch Stamm A6		2. Versuch Stamm A6		3. Versuch Stamm A6	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
100 pg	n. b.	n. b.	9,999	9,999	n. b.	n. b.
10pg	n. b.	n. b.	4,030	3,987	3,832	3,977
1pg	<u>1,760</u>	<u>2,028</u>	<u>2,040</u>	<u>1,895</u>	<u>1,720</u>	<u>1,554</u>
1pg	<u>2,088</u>	<u>2,250</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
1pg	<u>1,980</u>	<u>2,072</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Negat.	1,189	1,218	1,242	1,268	1,232	1,180

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; Negat. = Negativkontrolle; Cut- off = 1,255; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Die Nachweisgrenze für die DNA des Plasmids pXO1 (s. Tab. 20) mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat beträgt 10 fg. Für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 (s. Tab. 21) mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat beträgt die Nachweisgrenze 100 fg. Die Nachweisgrenze für die DNA des Chromosoms (s. Tab. 22) beträgt 1 pg.

- Ergebnisse des Vergleichs zwischen einer alternativen Vorschrift (Vorschrift 2) zur Durchführung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat und der unter Pkt. 3.2.10.3 beschriebenen Vorschrift 1

Aus einer PCR im Volumen von 100 µl werden je 40 µl für die Durchführung von zwei unterschiedlichen PCR ELISA entnommen (Versuchsdurchführung 1 und 2). Die Ergebnisse des PCR ELISA werden auf diese Weise nicht durch die PCR, sondern nur von der Durchführung der unterschiedlichen PCR ELISA beeinflusst. Die Versuchsdurchführung 1 richtet sich nach der Vorschrift 1 und die Versuchsdurchführung 2 richtet sich nach der Vorschrift 2 (s. Pkt. 3.2.10.3).

Tabelle 23: Vergleich zwischen der Vorschrift 1 und der Vorschrift 2 für die Durchführung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat

DNA, Menge, A68	Relative Fluoreszenz- Einheiten**			
	Versuchsdurchführung 1*		Versuchsdurchführung 2*	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 ng	9,999	9,999	9,999	8,909
100 fg	3,250	3,113	3,289	3,269
10 fg	<u>3,086</u>	<u>2,577</u>	<u>3,102</u>	<u>2,894</u>
Neg.	1,9911	2,089	2,601	2,497

* = s. Pkt. 3.2.10; ** Der Vergleich wird für den Nachweis des Plasmids pXO1 durchgeführt; Negat. = Negativkontrolle; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Mit beiden Vorschriften zur Durchführung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat können 10 fg DNA von *Bacillus anthracis* nachgewiesen werden (für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1). Die Negativwerte bei Durchführung des PCR ELISA nach der Vorschrift 1 (s. Pkt. 3.2.10.3) sind niedriger, als bei der Vorschrift 2.

- Ergebnisse des Vergleichs zwischen dem PCR Dig Detection Kit und dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat

Um festzustellen, ob der Nachweis von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat sensitiver ist, als der Nachweis mit dem PCR Dig Detection Kit, wird folgender Versuch durchgeführt (s. Pkt. 3.2.10.3):

Tabelle 24: Vergleich der Sensitivität des PCR Dig Detection Kit mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat.

DNA, Menge	1. Versuch**, Stamm A68				2. Versuch**, Stamm A68			
	Versuchsdurchführung 1*, Extinktionswerte		Versuchsdurchführung 2*, relat. Fluoreszenz-Einheiten		Versuchsdurchführung 1*, Extinktionswerte		Versuchsdurchführung 2*, relat. Fluoreszenz-Einheiten	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
100 fg	<u>0,218</u>	<u>0,212</u>	<u>3,377</u>	<u>3,048</u>	<u>0,218</u>	<u>0,212</u>	<u>2,081</u>	<u>2,363</u>
10 fg	0,066	0,067	1,652	1,560	0,066	0,067	1,652	1,560
Neg.	0,050	0,046	1,679	1,632	0,050	0,046	1,679	1,632

* = s. Pkt. 3.2.10; ** Der Vergleich wird für den Nachweis des Plasmids pXO1 durchgeführt; Neg. = Negativkontrolle; relat. = relative; Cut- off für den PCR Dig Detection Kit = 0,067; Cut- off für den PCR ELISA mit dem Fluoreszenzgerät = 1,725; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Mit beiden Vorschriften zur Durchführung des PCR ELISA können 100 fg DNA von *Bacillus anthracis* nachgewiesen werden (für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1). Bei Einsatz von 10 fg DNA von *Bacillus anthracis* ist der Nachweis mit beiden PCR ELISA negativ.

4.7 Ergebnisse des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatte gebundenen Sonden

Der PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatten gebundenen Sonden ist für den Nachweis von *Bacillus anthracis* geeignet (s. Pkt. 3.2.10.4).

- Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatten gebundenen Sonden für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2 und für den Nachweis der DNA des Chromosoms von *Bacillus anthracis*

Um festzustellen, wieviel DNA von *Bacillus anthracis* in der PCR mindestens eingesetzt werden muß, um einen positiven Nachweis mit dem PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatten gebundenen Sonden zu erreichen, werden folgende Versuche durchgeführt (s. Pkt. 3.2.10.4):

Tabelle 25: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatten gebundenen Sonden für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1

DNA, Menge, A68	Extinktionswerte					
	1. Versuch		2. Versuch		3. Versuch	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
10 ng	1,008	0,961	0,927	0,954	1,080	1.117
100 fg	<u>0,162</u>	<u>0,179</u>	<u>0,110</u>	<u>0,090</u>	<u>0,146</u>	<u>0,154</u>
10 fg	n. b.	n. b.	0,063	0,065	0,060	0,056
Negativ	0,049	0,054	0,047	0,052	0,052	0,049

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle; Cut- off = 0,073; die kovalent mit den Sonden beschichteten Mikrotestplatten werden nicht länger als 10 Tage bei – 20 ° C gelagert; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatte gebundenen Sonden nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 26: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatten gebundenen Sonden für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2

DNA, Menge	Extinktionswerte			
	1. Versuch		2. Versuch	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
10 ng A41	1,333	1,351	1,113	1,098
<u>100 fg A38</u>	<u>0,117</u>	<u>0,114</u>	<u>0,127</u>	<u>0,133</u>
<u>100 fg A38</u>	<u>0,134</u>	<u>0,147</u>	<u>0,115</u>	<u>0,123</u>
10fg A38	0,070	0,081	0,072	0,070
Negativ	0,073	0,071	0,069	0,072

* = s. Pkt. 3.2.10; Negativ = Negativkontrolle; Cut- off = 0,073; die kovalent mit den Sonden beschichteten Mikrotestplatten werden nicht länger als 10 Tage bei – 20 ° C gelagert; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatte gebundenen Sonden nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 27: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrottestplatten gebundenen Sonden für den Nachweis der DNA des Chromosoms

DNA, Menge, A68	Extinktionswerte			
	1. Versuch		2. Versuch	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
10 pg	0,239	0,185	0,207	0,190
<u>1 pg</u>	<u>0,107</u>	<u>0,092</u>	<u>0,118</u>	<u>0,109</u>
<u>1 pg</u>	<u>0,170</u>	<u>0,142</u>	n. b.	n. b.
<u>1 pg</u>	<u>0,127</u>	<u>0,110</u>	n. b.	n. b.
<u>1 pg</u>	<u>0,135</u>	<u>0,112</u>	n. b.	n. b.
<u>1 pg</u>	<u>0,110</u>	<u>0,112</u>	n. b.	n. b.
100 fg	0,070	0,060	0,066	0,059
Negativ	0,065	0,059	0,062	0,049

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle; Cut-off = 0,073; die kovalent mit den Sonden beschichteten Mikrottestplatten werden nicht länger als 10 Tage bei -20°C gelagert; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit kovalent an die Mikrottestplatte gebundenen Sonden nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Die Nachweisgrenze für die DNA des Plasmids pXO1 (s. Tab. 25) und des Plasmids pXO2 (s. Tab. 26) mit dem PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden (s. Pkt. 3.2.10.4) beträgt 100 fg. Die Nachweisgrenze für die DNA des Chromosoms (s. Tab. 27) beträgt 1 pg.

- Ergebnisse des Vergleichs zwischen dem PCR Dig Detection Kit und dem PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden

Um festzustellen, ob der Nachweis von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden sensitiver ist, als der Nachweis mit dem PCR Dig Detection Kit, wird folgender Versuch durchgeführt (s. Pkt. 3.2.10.4):

Tabelle 28: Vergleich der Sensitivität des PCR Dig Detection Kit mit dem PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden

DNA, Menge A25	Extinktionswerte**							
	1. Versuch ¹				2. Versuch ²			
	Versuchsdurchführung 1 *		Versuchsdurchführung 2 *		Versuchsdurchführung 1 *		Versuchsdurchführung 2 *	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
100 ng	1,7	1,628	1,335	1,355	1,687	1,491	1,422	1,376
100 ng	1,785	1,623	1,321	1,307	1,594	1,608	1,515	1,496
100 fg	<u>0,176</u>	<u>0,110</u>	<u>0,121</u>	<u>0,100</u>	<u>0,172</u>	<u>0,144</u>	<u>0,142</u>	<u>0,130</u>
Negat.	0,055	0,051	0,056	0,048	0,041	0,056	0,041	0,056

* = s. Pkt. 3.2.10; Versuchsdurchführung 1 = PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.2.10.1); Versuchsdurchführung 2 = PCR ELISA mit kovalent gebundenen Fängersonden (s. Pkt. 3.2.10.4); ** Die Extinktionswerte werden für den Nachweis des Plasmids pXO1 ermittelt; Negat. = Negativkontrolle; Cut-off = 0,073; ¹ Die kovalent mit den Sonden beschichtete Mikrottestplatte wird 4 Tage bei -20°C gelagert; ² Die kovalent mit den Sonden beschichtete Mikrottestplatte wird 3 Wochen bei -20°C gelagert; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Mit beiden Vorschriften zur Durchführung des PCR ELISA können 100 fg DNA von *Bacillus anthracis* nachgewiesen werden (für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1).

- Ergebnisse des Vergleichs zwischen einer alternativen Vorschrift (Vorschrift 2) zur Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden und der unter Pkt. 3.2.10.4 beschriebenen Vorschrift 1

Im Unterschied zur Vorschrift 1 werden in der Vorschrift 2 möglichst wenig Reaktionspuffer des PCR Dig Detection Kit verwendet. Um festzustellen, ob der PCR ELISA nach der Vorschrift 2 die gleiche Sensitivität besitzt, wie bei der Vorschrift 1, wird folgender Versuch durchgeführt:

Tabelle 29: Vergleich zwischen der Vorschrift 1 und der Vorschrift 2 für die Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden

DNA, Menge	Extinktionswerte**							
	1. Versuch				2. Versuch			
	Versuchsdurchführung 1*, Vorschrift 1		Versuchsdurchführung 2*, Vorschrift 2		Versuchsdurchführung 1*, Vorschrift 1		Versuchsdurchführung 2*, Vorschrift 2	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
10 ng A24	1,707	1,460	1,089	1,121	1,520	1,442	1,236	1,268
1 ng A25	0,911	0,957	0,749	0,710	0,995	1,004	0,749	0,710
100 fg A22	<u>0,184</u>	<u>0,157</u>	0,105	0,115	<u>0,166</u>	<u>0,138</u>	0,104	0,095
Negativ	0,093	0,098	0,098	0,103	0,099	0,093	0,095	0,093

* = s. Pkt. 3.2.10; ** Die Extinktionswerte werden für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 ermittelt; Negativ = Negativkontrolle; Cut-off = 0,073; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA mit kovalent an die Mikrottestplatte gebundenen Sonden nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Bei Durchführung der Vorschrift 1 des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden liegen die Meßwerte höher. Zwischen den Extinktionswerten der Negativkontrolle und den Extinktionswerten für den Nachweis von 100 fg DNA besteht bei der Vorschrift 2 im Unterschied zur Vorschrift 1 nur ein minimaler Unterschied. 100 fg DNA sind mit dem PCR ELISA nach der Vorschrift 2 nicht mehr nachweisbar.

- Ergebnisse des Vergleichs zwischen einer alternativen Vorschrift (Vorschrift 3) zur Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden und der unter Pkt. 3.2.10.4 beschriebenen Vorschrift 1

Eine Alternative zur Vorschrift 1 stellt die Vorschrift 3 dar. Bei der Vorschrift 3 hybridisiert das denaturierte PCR Produkt wie bei der Vorschrift 1 im Volumen von 200 µl an die Oberfläche der Mikrottestplatte, wobei auf die Verwendung der Reaktionspuffer des PCR Dig Detection Kit weitgehend verzichtet wird. Um festzustellen, ob die Extinktionswerte des PCR ELISA nach der Vorschrift 3 im gleichen Bereich liegen, wie bei der Vorschrift 1, werden die Ergebnisse der beiden PCR ELISA, die nach den Vorschriften 1 oder 3 durchgeführt werden, miteinander verglichen.

Tabelle 30: Vergleich zwischen der Vorschrift 1 und der Vorschrift 3 für die Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden

DNA, Menge	Extinktionswerte**							
	1. Versuch				2. Versuch			
	Versuchsdurchführung 1*, Vorschrift 1		Versuchsdurchführung 2*, Vorschrift 3		Versuchsdurchführung 1*, Vorschrift 1		Versuchsdurchführung 2*, Vorschrift 3	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
A22, 10 ng	1,829	1,742	0,948	1,029	1,788	1,750	1,011	0,978
A22, 1 ng	1,246	1,479	0,640	0,640	1,489	1,379	0,709	0,646
A22, 1 ng	1,552	1,614	0,879	0,728	1,511	1,597	0,840	0,655
Negativ	0,111	0,100	0,097	0,098	0,101	0,095	0,100	0,098

* = s. Pkt. 3.2.10; ** Die Extinktionswerte werden für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 ermittelt; Negativ = Negativkontrolle; Cut- off = 0,073

Bei Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden nach der Vorschrift 3 sind die Extinktionswerte deutlich geringer als die Extinktionswerte, die mit dem PCR ELISA nach der Vorschrift 1 gemessen werden.

4.8 Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ verstärkt wird

Um festzustellen, wieviel DNA von *Bacillus anthracis* in der PCR mindestens eingesetzt werden muß, um einen positiven Nachweis mit dem PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ verstärkt wird, zu erreichen, werden folgende Versuche durchgeführt (s. Pkt. 3.2.10.5):

Tabelle 31: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ verstärkt wird, für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 (Meßfilter: 492 nm, Referenzfilter: 650 nm)

DNA, Menge	Extinktionswerte					
	1. Versuch, A41		2. Versuch, A42		3. Versuch, A42	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
10 ng	1,069	1,077	1,244	1,199	1,127	1,199
100 fg	n. b.	n. b.	0,713	0,702	0,729	0,686
<u>10 fg</u>	<u>0,386</u>	<u>0,294</u>	<u>0,427</u>	<u>0,510</u>	<u>0,603</u>	<u>0,542</u>
<u>10 fg</u>	<u>0,229</u>	<u>0,263</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<u>10 fg</u>	<u>0,297</u>	<u>0,364</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<u>10 fg</u>	<u>0,462</u>	<u>0,440</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<u>10 fg</u>	<u>0,479</u>	<u>0,383</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Negativ	0,058	0,068	0,062	0,071	0,054	0,044

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle; Cut- off = 0,092; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 32: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ verstärkt wird, für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 (Meßfilter: 492 nm, ohne Referenzfilter).

DNA, Menge	Extinktionswerte					
	1. Versuch, A41		2. Versuch, A42		3. Versuch, A42	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
10 ng	1,891	1,882	2,178	2,124	1,956	2,042
100 fg	n. b.	n. b.	0,992	0,985	0,992	0,989
10 fg	<u>0,509</u>	<u>0,392</u>	<u>0,580</u>	<u>0,685</u>	<u>0,700</u>	<u>0,775</u>
10 fg	<u>0,329</u>	<u>0,364</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
10 fg	<u>0,386</u>	<u>0,474</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
10 fg	<u>0,595</u>	<u>0,571</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
10 fg	<u>0,612</u>	<u>0,499</u>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Negativ	0,113	0,136	0,126	0,144	0,129	0,103

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle; Cut- off = 0,160; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 33: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ verstärkt wird, für den Nachweis des Plasmids pXO2 und für den Nachweis der DNA des Chromosoms (Meßfilter: 492 nm, Referenzfilter: 650 nm).

DNA, Menge A68	Extinktionswerte			
	Nachweis des Plasmids pXO2		Nachweis des Chromosoms	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
10 ng	1,128	1,079	1,011	1,030
1 pg	n. b.	n. b.	<u>0,850</u>	<u>0,900</u>
100 fg	n. b.	n. b.	0,069	0,070
100 fg	n. b.	n. b.	0,061	0,066
10 fg	<u>0,139</u>	<u>0,142</u>	n. b.	n. b.
10 fg	<u>0,124</u>	<u>0,145</u>	n. b.	n. b.
Negativ	0,044	0,046	0,048	0,049

* = s. Pkt. 3.2.10; n. b. = nicht bestimmt; Negativ = Negativkontrolle; Cut- off = 0,092; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Tab. 31 und Tab. 32 stellen die gleichen Versuche dar, einmal mit und einmal ohne Referenzfilter gemessen. Die Nachweisgrenze für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 (s. Tab. 31) und pXO2 (s. Tab. 33) mit dem PCR ELISA, der durch den Testkit Ampli Q verstärkt wird (s. Pkt. 3.2.10.5), beträgt 10 fg. Die Nachweisgrenze für die DNA des Chromosoms (s. Tab. 33) beträgt 1 pg.

4.9 Ergebnisse der Steigerung der Sensitivität des PCR ELISA durch Erhöhung der MgCl₂- Konzentration im Prämix der PCR

Bei Erhöhung der MgCl₂- Konzentration im Prämix der PCR wird der Einbau von Uracil in das PCR Produkt vermehrt (BOEHRINGER Produktinformation zur Uracil- DNA

Glykosylase). Im PCR Dig Lab Mix ist das Digoxigenin an Uracil gebunden. Eine Erhöhung der MgCl₂- Endkonzentration im Prämix bewirkt einen vermehrten Einbau von Digoxigenin in das PCR Produkt. Um festzustellen, ob sich durch Erhöhung der MgCl₂- Endkonzentration die Nachweisgrenze für den PCR ELISA senken läßt, werden folgende Versuchsansätze durchgeführt:

Tabelle 34: PCR ELISA aus PCR Ansätzen, die mit 2,5 mM MgCl₂- Endkonzentration durchgeführt werden.

DNA, Menge	Versuch 1		Versuch 2	
	Extinktionswerte ¹		rel. Fluoreszenzeinheiten ²	
	Nachweis des Plasmids pXO1, Stamm A37		Nachweis des Plasmids pXO2, Stamm A6	
	Wert 1*	Wert 2*	Wert 1*	Wert 2*
1 pg	0,361	0,350	7,579	9,336
100 fg	0,113	0,124	4,181	4,778
10 fg	<u>0,102</u>	<u>0,092</u>	<u>2,263</u>	<u>2,350</u>
Neg.	0,051	0,055	1,277	1,410

* = s. Pkt. 3.2.10; ¹ PCR ELISA aus einer PCR, die im Volumen von 50 µl mit 2,5 mM MgCl₂- Endkonzentration im Prämix durchgeführt wird (Cut- off = 0,065); ² PCR ELISA aus einer PCR, die im Volumen von 100 µl mit 2,5 mM MgCl₂- Endkonzentration im Prämix durchgeführt wird (Cut- off = 1,725); n. b. = nicht bestimmt; Neg. = Negativkontrolle; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA nachweisbar sind, sind unterstrichen dargestellt.

Für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 mit dem PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.2.10.1) können 10 fg DNA nachgewiesen werden. 10 fg DNA können auch für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit dem Fluoreszenzmeßgerät (s. Pkt. 3.2.10.4) nachgewiesen werden.

4.10 Ergebnis des Nachweises von ca. 4 Sporen von *Bacillus anthracis* pro 100 g Erde

Um festzustellen, ob mit der geänderten Vorschrift für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben, wie mit der Vorschrift von BEYER et al.(1995), bis zu ca. 4 Sporen von *Bacillus anthracis* in 100 g Erde nachgewiesen werden können, wird folgender Versuch durchgeführt:

Tabelle 35: Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 aus 100 g Erde, die mit ca. 4 Sporen von *Bacillus anthracis* beimpft wird, mit dem PCR ELISA

Probe:	Extinktionswerte			
	1. Versuch*, Puregene DNA Isolation Kit		2. Versuch*, Easy DNA™ Kit	
	Wert 1**	Wert 2**	Wert 1**	Wert 2**
mit ca. 40 Sp./100 g Erde	n. b.	n. b.	0,748	0,848
mit ca. 4 Sp./100 g Erde	<u>0,237</u>	<u>0,148</u>	<u>0,452</u>	<u>0,342</u>
mit ca. 4 Sp./100 g Erde	<u>0,193</u>	<u>0,189</u>	<u>0,189</u>	<u>0,121</u>
mit ca. 4 Sp./100 g Erde	<u>0,130</u>	<u>0,121</u>	n. b.	n. b.
negative Erdprobe	0,053	0,055	0,050	0,055
Positivkontrolle	1,008	1,063	1,459	1,522
Negativkontrolle	0,055	0,050	0,047	0,050

* = Der PCR ELISA wird, wie unter Pkt.3.2.10.1 beschrieben, durchgeführt (PCR Dig Detection Kit); ** = s. Pkt. 3.2.10; Positivkontrolle = 10 ng DNA vom Stamm A41; Sp. = Sporen; Cut-off für den PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.2.10.1) = 0,065; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 36: Nachweis der DNAdes Plasmids pXO2 aus 100 g Erde, die mit ca. 4 Sporen von *Bacillus anthracis* beimpft wird, mit dem PCR ELISA

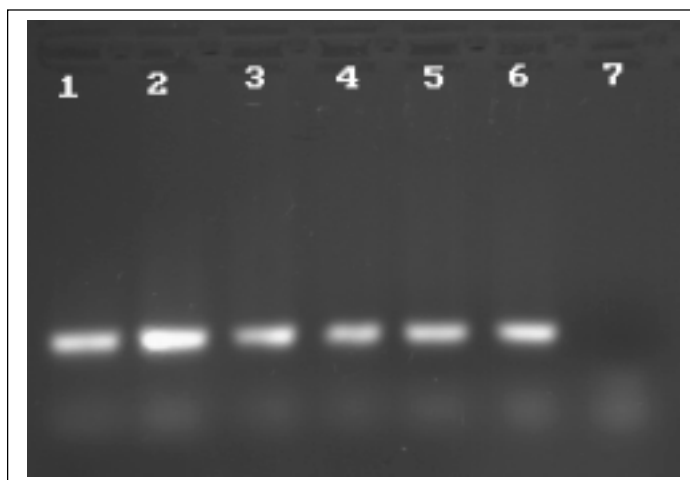
Probe:	Extinktionswerte			
	1. Versuch Puregene DNA Isolation Kit*		2. Versuch Easy DNA™ Kit**	
	Wert 1***	Wert 2***	Wert 1***	Wert 2***
mit ca. 40 Sp./100 g Erde	n. b.	n. b.	0,441	0,463
mit ca. 4 Sp./100 g Erde	<u>0,155</u>	<u>0,116</u>	<u>0,340</u>	<u>0,433</u>
mit ca. 4 Sp./100 g Erde	<u>0,296</u>	<u>0,240</u>	<u>0,328</u>	<u>0,341</u>
negative Erdprobe	0,067	0,074	0,039	0,049
Positivkontrolle	1,351	1,333	1,591	1,693
Negativkontrolle	0,071	0,072	0,047	0,048

* = Der PCR ELISA wird, wie unter Pkt. 3.2.10.4 Vorschrift 1 beschrieben, durchgeführt (PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden); ** = Der PCR ELISA wird, wie unter Pkt.3.2.10.1 beschrieben, durchgeführt (PCR Dig Detection Kit); *** = s. Pkt. 3.2.10; Positivkontrolle = 10 ng DNA vom Stamm A41; Sp. = Sporen; Cut-off für den PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden = 0,073; Cut-off für den PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.2.10.1) = 0,065; Die Werte der niedrigsten Verdünnungsstufe, die mit dem PCR ELISA nachweisbar ist, sind unterstrichen dargestellt.

Mit der geänderten Vorschrift zum Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben können, wie mit der Vorschrift von BEYER et al. (1995), 4 Sporen aus 100 g Erde nachgewiesen werden.

4.11 Ergebnis der Untersuchung über das Vorkommen von Mikroorganismen in Erdproben, die ein falsch positives Ergebnis der PCR (bzw. des PCR ELISA) für den Nachweis von *Bacillus anthracis* verursachen.

Um Mikroorganismen aus den Erdproben zu isolieren, die zu einem falsch positiven Ergebnis der PCR (bzw. des PCR ELISA) für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 oder des Chromosoms führen, werden jeweils über 3000 Einzelkolonien mit Hilfe der Koloniehybridisierung untersucht. Zusätzlich werden jeweils ca. 60 Kolonien direkt als Reinkultur aus den Erdproben isoliert. Die isolierten Kolonien werden, wie unter Pkt. 3.2.12 beschrieben, überprüft:



1 = A42, 10 ng; 2 = B146, 1 µl der präparierten DNA- Lösung wird verwendet; 3 = Stamm Nr. 6, 1 µl der präparierten DNA- Lösung wird verwendet; 4 = Stamm 7, 1 µl der präparierten DNA- Lösung wird verwendet; 5 = Kolonie Nr. 6, 100 ng DNA werden verwendet; 6 = Kolonie Nr. 7, 100 ng DNA wird verwendet; 7 = Negativkontrolle der PCR

Abbildung 14: Durchführung der PCR für den Nachweis der DNA des Chromosoms von *Bacillus anthracis* mit den aus der Erde isolierten Kolonien.

Die Stämme Nr. 6 und Nr. 7, die nicht aufgrund des Ergebnisses der Koloniehybridisierung aus den Erdproben isoliert werden, erzeugen für den Nachweis der DNA des Chromosoms ein PCR Fragment der gleichen Länge wie *Bacillus anthracis*. Der aus der Stammsammlung der Universität Hohenheim stammende Stamm von *Bacillus cereus* B146 (s. Tab.1), ist ebenfalls positiv für den Nachweis der DNA des Chromosoms mit der PCR. Keine der auf Verdacht isolierten Kolonien ist positiv für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2.

Um festzustellen, ob die Bakterien aus den Stämmen Nr.6 und Nr. 7 für den Nachweis der DNA des Chromosoms mit dem PCR Dig Detection Kit positiv sind, wird folgender Versuch durchgeführt (s. Pkt. 3.2.12):

Tabelle 37 : Durchführung des PCR Dig Detection Kits für den Nachweis der DNA des Chromosoms mit den aus den Erdproben isolierten Kolonien

Bakterium, Menge der DNA	Extinktionswerte	
	Wert 1*	Wert 2*
A42, 10 ng	1,629	1,568
Stamm Nr. 6**	1,501	1,570
Stamm Nr. 7**	1,457	1,469
Stamm Nr. 6, 100 ng	1,487	1,388
Stamm Nr. 7, 100 ng	1,428	1,383
Negativ	0,051	0,053

* = s. Pkt. 3.2.10; ** = 1 µl der, wie unter Pkt. 3.2.3 beschrieben, präparierten DNA- Lösung wird als Ziel- DNA in der PCR eingesetzt; Nr. 6 und Nr. 7 = Bakterien, die aus den Erdproben isoliert wurden; Cut- off = 0,065

Die beiden aus den Erdproben isolierten Stämme Nr. 6 und Nr. 7 sind positiv für den Nachweis der DNA des Chromosoms mit dem PCR ELISA.

- Ergebnisse der Identifikation der aus den Erdproben isolierten Bakterien, die zu einem falsch positiven Nachweis von *Bacillus anthracis* führen

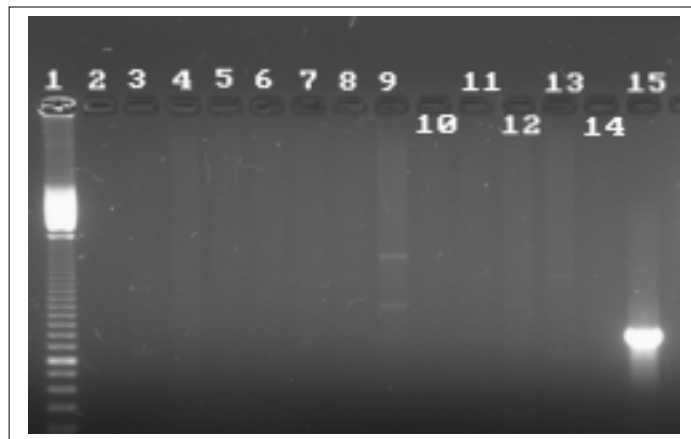
B146 ist in der Stammsammlung der Universität Hohenheim vorhanden (s. Tabelle 1) und ist ein Stamm der Species *Bacillus cereus*. B146 und der aus der Erde isolierte Stamm Nr. 6

zeigen Wachstum auf PLET Medium (s. Anhang). Der aus der Erde isolierte Stamm Nr. 7 wächst nicht auf dem PLET Medium. Die Stämme Nr. 6 und Nr.7 wachsen auf Hammelblutagar mit einer deutlichen Hämolyse. Die Auswertung des Api CH50 Testes (LOGAN et al., 1985) zeigt, daß es sich beim Stamm Nr. 6 zu 67,5 % um einen Stamm der Species *Bacillus cereus* handelt, zu 32,5 % handelt es sich um einen Stamm des *Bacillus mycoides* und zu 0,1 % um *Bacillus anthracis*. Ferner wird im Ergebnis des Api CH50 darauf hingewiesen, daß es sich bei dem Stamm Nr. 6 auch um einen Stamm des *Bacillus thuringiensis* handeln kann.

Beim Stamm Nr. 7 handelt es sich laut Ergebnis des ApiCH50 zu 94,2 % um *Bacillus cereus* und zu 4,6 % um *Bacillus anthracis*.

- Ergebnisse der PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit Ziel- DNA von Stämmen des *Bacillus licheniformis*

Um zu überprüfen, ob die in Tab. 1 aufgeführten Stämme von *Bacillus licheniformis* für den Nachweis der des Plasmids pXO2 positiv sind, wird eine PCR für den Nachweis des Plasmids pXO2 mit den Primern Cap9 und Cap102, wie unter Pkt. 3.2.4 beschrieben, durchgeführt. Die PCR wird mit der Agarosegelelektrophorese ausgewertet (s. Pkt. 3.2.12)



1 = 100 bp Marker¹, 2 = B36, 3 = B62, 4 = B72, 5 = B77, 6 = B115, 7 = B 116, 8 = B 117, 9 = B118, 10 = B119, 11 = B136, 12 = B177, 13 = B178, 14 = Negativkontrolle der PCR, 15 = A68, 10 ng

Abbildung 15: PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit DNA von *Bacillus licheniformis*

Die in Tab. 1 aufgeführten Stämme von *Bacillus licheniformis* sind für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 negativ.

4.12 Ergebnisse der Spaltung der Produkte der nested PCR aus Erdproben, die für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 positiv sind

Die Erdproben E2, E3 und E4 stammen aus Standorten, die für das Vorkommen von *Bacillus anthracis* unbedenklich sind. Sie sind für den Nachweis des Genabschnitts Cap B und Cap C mit der nested PCR positiv. Um festzustellen, ob in den Produkten der nested PCR die Sequenzen der Spaltorte für die Restriktionsendonukleasen enthalten sind, wird folgender Versuch durchgeführt (s. Pkt. 3.2.13):

¹ Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg, Art. Nr. 274001- 01

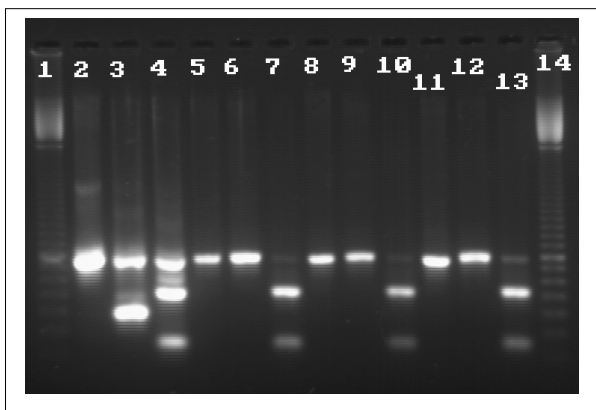


Abbildung 16: Spaltung des Produktes der nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts B mit BamH I und Xba I

1 = 100 bp Marker; 2, 3 + 4 = Produkt der nested PCR von A42, mit BamH I gespalten, mit Xba I gespalten; 5, 6 + 7 = Produkt der nested PCR von E2, mit BamH I gespalten, mit Xba I gespalten; 8, 9 + 10 = Produkt der nested PCR von E3, mit BamH I gespalten, mit Xba I gespalten; 11, 12 + 13 = Produkt der nested PCR von E4, mit BamH I gespalten, mit Xba I gespalten; 14 = 100 bp Marker

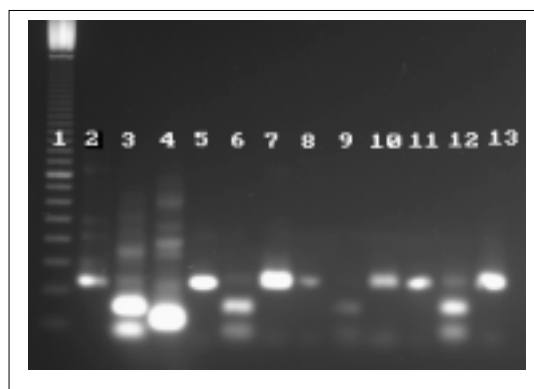


Abbildung 17: Spaltung des Produktes der nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts C mit Dra I und Hae III.

1 = 100 bp Marker; 2, 3 + 4 = Produkt der nested PCR von A42, mit Dra I gespalten, mit Hae III gespalten; 5, 6 + 7 = Produkt der nested PCR von E2, mit Dra I gespalten, mit Hae III gespalten; 8, 9 + 10 = Produkt der nested PCR von E3, mit Dra I gespalten, mit Hae III gespalten; 11, 12 + 13 = Produkt der nested PCR von E4, mit Dra I gespalten, mit Hae III gespalten

Die Produkte der nested PCR von *Bacillus anthracis* (A42) werden durch die Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Produkte der nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts cap B der Erproben E2, E3 und E4 werden mit der Restriktionsendonuklease BamH I nicht gespalten. Die Restriktionsendonuklease Hae III spaltet die Produkte der nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts cap C der Erdproben E2, E3 und E4 nicht. Die Erdproben E2, E3 und E4 sind negativ für das Vorkommen von *Bacillus anthracis*. Die DNA-Lösung, die für die Herstellung der PCR Produkte benutzt wird ist nicht mit DNA von *Bacillus anthracis* kontaminiert.

4.13 Ergebnisse der Sequenzierung der Produkte der nested PCR aus Erdproben

Für die Herstellung der Produkte der nested PCR wird dieselbe DNA- Lösung als Template in der PCR verwendet, die auch für die Spaltung der PCR Produkte (s. Pkt. 4.12) eingesetzt wird. Die für die Gewinnung der DNA verwendeten Erdproben (E2, E3 und E4) stammen von Standorten, die für das Vorkommen von *Bacillus anthracis* unbedenklich sind. Um festzustellen, ob die Sequenz der Produkte der nested PCR aus Erdproben mit der Sequenz von *Bacillus anthracis* übereinstimmt, wird folgender Versuch durchgeführt (s. Pkt. 3.2.14):

- Ergebnisse der Sequenzierung des Produktes der nested PCR aus Erdproben für den Nachweis des Genabschnitts B des Plasmids pXO2 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern

654⁹

N K M I Q A N V G V I V N V L E D H M D
 AAAATAAAATGATTCAAGCAAATGTTGGAGT**T**ATTGTAAATGTTTTAGAAGATCATATGG
 AAAATAAAATGATTCAAGCAAATGTTGGAGTGATTGTAAATGTTTTAGAAGATCATATGG
 N K M I Q A N V G V I V N V L E D H M D

714⁹

V M G P T L D E V A E A F T A T I P Y N
 A¹TGTTATGGGACCTACACTTTGACGAAGTAGCTGAAGCTTTCACTGCTACCATTTCCATATA
 A¹TGTTATGGGACCTACACTTTGACGAAGTAGCTGAAGCTTTCACTGCTACCATTTCCATATA
 V M G P T L D E V A E A F T A T I P Y N

774⁹

G H L V T I E S E Y L D Y F K **K** V A E E
 ATGGACATTTAGTCACTATTGAAAGTGAATACTTTGGATTACTTTAAA**A**AGGTTGCAGAAG
 ATGGACATTTAGTCACTATTGAAAGTGAATACTTTGGATTACTTTAAAGAGGTTGCAGAAG
 G H L V T I E S E Y L D Y F K **E** V A E E

834⁹

R N T K V I V A D N S R I S E E F L R K
 AGAGAAATACAAAAGTGATTGTTGCTGATAAT**TCTAGA**²AT**C**TCAGAAGAAT**TCTTACGCA**
 AGAGAAATACAAAAGTGATTGTTGCGGATAAT**TCTAGA**²AT**TTCAGAAGAATCCTTACGAA**
 R N T K V I V A D N S R I S E E F L R K

894⁹

F D Y M V F P D N A S L A L A V A E A L
 AATTTGATTACATGGTCTTCCAGATAATGCATCGCTTGCTTTAGCGGTAGCAGAGGCTC
 AATTTGATTACATGGTCTTCCAGATAATGCATCG**CTTGCTTTAGCGGTAGCAGAGGCTC**
 F D Y M V F P D N A S L A L A V A E A L

954⁹

G I D E **K** T A F R G M L N A H P D P G A
 TTGG**A** ATTGATGAGAAAACAGCATTCCGTGGTATGTTGAATGCTCATCC**AGACCC** AGGAG
TTGGG³ATTGATGAGAAAACAGCATTCCGTGGTATGTTGAATGCTCATCC**GGATCC**⁴ **AGGAG**
 G I D E **E** T A F R G M L N A H P D P G A

1014⁹

M R I T R F A D Q S K P A F F V N G F A
CAATGAGAA TTACCCGTTTTGCTGACCAATCTAAACCTGCATTCTTTTGTAAATGGCTTTG
CAATGAGAA⁵TTACACGTTTTGCTGACCAATCTAAGCCTGCGTTCTTCGTAAATGGTTTTG
M R I T R F A D Q S K P A F F V N G F A

1074⁹

A N D P S S T L R I W E R V D D F G Y S
CAGCGAATGATCCCTCATC⁶AACATTACGTATTTGGGAACGTGTGGATGATTTTGGATATA
CAGCGAATGATCCCTCATC⁶AACATTACGTATTTGGGAACGTGTGGATGATTTTGGATATA
A N D P S S T L R I W E R V D D F G Y S

1134⁹

N L A P I V I M N C R P D R V D R T E Q
GTAATCTAGCTCCAATTGTGATTATGAATTGCCGCCCTGACCGCGTTGATCGTACTGAAC
GTAATCTAGCTCCAATTGTAATTATGAATTGCCGCCCTGACCGCGTTGATCGTACTGAGC
N L A P I V I M N C R P D R V D R T E Q

1194⁹

F A R D V L P Y I K A E I V I A I G E T
AGTTTGCTAGGGATGTTTTACCGTATATTTAAAGCAGAAATAGTCATTGCGATTGG AGAGA
AGTTTGCTAGGGATGTTTTGCCATATATTTAAAGCGGAAATAGTTATTGCGATTGG⁷AGAAA
F A R D V L P Y I K A E I V I A I G E T

1254⁹

T A P I T N A F E K G D I P T Q E Y W N
CGACAGCACCCATTACAAATGCTTTTTGAAAAAGGAGATATT⁸CCAACGCAAGAGTATTGGA
CGACTGCACCTATTACAAGTGCTTTTTGAAAAAGGAGATATT⁸CCAACGCAAGAGTATTGGA
T A P I T S A F E K G D I P T Q E Y W N

1314

L E G W S T S E I M A R M R P
ACTTAGAGGGTTGGTCAACAAGTGAAATTATGGCTCGAATGCGTCCGT
ACTTAGAAGGCTGGTCAACAAGTGAAATTATGTCTCGTATGCGTCCATAT
L E G W S T S E I M S R M R P Y

1364⁹

Abbildung 18: Vergleich der Sequenz von *Bacillus anthracis* mit dem sequenzierten Produkt der nested PCR aus Erdproben für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern.

¹ = Beginn des Doppelstranges

² = Xba I

³ = PACAFL1, Sonde (REIF et al., 1994)

⁴ = BamH I, gestrichelt

⁵ = Cap10, die Sequenz von BamH I gehört zu dem Primer

⁶ = BACA6RI

⁷ = BA17 = 17

⁸ = Ende des Doppelstranges

⁹ = Positionsangaben werden von MAKINO et al. (1989)

übernommen

Die Ergebnisse der Sequenzierung des Produktes der nested PCR aus den Erdproben sind vom 5' zum 3' Ende dargestellt, darüber ist die Primärstruktur der Proteine aus diesem Bereich abgebildet. Die Vorwärtssequenz (vom 5' Ende zum 3' Ende) von *Bacillus anthracis* ist unterstrichen dargestellt, sie ist entsprechend unter dem sequenzierten Abschnitt des PCR Produktes abgebildet. Darunter ist, ebenfalls unterstrichen, die Primärstruktur der Proteine aus diesem Bereich den entsprechenden Nukleinsäuretripletts gegenübergestellt. Die ausgetauschten

Basen und Aminosäuren sind dick gedruckt. Die in diesem Sequenzabschnitt liegenden Primer und Restriktionsenzyme sind umrahmt.

Die Produkte der nested PCR aus den drei Erdproben E2, E3 und E4 weisen die gleiche Sequenz auf. Im Unterschied zu der Sequenz von *Bacillus anthracis* sind im Produkt der nested PCR aus den Erdproben für den Nachweis des Genabschnitts B des Plasmids pXO2 29 Punktmutationen enthalten. Davon sind 25 sogenannte stille Punktmutationen, die nicht zum Austausch einer Aminosäure führen und 4 Punktmutationen bewirken den Austausch von zweimal Glutaminsäure nach Lysin (Position 821 und 968), von Serin nach Asparagin (Position 1272) und von Serin nach Alanin (Position 1346). Als Positivkontrolle wird das Produkt der nested PCR des Milzbrandstammes A42 ebenfalls sequenziert. Das Ergebnis dieser Sequenzierung stimmt mit der von MAKINO et al. (1989) ermittelten Sequenz überein.

- Ergebnisse der Sequenzierung des Produktes der nested PCR aus Erdproben für den Nachweis des Genabschnitts C des Plasmids pXO2

Als äußere Primer dienen die von RAMISSE et al. (1996) beschriebenen Primer 17 und 20 und als innere Primer für die nested PCR dienen Cvi und Cri (BEYER, persönliche Mitteilung).

1598⁸

```

A L V F N Q P V F M L L V L F I S I L Y
C CACTCGTTTTTAATCAGCCC1GTATTTATGTTACTTGTATTATT2TATCAGTATTTTAA
TAC CACTCGTTTTTAATCAGCCC1GTATTTATGTTGGTTGTTTTATT2TATCAGTATTTTAA
A L V F N Q P V F M L V V L F I S I L Y

```

1668⁸

```

Y V I V T Y G V S R F M I L Y G R R K F
CATATGTAATCGTTACGTATGGCGTTTCAAGATT3TATGATTTTATATGGTC GTAGAAAAT
CATATGTAATCGTTACGTATGGTGGTTTCAAGATTCATGATTTTATATGGCC3GTAGAAAAT
Y V I V T Y G V S R F M I L Y G R R K F

```

1728⁸

```

A A M L I T G I C L K L L F D Y C Y P V
TTGCAGCGATGCTGATTACAGGTA TTTGTTTAAA5ACTTTTATTTGATTATTGCTATCCAG
TTGCGGCAACGCTAATTACAGGTA4TTTGTTTAAA5ACTTTTATTTGATTATTGTTATCCTG
A A T L I T G I C L K L L F D Y C Y P V

```

1788⁸

```

M P F E I F E F R G I G V I V P G
TTATGCCATTT6GAGATTTTGAATTCGTGGTATTGGAGTTATTGTTCCAGG7
TTATGCCATTT6GAGATTTTGAATTCGTGGTATTGGAGTTATTGTTCCAGG7A
M P F E I F E F R G I G V I V P G

```

1838⁸

Abbildung 19: Vergleich der Sequenz von *Bacillus anthracis* mit dem sequenzierten Produkt der nested PCR aus Erdproben für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2

¹ = Cvi

² = Beginn des Doppelstranges

³ = Hae III

⁴ = Cap20rev

⁵ = Dra I

⁶ = Ende des Doppelstranges

⁷ = Cri

⁸ = Positionsangaben werden von MAKINO et al. (1989) übernommen

Die Ergebnisse der Sequenzierung des Produktes der nested PCR aus den Erdproben sind vom 5' zum 3' Ende dargestellt, darüber ist die Primärstruktur der Proteine aus diesem Bereich abgebildet. Die Vorwärtssequenz (vom 5' Ende zum 3' Ende) von *Bacillus anthracis* ist unterstrichen dargestellt, sie ist entsprechend unter dem

sequenzierten Abschnitt des PCR Produktes abgebildet. Darunter ist, ebenfalls unterstrichen, die Primärstruktur der Proteine aus diesem Bereich den entsprechenden Nukleinsäuretripletts gegenübergestellt. Die ausgetauschten Basen und Aminosäuren sind dick gedruckt. Die in diesem Sequenzabschnitt liegenden Primer und Restriktionsenzyme sind umrahmt.

Im Unterschied zu der Sequenz von *Bacillus anthracis* sind im Produkt der nested PCR aus der Erdprobe (E2) für den Nachweis des Genabschnitts C des Plasmids pXO2 13 Punktmutationen enthalten. Davon sind 11 sogenannte stille Punktmutationen, die nicht zum Austausch einer Aminosäure an der entsprechenden Stelle führen und 2 Punktmutationen bewirken den Austausch von Valin gegen Leucin (Position 1633) und von Threonin gegen Methionin (Position 1737). Als Positivkontrolle wird das Produkt der nested PCR des Milzbrandstammes A42 ebenfalls sequenziert. Das Ergebnis dieser Sequenzierung stimmt mit der von MAKINO et al. (1989) ermittelten Sequenz überein.

- Ergebnisse der Sequenzierung des Produktes der seminested PCR aus Erdproben für den Nachweis des Genabschnitts C des Plasmids pXO2

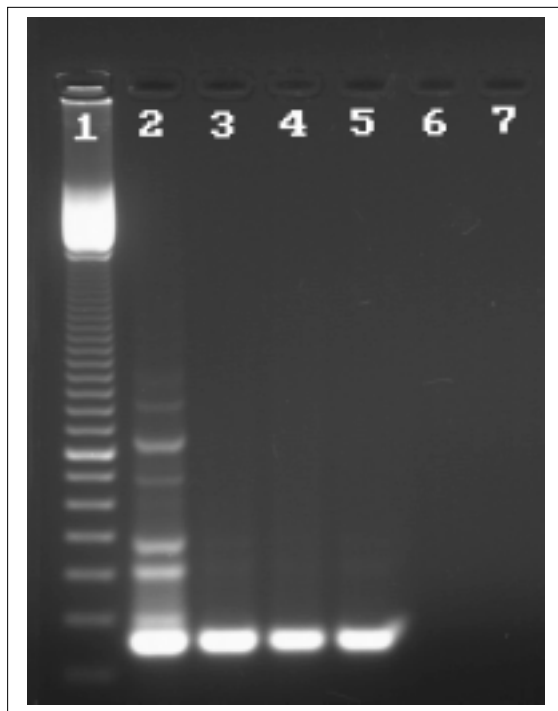
Als äußere Primer dienen die von RAMISSE et al. (1996) beschriebenen Primer 17 und 20 und als Primer für die seminested PCR dient der Primer 17 und der innere Primer Cap20rev (s. Pkt. 3.2.16). Der Primer Cap20rev ist nicht für die Sequenzierung geeignet. Mit dem Primer Cap20rev ist nur eine sehr lückenhafte Sequenzierung möglich.

4.14 Ergebnisse der Spezifitätskontrolle der übrigen Primer, die bisher für den Nachweis des Plasmids pXO2 beschrieben wurden

Um festzustellen, ob die Primer für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 aus Erdproben spezifisch sind, wird dieselbe DNA- Lösung als Template in der PCR verwendet, die auch für die Sequenzierung (s. Pkt. 4.13) und für die Spaltung der PCR Produkte (4.12) eingesetzt wird. Die für die Gewinnung der DNA verwendeten Erdproben (E2, E3 und E4) stammen von Standorten, die für das Vorkommen von *Bacillus anthracis* unbedenklich sind.

- Kontrolle der Spezifität der Primer, die von SJÖSTEDT et al. (1997) und von RAMISSE et al. (1996) für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 beschrieben werden

Um die Spezifität der Primer zu testen wird eine nested PCR, wie unter Pkt. 3.2.15 beschrieben, durchgeführt.



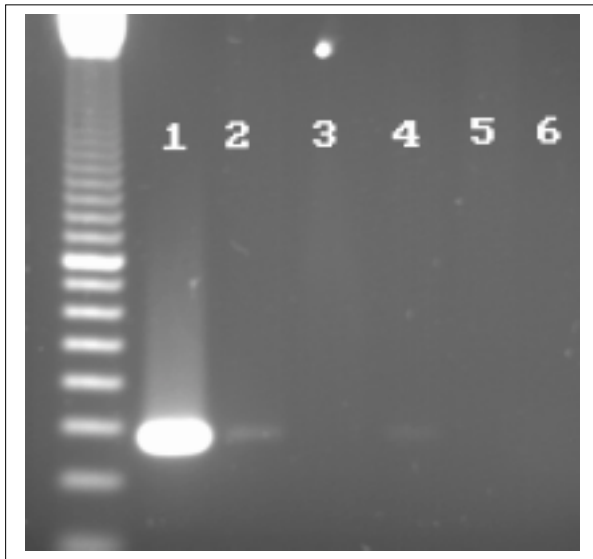
1 = 100 bp Marker; 2 = A68,
10 ng; 3 = E2; 4 = E3; 5 = E4;
6 = Negativkontrolle der
1. PCR; 7 = Negativkontrolle
der nested PCR

Abbildung 20: Kontrolle der Spezifität der nested PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit den SJÖSTEDT et al. (1997) und von RAMISSE et al. (1996) beschriebenen Primern.

Die von RAMISSE et al. (1996) und von SJÖSTEDT et al. (1997) beschriebenen Primer sind nicht spezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

- Kontrolle der Spezifität der Primer, die von MAKINO et al. (1993) für den Nachweis des Plasmids pXO2 beschrieben werden

Um die Spezifität der Primer zu testen wird eine PCR, wie unter Pkt. 3.2.15 beschrieben, durchgeführt.



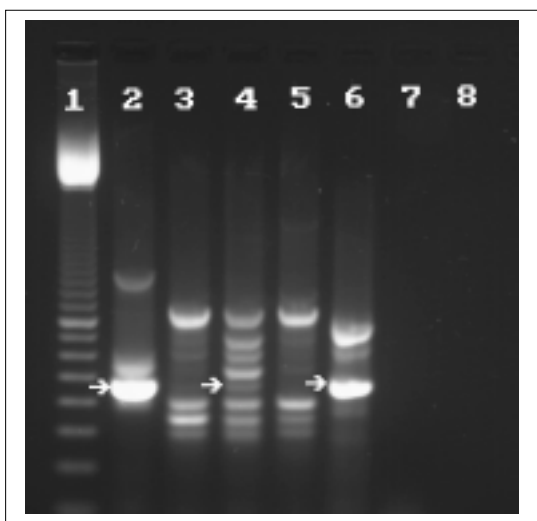
links im Bild befindet sich der 100 bp Marker; 1 = A68, 10 ng; 2 = E2; 3 = E3; 4 = E4; 5 = LT2; 6 = Negativkontrolle der PCR; 7 = Reste des Prämix (z. B Primer), die sich als wolkige Aufhellung darstellen

Abbildung 21: Kontrolle der Spezifität der PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit den von MAKINO et al. (1993) beschriebenen Primern.

Bei den Erdproben E2 und E4 ist eine zarte Bande in Höhe der Positivkontrolle sichtbar. Die von MAKINO et al. (1993) beschriebenen Primer sind nicht spezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

- Kontrolle der Spezifität der Primer², die von REIF et al. (1994) für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 beschrieben werden

Um die Spezifität der Primer zu testen wird eine seminested PCR, wie unter Pkt. 3.2.15 beschrieben, durchgeführt.



1 = 100 bp Marker; 2 = A68, 10 ng; 3 = E2; 4 = E3; 5 = E4; 6 = LT2; 7 = Negativkontrolle der 1. PCR; 8 = Negativkontrolle der nested PCR; Die Pfeile zeigen auf die Banden, die in Höhe der Positivkontrolle liegen.

Abbildung 22: Kontrolle der Spezifität der seminested PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit den von REIF et al. (1994) beschriebenen Primern.

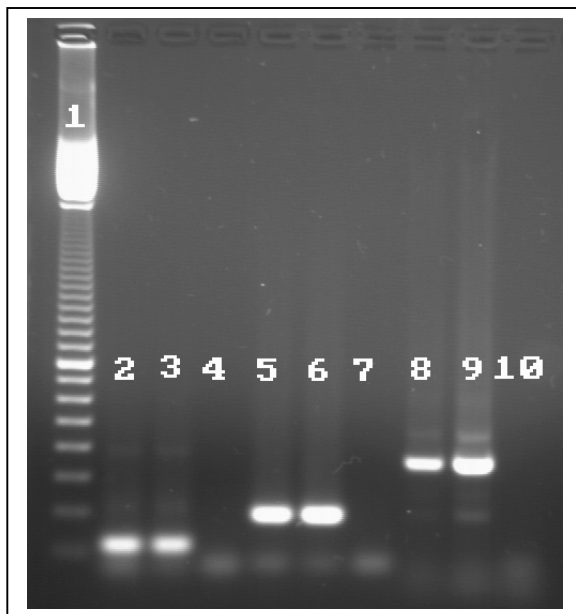
² Als innerer Primer für die seminested PCR wird der von BEYER et al. (1995) beschriebene Primer Cap9 verwendet.

Die seminested PCR ist schwach positiv für die Erdprobe E3, sie ist deutlich positiv für den Salmonellenstamm LT2. Die von REIF et al. (1994) beschriebenen Primer sind nicht spezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

4.15 Ergebnis der Suche nach Primern, die spezifisch sind für den Nachweis des Plasmids pXO2 und für das Chromosom von *Bacillus anthracis*

- Suche nach einem spezifischen Primer für den Nachweis der DNA des Chromosoms von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

Mit Hilfe der von ETIENNE- TOUMELIN et al. (1994) beschriebenen Sequenz des Gens für das S- Layer Protein von *Bacillus anthracis* werden die Primer SAP1V, SAP2V, SAP3V, SAP3R und SAP1R (s. Tab. 2) für Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis* ausgesucht. Um festzustellen, ob diese Primer für die Durchführung einer PCR geeignet sind, wird die unter Pkt. 3.2.16 beschriebene PCR mit den Stämmen A2 und A6 durchgeführt.

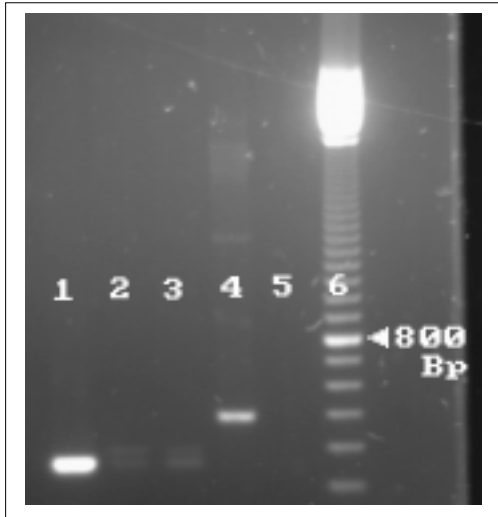


1 = 100 bp Marker; 2 = 1 ng, A2, Primer SAP1V und SAP1R; 3 = 1 ng, A6, Primer SAP1V und SAP1R; 4 = Negativkontrolle für die PCR mit den Primern SAP1V und SAP1R; 5 = 1 ng, A2, Primer SAP2V und SAP1R; 6 = 1 ng, A6, Primer SAP2V und SAP1R; 7 = Negativkontrolle für die PCR mit den Primern SAP2V und SAP1R; 8 = 1 ng, A2, Primer SAP3V und SAP3R; 9 = 1 ng, A6, Primer SAP3V und SAP3R; 10 = Negativkontrolle für die PCR mit den Primern SAP3V und SAP3R

Abbildung 23: Durchführung einer PCR mit den Primern für den chromosomalen Nachweis aus der Sequenz des S- Layer Proteins

Unter den Banden für das PCR Produkt, in denen der Primer SAP1R eingesetzt wird, befindet sich eine deutlich begrenzte Aufhellung, die von Primerdimeren gebildet wird. Der Primer SAP1R ist für die PCR nicht geeignet. Die Primer SAP3V und SAP3R sind für die Durchführung einer PCR geeignet.

- Um festzustellen, ob die Primer SAP3V und SAP3R spezifisch sind für den Nachweis der DNA des Chromosoms von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben, wird eine PCR mit der DNA- Lösung aus Erdproben, die negativ sind für den Nachweis der Plasmide pXO1 und pXO2, durchgeführt (s. Pkt.3.2.16).



1 = A24, 10 ng; 2 = Erdprobe A (negativ für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2); 3 = Erdprobe B (negativ für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2); 4 = LT2; 5 = Negativkontrolle der PCR; 6 = 100 bp Marker

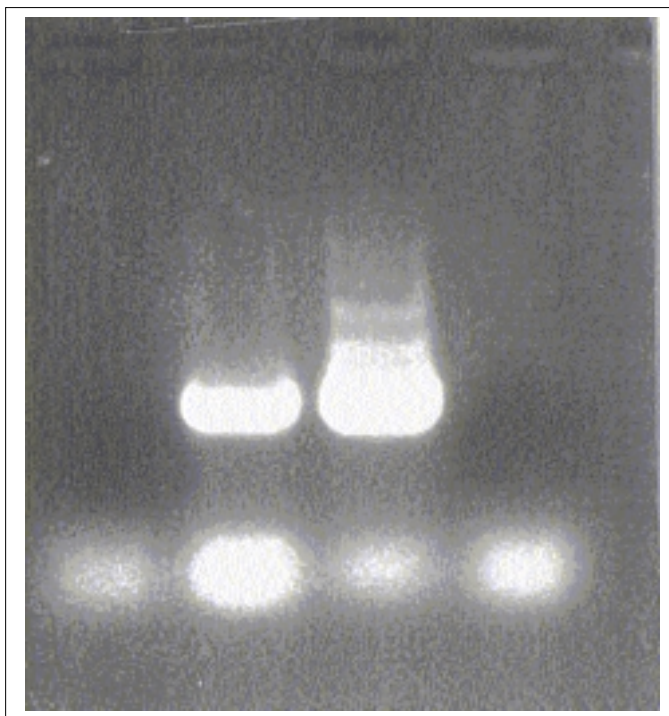
Abbildung 24: PCR mit den Primern SAP3V und SAP3R aus Erdproben, die für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2 negativ sind.

Bei den Erdproben A und B erscheint in Höhe der Positivkontrolle eine schwach sichtbare Doppelbande. Die Primer SAP3V und SAP3R sind nicht spezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

- Suche nach einem spezifischen Primer für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben

Mit Hilfe der Ergebnisse der Sequenzierung werden Primer ausgesucht, die sich möglichst von der unter Pkt. 4.13 beschriebenen Sequenz unterscheiden und eine identische Sequenz wie *Bacillus anthracis* besitzen.

- Aus dem Genabschnitt Cap B des Plasmids pXO2 wird der Primer Cap10 als innerer Primer für die unter Pkt. 3.2.16 beschriebene nested PCR ausgesucht. Der Primer Cap10 beinhaltet in seiner Sequenz den Spaltort für die Restriktionsendonuklease BamH I (s. Pkt. 4.13). Als Ziel-DNA wird die DNA-Lösung eingesetzt, die für die Sequenzierung (s. Pkt. 4.13) und die Spaltung (s. Pkt. 4.12) der Produkte der nested PCR eingesetzt wird. Um festzustellen, ob die nested PCR durch den Einsatz des inneren Primers Cap10 spezifisch wird für den Nachweis des Plasmids pXO2 aus Erdproben, wird folgender Versuch durchgeführt:



1 = Negativkontrolle der nested PCR; 2 = Erdproben E2; 3 = 10 ng A42; 4 = Negativkontrolle der 1. PCR

Abbildung 25: Nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts cap B des Plasmids pXO2 mit dem inneren Primer Cap10 aus einer Erdprobe, in der *Bacillus anthracis* nicht enthalten ist

Die nested PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit dem inneren Primer Cap10 ist nicht spezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Erdproben.

Aus dem Genabschnitt Cap C des Plasmids pXO2 wird der Primer Cap20rev ausgesucht. Die Sequenz des Primers Cap20rev unterscheidet sich an 4 Stellen von der Sequenz, die aus dem nested PCR Produkt der Erdproben ermittelt wird (s. Pkt. 4.13). Als Ziel- DNA wird die DNA- Lösung eingesetzt, die für die Sequenzierung (s. Pkt. 4.13) und die Spaltung (s. Pkt. 4.12) der Produkte der nested PCR eingesetzt wird. Um festzustellen, ob die nested PCR durch den Einsatz des inneren Primers Cap20rev spezifisch wird für den Nachweis des Plasmids pXO2 aus Erdproben, wird folgender Versuch durchgeführt:

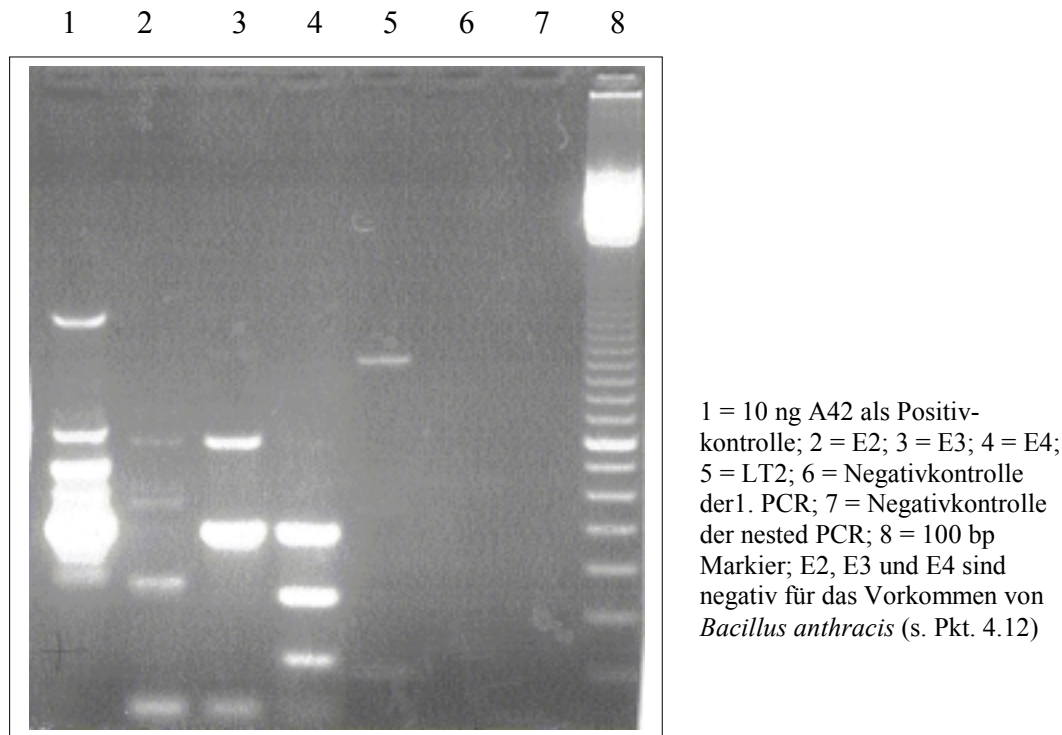


Abbildung 26: Seminested PCR für den Nachweis des Genabschnitts cap C des Plasmids pXO2 mit dem inneren Primer Cap20rev aus einer Erdprobe, in der *Bacillus anthracis* nicht enthalten ist

Der Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit der seminested PCR ist positiv für die Erdproben E3 und E4, er ist negativ für die Erdproben E2. Die seminested PCR für den Nachweis des Plasmids pXO2 mit dem inneren Primer Cap20rev ist nicht spezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Erdproben.