

Fakultät Maschinenwesen

Studienrichtung Bioverfahrenstechnik • Prof. Dr. Th. Bley

### Thema: Neue Applikationsmethoden zur Durchführung einer Nukleinsäurevervielfältigung im Bereich der Pathogendiagnostik

# von: Carolin Hartwig

geb. am: 14.12.1987 in: Dresden

vorgelegte

# Interdisziplinäre Projektarbeit

eingereicht am: 06.06.2012

Betreuer: Dipl.-Ing. Philipp Quenzel Dr. Dirk Kuhlmeier (Fraunhofer - Institut für Zelltherapie und Immunologie)

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Interdisziplinären Projektarbeit unterstützt haben.

Dem Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie möchte ich dafür danken, dass ich mein Fachpraktikum dort zu einem aktuellen Forschungsthema durchführen durfte. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dirk Kuhlmeier, Frau Natalia Sandetskaya sowie den weiteren Mitarbeitern der AG Nanotechnologie für die fachlichen Diskussionen, die persönliche Unterstützung bei meinen Versuchen und die Hilfestellungen bei der Anfertigung der Belegarbeit.

Ein großer Dank gilt dem Technischen Assistenten Stephan Schreiber der AG RNomics für die schnelle und unkomplizierte Ermöglichung der Reparatur des Microarray Scanners, nachdem am Gerät größere technische Probleme aufgetreten waren.

# Inhalt

Abkürz	ungen und FormelzeichenI
1	Einleitung4
2	Problemstellung und Zielsetzung5
3	Grundlagen6
3.1	Polymerasenkettenreaktion (PCR)6
3.2	Das Bakterium Staphylococcus aureus7
3.3	Primerpaarungen8
3.4	Oberflächenmodifikation10
3.5	Analyseverfahren11
4	Material und Methoden14
4.1	Material14
4.1.1	Objektträger14
4.1.2	Chemikalien und Biomaterialien14
4.1.3	Oligonukleotide
4.1.4	Technische Ausrüstung und Gebrauchsmaterial17
4.2	Methoden17
4.2.1	Aktivierung der Objektträger17
4.2.2	Silanisierung der Objektträger17
4.2.3	Herstellung des Polydimethylsiloxan (PDMS)18
4.2.4	Immobilisierung der Oligonukleotide18
4.2.5	Blocken20
4.2.6	Hybridisierungstest20
4.2.7	Thermostabilitätstest21
4.2.8	Methode der PCR22
4.2.8	Gelelektrophorese25
4.2.9	Microarray Scanner26

5	Versuchsergebnisse und Diskussion27
5.1	Optimierung der Aktivierung, Silanisierung und Immobilisierung27
5.1.1	Erste PCR-Versuche mit Glasobjektträgern27
5.1.2	Hybridisierungsexperimente auf Glasobjektträgern28
5.1.3	Optimierung der Aktivierung und Silanisierung von Glasobjektträgern30
5.1.4	Thermostabilitätstest der Immobilisierung an Glasobjektträgern32
5.1.5	Übertragung der Methoden auf Plastikobjektträger
5.1.6	Neue Aktivierungsmethode für Plastikobjektträger
5.2	Experimenteller Aufbau der PCR an einer festen Phase
5.2.1	Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur des nuc-Primerpaares39
5.2.2	PCR-Programmtest des AmpliSpeeds40
5.2.3	Durchführung einer PCR an einer festen Phase41
6	Zusammenfassung und Ausblick
7	Literaturverzeichnis
Verzeic	hnis der AbbildungenIII
Verzeic	hnis der Tabellen V
Anhang	9VI

Symbol	Bezeichnung	Einheit
A	Adenin	
ATPS	3-Aminopropyltriethoxysilan	
bp	Basenpaare	
BS <sup>3</sup>	Bis[Sulfosuccinimidyl]-suberat	
BSA	Bovines Serumalbumin	
С	Cytosin	
СуЗ	Indocarbocyanin	
Cy5	Indodicarbocyanin	
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser	
DMF	Dimethylformamid	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	
DSS	Disuccinimidylsuberat	
dt.	deutsch	
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
G	Guanin	
HCI	Salzsäure	
IGB	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik	
IZI	Institut für Zelltherapie und Immunologie	
KCI	Kaliumchlorid	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat	
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen	
MRSA	Methicillin-resistente S. aureus-Stämme	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat	
NaCl	Natriumchlorid	
NaOH	Natronlauge	
Nr.	Nummer	
nuc	Gen, codiert thermostabile Nuclease von S. aureus	
OH-Gruppen	Hydroxylgruppe	

# Abkürzungen und Formelzeichen

Symbol	Bezeichnung	Einheit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	
PBS/Tween	PBS + 0,05 % Tween 20	
PC	Polycarbonat	
PCR	Polymerasenkettenreaktion	
PDMS	Polydimethylsiloxan	
PET	Polyethylenterephthalat	
PMMA	Polymethylmethacrylat	
PMT	Photomultiplier-Tube	
PTFE	Polytetrafluoroethylen	
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure	
RT	Raumtemperatur	
S.	Seite	
S. aureus	Staphylococcus aureus	
т	Thymin	
TAE-Puffer	Tris-Acetat-Puffer	
TBE-Puffer	Tris-Borat-Puffer	
TNase	Thermonuclease	
UV	Ultra-Violett	
Verst.	Verstärkung	

С	Konzentration	[g/L]
I	elektrische Stromstärke	[A]
m	Masse	[g]
Μ	Molarität	[mol]
Р	Leistung	[VV]
S	Sedimentationskoeffizient	[S]
Т	Temperatur	[°C]
t	Zeit	[S]
U	Spannung	[V]
V	Volumen	[L]

## 1 Einleitung

Die Entwicklung neuer Nachweismethoden schwerer Humanerkrankungen stellt einen Schwerpunkt der aktuellen medizinischen Forschung dar. Vielfach ist der Behandlungserfolg von einer frühzeitigen Erkennung abhängig, je früher die Krankheitsursache erkannt wird, desto höher sind die Heilungschancen.

Die dritthäufigste Todesursache in Deutschland ist die Sepsis (KAULEN 2012). In den intensivmedizinischen Stationen der Krankenhäuser ist sie sogar die Todesursache Nr. 1 (WERDAN *et al.* 2005). Als Sepsis bezeichnet WERDAN "die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen" (WERDAN *et al.* 2005, S. 4). Im Ergebnis des septischen Prozesses kommt es zu einem Multiorganversagen, was im Regelfall den Tod des Patienten zur Folge hat.

Bisherige Nachweismethoden zur sicheren Bestimmung der Sepsis benötigen bis zu 48 Stunden, wobei in Zukunft eine mobil einsetzbare Diagnostikeinheit die Infektionsdiagnose innerhalb einer Stunde ermöglichen soll. Dazu wird am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI) in Leipzig derzeit an einem Projekt zur Umsetzung dieses Vorhabens gearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Nukleinsäurevervielfältigung an einer festen Phase in diesem komplexen Nachweissystem untersucht werden.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Für die Umsetzung und Herstellung eines solchen komplexen Nachweissystems für Sepsis gibt es viele Teilbereiche, die zunächst getrennt und dann zusammen untersucht werden müssen. Dazu gehören Elemente des Transports von Substanzen innerhalb des Systems, der Automatisierung, der chemischen Aspekte, des zu verwendenden Materials, der Fertigung und nicht zuletzt ökonomischer Faktoren.

Diese Arbeit setzt sich mit einem Teil der chemischen Aspekte und der Umsetzung der Immobilisierung der Polymerasekettenreaktion (PCR) an einer festen Phase auseinander. Dabei soll die Wahl des Materials der festen Phase beachtet werden. Das Material spielt bei der Fertigung und beim Kostenfaktor eine entscheidende Rolle. Des Weiteren lassen sich durch die Materialwahl die physikalischen und chemischen Eigenschaften der festen Phase beeinflussen.

Ziel ist es, geeignete chemische Verfahren zu entwickeln, die zur Immobilisierung von Oligonukleotiden auf planaren Oberflächen unterschiedlicher Materialien verwendet werden können. Für einen transportablen Schnelltest sollte neben Glas als Standard auch Kunststoff betrachtet werden. Dies ist für eine Einwegverwendung gut geeignet, da es günstiger und bruchsicherer gegenüber Glas ist. Mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten soll die Immobilisierung spezifisch nachgewiesen werden. Anschließend werden Thermostabilitätsunterin Hybridisierungsexperimenten suchungen Form von unter PCR-Temperaturbedingungen damit auf durchgeführt, dieser Grundlage ein experimenteller Aufbau zur Durchführung einer Festphasen-PCR entwickelt werden kann. Dabei steht die Qualität der Ergebnisse im Vordergrund und nicht die quantitative Auswertung von Bindungsreaktionen. Die Charakterisierung der Festphasen-PCR erfolgt im Kontext Sepsis-relevanter, pathogener Erreger wie dem Staphylococcus aureus.

5

## 3 Grundlagen

## 3.1 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) oder auch Nukleinsäurevervielfältigung dient zur Amplifizierung beliebiger Abschnitte des genomischen Materials, die auf dem Prinzip der DNA-Replikation beruht. Ein Zyklus besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, der Anlagerung ("Annealing") der Primer an den DNA-Einzelstrang und der Elongation durch die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase des kurzen gewählten DNA-Bereichs (SAIKI *et al.* 1988).

Nachdem der US-Amerikaner JAMES WATSON und der Brite FRANCIS CRICK 1953 die Doppelhelixstruktur der DNA entdeckt hatten, dauerte es noch bis zum Jahr 1984, bis die Nukleinsäurevervielfältigung, besser bekannt als PCR (Polymerase Chain Reaction, *dt.*: Polymerasekettenreaktion), durch KARY B. MULLIS entwickelt wurde. Die PCR entspricht in ihrem Ergebnis der im Zellkern auf natürlichem Wege ablaufenden DNA-Replikation (GASSEN *et al.*1994).

Bereits MULLIS (1994) stellte fest, dass die PCR im Rahmen von Genanalysen, Therapien und Diagnoseverfahren eine stetig steigende Bedeutung erfährt. Dieser Prozess hält weiterhin an.

NEWTON *et al.* (1994) geben an, dass es bereits Anfang der 1990er Jahre mit Hilfe der PCR möglich war, Spezies und Stamm eines *Staphylococcus* zu identifizieren, dazu reicht bereits eine Zelle je Milliliter aus.

Inzwischen gehört die PCR zu den Standardverfahren in biochemischmolekularbiologischen Laboren und die Fluoreszenzmarkierung, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet wurde (siehe Abschnitt 3.5), hat sich bei der Anwendung in der Microarray-Technologie durchgesetzt (WOLLENBERGER *et al.* 2003).

Die Festphasen-PCR "verlangt drei Hauptbedingungen für die Kopplung der Primer: erstens muss die Kopplung den wiederholten Heiz- und Kühlzyklen standhalten, zweitens muss der Primer an seinem 5'-Ende immobilisiert werden, da die DNA-Polymerase nur an freien 3'-OH-Enden synthetisieren kann und drittens muss die immobilisierte Primerdichte ausreichend hoch für eine Detektion der gebildeten PCR-Produkte sein" (MARSCHAN 2005, S. 13). In der Abbildung 1 ist das Schema einer Festphasen-PCR veranschaulicht.



Abbildung 1: Schema einer Festphasen-PCR (MARSCHAN 2005, S. 78)

Nach der Denaturierung der DNA-Matrize [1] hybridisiert ein Matrizeneinzelstrang an den komplementären immobilisierten Primer an der Oberfläche [2]. Bei der nachfolgenden Elongation wird durch das Wirken der DNA-Polymerase der immobilisierte Primer verlängert [3-4]. Im nächsten Zyklus wird der zuvor hybridisierte Matrizenstrang vom immobilisierten Primer und dem neu synthetisierten Strang (blau) denaturiert [5], sodass nun der Gegenprimer (in Abbildung 1 dargestellt mit Fluoreszenzmarkierung) an den immobilisierten Strang hybridisieren [6] und verlängert [7-8] werden kann. Mit Ablauf mehrerer PCR-Zyklen werden so immobilisierte PCR-Produkte auf der Oberfläche generiert (MARSCHAN 2005).

#### 3.2 Das Bakterium *Staphylococcus aureus*

Das zu den gram-positiven Bakterien zählende *S. aureus* gehört zur Familie der Staphylococcaceae (Abbildung 2) und ist ein rund 0,5 bis 1,5 µm großer, kugelförmiger und bewegungsunfähiger Erreger, der sich häufig zu sogenannten Kokkenhaufen zusammenlagert (LINDSAY 2008). *S. aureus* ist fakultativ aerob, katalasepositiv, gelb pigmentiert und nicht in der Lage Sporen zu bilden (FUCHS *et al.* 2007). Domäne: Bacteria Abteilung: Firmicutes Klasse: Bacilli Ordnung: Bacillales Familie: Staphylococcaceae Gattung: Staphylococcus Art: Staphylococcus aureus [Rosenbach 1884]

```
Abbildung 2: Systematische Einordung von Staphylococcus aureus (nach FORCHHEIM 2009)
```

Nach REINHART *et al.* (2010) ist das Bakterium *Staphylococcus aureus* einer der Haupterreger der Sepsis.

*S. aureus* kann in den Schleimhäuten des Menschen (Atem-, Urogenital- und Verdauungstrakt) vorkommen, ohne weitere Krankheiten auszulösen. Erst beim Vorhandensein bestimmter prädisponierender Faktoren, wie einem geschwächten Immunsystem oder Verletzungen der Haut, kann der Erreger seine pathogene Wirkung entfalten (KLUYTMANS 2010). Das Bakterium bildet verschiedene Gifte, die Blut und Gewebe zersetzen (GOTTSCHALK 2012).

Die vornehmlich in Krankenhäusern auftretende Form eines Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stammes (MRSA) führt zu schwerwiegenden Infektionen und erschwert die Behandlung der Patienten erheblich (DEURENBERG *et al.* 2007). *S. aureus* kann alle menschlichen Organe befallen und ist Auslöser vieler Infektionen, wie kein anderer Erreger (ARCHER 1998).

### 3.3 Primerpaarungen

Das *nuc*-Primerpaar, welches in dieser Arbeit zur Durchführung der Festphasen-PCR verwendet wurde, ist spezifisch für ein bestimmtes Gen des *Staphylococcus aureus*. Das *nuc*-Gen codiert die thermostabile Nuclease von *S. aureus* und ist nur für diesen Erreger spezifisch. Aus diesem Grund hatten bereits BRAKSTAD *et al.* (1992) erfolgreich Versuche unter Zuhilfenahme der PCR zum Nachweis von *S. aureus* durchgeführt. Dabei heben sie die Vorzüge dieser Variante gegenüber der Nachzucht auf Nährböden hervor, da diese mit kleinsten Erregermengen innerhalb relativ kurzer Zeit zu einem sicheren Nachweis führt. BRAKSTAD *et al.*  (1992) konnten nachweisen, dass die Thermonuclease (TNase) bei allen Staphylococcus aureus Stämmen nachzuweisen ist, jedoch nicht bei anderen Für diese Bakterien sind andere Nachweisverfahren Bakterienstämmen. notwendig. Der Nachweis der TNase gelingt in Blut, Urin, Synovialflüssigkeit zerebrospinaler (Gelenkflüssigkeit) und Flüssigkeit. Die Intensität der Nachweisreaktion ist jedoch von der Anzahl der S. aureus Erreger im zu testenden Material abhängig. BRAKSTAD et al. (1992) heben noch einmal hervor, wie wichtig eine schnelle Diagnose ist, um eine zielgerichtete Behandlung einzuleiten.

TGTCTCGATA TGATAGTCTG CAACGATTCA TGTTGTAGGC TATTTAATTT TACAAATAAG GCTAAATATA TAAGTTCTGA CACCTAAAAT

Abbildung 3: Nukleotidsequenz des *Staphylococcus*-Nuclease-Gens (*nuc*) (SHORTLE 1983, S. 185)

Die in der Abbildung 3 rot unterstrichene Nukleotidsequenz ist die Bindungsstelle des *P Nuc capture probe* an den codogenen DNA-Strang. Blau unterstrichen ist die Nukleotidsequenz auf dem codogenen DNA-Strang, wo der *Amino/Cy3/-Cy5 nuc rev* an den komplementären DNA-Strang bindet. Daraus ergibt sich bei einer PCR ein Produkt von 180 bp.

Das 16S rRNA-Gen besteht aus Regionen, die alle Eubakterien besitzen, und aus anderen Regionen, die extrem Spezies-spezifisch sind (KRIMMER *et al.* 1999). Bei der Verwendung entsprechender Gensonden ist es möglich entweder alle bakteriellen Krankheitserreger zu erkennen oder gezielt einzelne Bakterienarten zu identifizieren, wenn hoch spezifische Sonden eingesetzt werden. Die für die Hybridisierungsversuche verwendete *DG74*-Primerpaarung, welche unter anderem in den Arbeiten von WILSON *et al.* (1990) und KLAUSEGGER *et al.* (1999) beschrieben ist, sowie die unveröffentlichte Primerpaarung *16S\_Stau\_95-110\_F* und *16S\_Stau\_284-300\_R*, die im Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) designt wurde, sind Spezies-spezifisch für *S. aureus*.

#### 3.4 Oberflächenmodifikation

Die Oberflächenmodifikation eines Materials ist ein wichtiger Teilschritt für Arbeiten an einer festen Phase. Sie schafft die Voraussetzung, dass Moleküle an eine Oberfläche gebunden werden können. In dieser Arbeit wurden zur Oberflächenmodifikation die Objektträger mittels 8 M NaOH beziehungsweise durch UV-Bestrahlung aktiviert (Abbildung 4).



Abbildung 4: Modifizierung der Materialoberfläche (MÖLLER 2006, S. 17)

Das Ziel dabei war OH-Gruppen an der Oberfläche zu erzeugen, an denen das 3-Aminopropyltriethoxysilan (ATPS) unter Abspaltung von Ethanol binden kann. Werden auf der silanisierten Oberfläche eines Objektträgers die Proben zur Analyse aufgebracht, kann dies als Microarray oder auch Biochip, DNA-Chip oder Genchip bezeichnet werden. Ein solches auf einen Träger aufgebrachtes, biologisches Assay muss nach SCHENA (2003) vier Kriterien für die Bezeichnung Microarray erfüllen: Planar, mikroskopisch klein, geordnet und spezifisch. "Eine geordnete Anordnung der einzelnen Proben auf einem Mikroarray ermöglicht eine automatisierte Produktion, Inkubation und Detektion der Chips" (MÖLLER 2006, S. 17). Die einzelnen Proben-Spots sollten auf dem Chip beziehungsweise Objektträger in einem definierten geometrischen Raster (Zeilen und Spalten) aufgebracht werden, damit jedem Proben-Spot eine einzigartige, definierte Position zugewiesen werden kann (MÖLLER 2006). Nach MÖLLER (2006) sollten zudem alle Spots auf dem Chip die gleiche Größe besitzen.

#### 3.5 Analyseverfahren

Die Auswertung des bei der PCR entstandenen Produkts kann direkt über Fluoreszenzmessung sowie relativer Größenbestimmung oder indirekt über enzymatische Reaktionen bestimmt werden. Die Form der PCR bestimmt dabei die mögliche Analysemethode. Die Produkte, der in dieser Arbeit angewendeten *In-situ-*PCR, wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. Jene Produkte der Festphasen-PCR direkt über Fluoreszenzmessung.

#### Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese kommt es im elektrischen Feld zur Auftrennung von Nukleinsäuregemischen durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten der geladenen Moleküle auf Grund unterschiedlicher Größe und Ladung. Davon hängt hauptsächlich die Wahl des Trägermaterials ab. "Agarose ist das wichtigste Trägermaterial für die Elektrophorese von Nukleinsäuren" (LOTTSPEICH et al. 2006, S. 664). Die Beweglichkeit und Wandergeschwindigkeit der Nukleinsäuren werden von deren Gewicht und Form (superhelikal, offen, doppelsträngig oder einzelsträngig) beeinflusst. Die Wandergeschwindigkeit linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente, die bei einer PCR mit S. aureus als Produkt entstehen, hängt zusätzlich von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und der Art des Laufpuffers ab. LOTTSPEICH et al. (2006) beschreiben eine geeignete Agarosekonzentration von 1,5-2 % für eine optimale Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 100-3000 bp. Die Wahl des Laufpuffers fiel auf den Tris-Acetat-(TAE-)Puffer, da mit diesem die DNA-Banden schärfer laufen als bei dem Tris-Borat-(TBE-)Puffer und somit qualitativ bessere Ergebnisse erzielt werden konnten (LOTTSPEICH et al. 2006).

#### Fluoreszenzmessung

Um ein spezifisches PCR-Produkt an der festen Phase einfach detektieren zu können, sollte ein Teil des PCR-Produktes fluoreszenzmarkiert sein. Dafür bietet sich der frei im PCR-Mix-Ansatz bewegliche Gegenprimer an. "Fluoreszenz ist primär dadurch charakterisiert, dass bestimmte Atome oder Moleküle (Fluoro-

phore) nach Absorption energiereichen Lichts Photonen mit längerer Wellenlänge abgeben, und das entsprechende Molekül daraufhin mit einer anderen Wellenlänge gegenüber dem absorbierten Licht fluoresziert" (MÜLLER *et al.* 2004, S. 78).

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore Indocarbocyanin (Cy3) und Indodicarbocyanin (Cy5) sind zwei der gebräuchlichsten Fluoreszenzfarbstoffe, deren Struktur und Absorptions- sowie Emissionsspektren in Abbildung 5 dargestellt sind.



Abbildung 5: Struktur und Spektren der Fluoreszenzmarker (EXIQON 2012a u. b) a) Cy3-Fluoreszenzfarbstoff b) Cy5-Fluoreszenzfarbstoff

Wie in der Strukturabbildung der beiden Fluorophore zu sehen ist, besitzen Cy3 neun und Cy5 zehn konjugierte Doppelbindungen, was zu einem "Shift" der Absorptionswellenlänge in das sichtbare Licht führt (Müller *et al.* 2004).

Um den fluoreszenzmarkierten Gegenprimer, welcher mit dem PCR-Produkt an der Oberfläche des Microarrays gebunden ist, zu detektieren, wird ein Microarray Scanner eingesetzt. Der Aufbau eines solchen Scanners ist in der Abbildung 6 dargestellt. Neben dem Laser zur Anregung des Fluorophores und der Filter für die Reglung der Anregungswellenlänge, ist vor allem das Photomultiplier-Tube (PMT) von Bedeutung. In diesem Element "wird das elektromagnetische Licht-

signal in ein analoges, elektrisches Signal umgewandelt und verstärkt" (MÜLLER et al. 2004, S. 88).



Abbildung 6: Prinzip eines Microarray-Laser-Systems (MÜLLER et al. 2004, S. 86)

## 4 Material und Methoden

## 4.1 Material

## 4.1.1 Objektträger

Als Material der festen Phase für die PCR und die Hybridisierungs- sowie Thermostabilitätsexperimente wurden Glasobjektträger der Firma Menzel sowie Polymerfolien der Firmen ThyssenKrupp Plastics, Coloprint tech-films GmbH Co. KG sowie Bleher Folientechnik, welche selbst auf das Maß eines Plastikobjektträgers gebracht wurden, verwendet. Weitere Produkteigenschaften sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Hersteller/Bezeichnung	Material	B×L×H [mm]	Bemerkung
Menzel-Gläser Diagnostika	Glas mit	25×75×1	Wells: 30
	Polytetrafluoroethylen		Durchm.: 2 mm
	(PTFE) beschichtet		
Menzel-Gläser SuperFrost	Glas	26×76×1	
ThyssenKrupp Plastics	Polymethylmethacrylat	25×76×0,25	
Plexiglas Folie 99524	(PMMA), glänzend		
Coloprint tech-films GmbH	Polycarbonat (PC),	25×76×0,25	
Co. KG Makrofol DE 1-1, CC	glasklar		
Bleher Folientechnik	biaxial-orientiertes	25×76×0,25	einseitige
Optimont® Polyesterfolie	Polyethylenterephthalat		Acrylatbe-
	(BO-PET), glasklar		schichtung

Tabelle 1:	Eigenschaften	der verwendeten	Objektträger
------------	---------------	-----------------	--------------

### 4.1.2 Chemikalien und Biomaterialien

Die verwendeten Chemikalien und Biomaterialien wurden von den Firmen AmpliSens, AppliChem, Fermentas, Linde, Merck, NewEngland BioLabs®Inc., OML, Peqlab, Prolabo, ROTH, Sigma-Aldrich, Dow Corning und Thermo Scientific bezogen (siehe Anhang 1).

Die verwendete genomische *Staphylococcus aureus*-DNA wurde durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Nanotechnologie des Fraunhofer-IZI mit Hilfe des Wizard®

Genomic DNA Purification Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers aus einer im Institut verwendeten Zelllinie isoliert.

Die verwendeten Konzentrationen sind im Abschnitt 4.2 aufgeführt und wurden, wenn nicht anders beschrieben, durch Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt.

Die selbst hergestellten Puffer und Lösungen sind in der nachstehenden Tabelle (Tabelle 2) beschrieben.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
6x Loading Dye	10 mM Tris-HCI (pH 7,6)
	0,03 % Bromphenolblau
	0,03 % Xylencyanol FF
	60 % Glycerol
	60 mM EDTA
PBS pH 7,4	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,4 einstellen
PBS/Tween	PBS + 0,05 % Tween 20
TAE-Puffer	0,04 M Tris-Base
	1 mM EDTA
	1,4 mL/L Eisessig
	pH 8,3 einstellen

Tabelle 2: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

### 4.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide beziehungsweise Primer für die Hybridisierungsexperimente und die PCR wurden lyophilisiert von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und entsprechend der Angaben des Herstellers mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM resuspendiert. In der Tabelle 3 wurden alle verwendeten Oligonukleotide geordnet nach der funktionellen Modifizierung am 5'-Ende aufgelistet. Tabelle 3: Sequenzen und 5'-Modifikationen der verwendeten Oligonukleotide

A - Adenin, C - Cytosin, G - Guanin, T - Thymin, (GA)<sub>10</sub> - Spacer aus 10×GA

[AmC6F] - Amine C6 TFA (Desalt, PAGE) , [Cy3] - Indocarbocyanin, [Cy5] – Indodicarbocyanin, [Phos] Phosphorylierung

Bezeichnung	Sequenz 5'> 3'	Länge
Amino (GA) <sub>10</sub> 16S_Stau_95-110_F	[AmC6F] GA GAT GTT AGC GGC GGA C	36mer
Amino (GA) <sub>10</sub> 16S_Stau_284-300_R	[AmC6F] GA TCT CAG GTC GGC TAT GC	37mer
Amino (GA) <sub>10</sub> DG74	[AmC6F] GA GA GA GA GA GA GA GA GA AGG AGG TGA TCC AAC CGC A	39mer
Amino nuc capture probe	[AmC6F] GGT GTA GAG AAA TAT GGT CCT GAA GCA AGT GCA	33mer
Amino nuc rev	[AmC6F] AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	24mer
165 Stair 05-110 F CV3	וראזו פעד פבר פפר פפע ר	16mar
16S_Stau_284-300_R_Cy3	[Cy3] TCT CAG GTC GGC TAT GC	17mer
Cy3 nuc rev	[Cy3] AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	24mer
Cy5 nuc rev	[Cy5] AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	24mer
Cy3-compl DG74	[Cy3] TGC GGT TGG ATC ACC TCC T	19mer
Cy5-compl DG74	[Cy5] TGC GGT TGG ATC ACC TCC T	19mer
Phosphor (GA) <sub>10</sub> DG74	[Phos] GA GA GA GA GA GA GA GA AGG AGG TGA TCC AAC CGC A	39mer
P Nuc capture probe	[Phos] GGT GTA GAG AAA TAT GGT CCT GAA GCA AGT GCA	33mer

### 4.1.4 Technische Ausrüstung und Gebrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendete technische Ausrüstung und verwendetes Gebrauchsmaterial sind im Anhang 2 aufgelistet.

#### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Aktivierung der Objektträger

Die Aktivierung der Oberfläche erfolgte abhängig vom verwendeten Material.

### Glasobjektträger

Zur Aktivierung der Glasobjektträger wurden diese für 5 Minuten beziehungsweise 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) in 8 M NaOH gestellt. Nach der Inkubation wurde gründlich mit destilliertem Wasser oder Ethanol gespült. Die mit destilliertem Wasser gespülten Glasobjektträger wurden bei 120 °C im Universalofen für 10 Minuten und die mit Ethanol gespülten Glasobjektträger an der Luft getrocknet.

### Plastikobjektträger

Die Aktivierung der Plastikobjektträger erfolgte mittels zwei verschiedener Methoden. Die erste Methode erfolgte analog zu den Glasobjektträgern. Dazu wurden die Plastikobjektträger für 1 Stunde bei RT in 8 M NaOH gestellt. Nach der Inkubation wurde die Oberfläche gründlich mit Ethanol gespült und an der Luft getrocknet.

Die zweite Methode orientierte sich an der Veröffentlichung von SOPER *et al.* (2005). Zunächst wurden die Plastikobjektträger gründlich mit Isopropanol, dann mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff getrocknet. Durch die 30minütige Bestrahlung mit einer UV-Lampe (Osram, 15 W) im Abstand von ca. einem Zentimeter wurde versucht eine UV-Modifizierung der Oberfläche zu realisieren.

### 4.2.2 Silanisierung der Objektträger

Die Silanisierung erfolgte unmittelbar nach der Aktivierung. Dazu wurden die Objektträger für eine Stunde in Aceton versetzt mit 5 % 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS) gestellt und bei RT inkubiert. Die ATPS-Lösung wurde stets frisch hergestellt. Anschließend erfolgte ein gründliches Waschen mit Aceton. Zur Aushärtung beziehungsweise Quervernetzung des Silans wurden die Objektträger für 15 Minuten beziehungsweise eine Stunde bei 120 °C in den Universalofen gestellt. Nach dem Abkühlen wurden die fertig silanisierten Objektträger im Kühlschrank bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.2.3 Herstellung des Polydimethylsiloxan (PDMS)

Die zwei Komponenten, Sylgard® 184 Silicone Elastomer Curing Agent und Sylgard® 184 Silicone Elastomer, wurden im Verhältnis 1:10 gemischt (Dow CORNING 2007). Vorsichtig wurde die zähe, klebrige Masse auf eine Schablone gegossen und für ca. eine Stunde bei 65 °C im Universalofen ausgehärtet.

Erst kurz vor dem Gebrauch wurde die PDMS-Matrix von der Schablone gelöst und direkt auf den silanisierten Objektträger festgedrückt, um eine optimale Haftung zu erzielen.

#### 4.2.4 Immobilisierung der Oligonukleotide

Zur Immobilisierung der Oligonukleotide wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt. Die Konzentration der Oligonukleotide in der Immobilisierungslösung betrug dabei 30  $\mu$ M. "Eine optimale Konzentration unter Berücksichtigung von möglichen verminderten Kopplungsreaktionen liegt im Bereich von 30-50  $\mu$ M" (MARSCHAN 2005, S. 48).

#### DSS und BS<sup>3</sup>

Zunächst erfolgte die Herstellung von 20 mM Crosslinker-Lösungen. Dazu wurden 7,4 mg/mL DSS in Dimethylsulfoxid (DMSO) beziehungsweise 11,4 mg/mL BS<sup>3</sup> in destilliertem Wasser gelöst (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. 2011).

Auf die silanisierten Objektträger wurden nach einem bestimmten Muster (Abbildung 7) DSS-Spots beziehungsweise BS<sup>3</sup>-Spots aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei RT wurde mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff die Oberfläche getrocknet. Anschließend wurden die Oligonukleotide mit einer Konzentration von 30 µM nach demselben Muster wie das DSS beziehungsweise BS<sup>3</sup> gespottet. Nach 30-minütiger Inkubation wurde mit PBS/Tween gewaschen, dann gründlich mit destilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.

### EDC/Methylimidazol

Diese Immobilisierungsvariante wurde in Anlehnung an die Methode von MARSCHAN (2005) und VON NICKISCH-ROSENEGK *et al.* (2005) durchgeführt. Dazu wurde eine Primerlösung aus 30 mM 1-Methylimidazol (pH 6,0/HCl) mit 30 % 100 µM Oligonukleotid, 5 mg/mL EDC und 25 % DMSO hergestellt, welche nach einem bestimmten Spot-Muster (Abbildung 7) auf die silanisierten Objektträger aufgebracht wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer Feuchtekammer. Anschließend wurden die Spots mit PBS/Tween abgespült und die Objektträger zur Hydratisierung für 10 Minuten in 65 °C warme PBS/Tween-Lösung getaucht. Danach wurde gründlich mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff getrocknet.

### Spot-Muster

Bei den Menzel-Gläser Diagnostika Glasobjektträgern wurde nach dem Muster der Wells gespottet. Für die ersten Versuche einer PCR und die ersten Hybridisierungstests mit den Menzel-Gläser SuperFrost wurde eine PDMS-Matrix (Abbildung 7a) aufgebracht, die das Spot-Muster bestimmte.





a) Foto: PDMS-Matrix b) Hybridisierungsmuster c) PCR-Muster

Für die weiteren Hybridisierungsversuche auf den SuperFrost Glas- sowie Plastikobjektträgern wurde die Schablone in Abbildung 7b und für die Thermosta-

bilitätsversuche sowie die PCR mit dem Frame-Seal™ Incubation Chamber die Vorlage in der Abbildung 7c verwendet.

Unspezifisch bedeutete in dieser Arbeit nicht, dass die verwendeten Oligonukleotide nicht spezifisch für den *Staphylococcus aureus* waren. Es bezeichnete die Kombination der immobilisierten Oligonukleotide gegenüber den aufgetragenen, frei beweglichen Oligonukleotiden. Unspezifität liegt vor, wenn immobilisierter und frei beweglicher Primer identisch, sich auf dem gleichen DNA-Einzelstrang anlagern oder sich nicht zu einem Primerpaar ergänzen lassen. Für die Hybridisierungs- und Thermostabilitätsuntersuchungen wurde das komplementäre *DG74*-Primerpaar für die spezifische Reaktion verwendet. Das *nuc*-Primerpaar, welches bei der PCR zum Einsatz kam, ist spezifisch für eine bestimmte Sequenz im Genom des *Staphylococcus aureus*.

#### 4.2.5 Blocken

Das Blocken der um die Spots der immobilisierten Oligonukleotide noch reaktiven Silanoberfläche erfolgte für die Kopplungsmethoden unterschiedlich.

#### DSS und BS<sup>3</sup>

Die mit Oligonukleotiden immobilisierten Objektträger wurden für 30 Minuten in eine 1 % BSA-Lösung getaucht. Anschließend wurde gründlich mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff getrocknet. Diese allgemein verbreitete Blockungsmethode mit BSA ist unter anderem bei REHM *et al.* (2010) beschrieben.

#### EDC/Methylimidazol

Für das Blocken dieser Kopplungsmethode wurden 2 g Bernsteinsäureanhydrid in 50 mL Dimethylformamid (DMF) gelöst (VON NICKISCH-ROSENEGK *et al.* 2005). Darin wurden die Objektträger für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde gründlich mit destilliertem Wasser gespült und mit Hilfe von Stickstoff getrocknet.

#### 4.2.6 Hybridisierungstest

Für die Hybridisierungsexperimente wurden die komplementären Primerpaare DG74 verwendet. Dazu wurde der Amino (GA)<sub>10</sub> DG74 beziehungsweise der Phosphor (GA)<sub>10</sub> DG74 als spezifischer und der Amino (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_284-

*300\_R* beziehungsweise der *P Nuc capture probe* als unspezifischer Bindungspartner nach den oben beschriebenen Methoden immobilisiert. Gespottet wurde in die PDMS-Matrix (Abbildung 7a) nach dem Hybridisierungsmuster (Abbildung 7b) ein Volumen von 5 μL und ohne PDMS-Matrix nach der Vorlage in der Abbildung 7b ein Volumen von 2 μL mit jeweils 30 μM Primerlösung. *Cy3-compl DG74* oder *Cy5-compl DG74* wurde anschließend in einer Konzentration von 30 μM nach dem zuvor verwendeten Muster gespottet und eine halbe Stunde inkubiert. Danach wurde mit PBS/Tween bei ca. 40 °C für 30 Minuten unter Schütteln gewaschen. Abschießend wurde mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff getrocknet. Zur Auswertung wurden die Objektträger gescannt.

#### 4.2.7 Thermostabilitätstest

Mit den gleichen Primerpaarungen, wie sie bei den Hybridisierungstests Verwendung fanden, wurden die Thermostabilitätstests durchgeführt. Dazu wurden die zu immobilisierenden Oligonukleotide wie in der Abbildung 7c dargestellt gespottet und das Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chamber aufgeklebt. Mit 30 µM fluoreszenzmarkiertem Primer wurde die Kavität zwischen dem Rahmen und der Abdeckung gefüllt. Zum Testen der Thermostabilität der Kopplungen wurde auf dem AmpliSpeed das PCR-Temperaturprofil (Tabelle 4) durchgeführt. Nach dem Durchlauf wurde das Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chamber entfernt, der Objektträger für eine halbe Stunde bei ca. 40 °C unter Schütteln mit PBS/Tween gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff getrocknet. Zur Auswertung wurden die Objektträger gescannt.

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	15 s	
Annealing	53 °C	30 s	40
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	3 min	1
Stopp	20 °C	1 min	-

Tabelle 4: Verwendetes PCR-Temperaturprofil für die Thermostabilitätstests

### 4.2.8 Methode der PCR

Bei der Durchführung der PCR wurden alle Assay-Komponenten in einen PCR-Tube (200 µL) pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 50 µL beziehungsweise 120 µL angesetzt wurde. Genutzt wurden die Lösungen der Firma Peqlab. Die PCR-Mix-Zusammensetzung wurde in der AG Nanotechnologie des Fraunhofer IZI entwickelt, optimiert und in dieser Arbeit verwendet.

Für die ersten Versuche einer PCR an einer festen Phase wurden die beiden in der Tabelle 5 dargestellten Primerpaarungen verwendet.

Beweglichkeit	Primerpaarung 1	Primerpaarung 2
immobilisiert an Festphase	Amino (GA)₁₀ 16S_Stau_95-110_F	Amino (GA)₁₀ 16S_Stau_284-300_R
freibeweglich im PCR-Mix	16S_Stau_284-300_R_Cy3	16S_Stau_95-110_F_Cy3

Tabelle 5: Primerpaarungen für die ersten PCR-Versuche

Diese ersten Experimente wurden nur auf den Glasobjektträgern durchgeführt. Dazu wurden je 2 µL des PCR-Mixes "Ampli 1" (Tabelle 9) in die Wells der Menzel-Gläser Diagnostika pipettiert und mit 5 µL PCR-Öl abgedeckt. Die Menzel-Gläser SuperFrost wurden mit einer PDMS-Matrix versehen, in deren Kavitäten je 5 µL des PCR-Mixes "Ampli 1" (Tabelle 9) pipettiert und mit 10 µL PCR-Öl abgedeckt wurden. Umgehend wurde der PCR-Ablauf aus Tabelle 4 durchgeführt. Nach dem Durchlauf wurden die Glasobjektträger für eine halbe Stunde bei ca. 40 °C unter Schütteln mit PBS/Tween gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff getrocknet.

Nach verschiedenen Optimierungsschritten fand die Primerpaarung *P Nuc capture probe* als immobilisierter forward und *Cy3*- beziehungsweise *Cy5 nuc rev* als im PCR-Mix frei beweglicher reverse Primer Verwendung. Für die Bestimmung der Annealingtemperatur des gewählten *nuc*-Primerpaares wurde eine Gradienten-*in-situ*-PCR im Thermocycler TProfessional (Biometra) durchgeführt, deren PCR-Mix-Ansatz "Thermo" (Tabelle 6) und deren Ablauf (Tabelle 7) unten dargestellt ist.

Reagenzien	cEnde	Thermo
	1x Mix	[µL]
10x PCR Puffer Y	1x	12
dNTP (10 mM each)	0,2 mM	2,4
forward Primer (30 µM)	0,6 µM	2,4
reverse Primer (30 µM)	0,6 µM	2,4
gDNA (1 ng/µL)	0,02 ng	2,4
Taq Polymerase (5 u/µL)	0,05 u	1,2
0,12 % BSA und 0,4 % Tween 20	0,06 % BSA und 0,2 % Tween 20	60
ddH <sub>2</sub> O	variabel	37,2
Gesamtvolumen		120

Tabelle 6: Ansatz des PCR-Mixes für den Thermocycler TProfessional

Tabelle 7: Ablauf des Thermocycler TProfessional-Programms

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	15 s	
Annealing	Gradient	30 s	40
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	3 min	1
Stopp	20 °C	1 min	-

Das Gesamtvolumen von 120 µL wurde auf sechs PCR-Tubes zu je 20 µL aufgeteilt. Die Tubes wurden gleichmäßig im Block des Thermocycler TProfessional mit 12 Reihen über einen Temperaturgradienten von 52-62 °C verteilt (Tabelle 8). Die belegten Reihen sind in der Tabelle grau hinterlegt.

Tabelle 8: Temperaturgradient der Gradienten-in-situ-PCR

Reihe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T [°C]	52	52,3	53	54	55,2	56,4	57,6	58,8	60	61	61,7	62

Zur Auswertung dieses *In-situ*-PCR-Produktes wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Festphasen-PCR wurde mit dem AmpliSpeed slide cycler (Beckman Coulter früher Advalytix) realisiert. Zunächst wurde mit dem PCR-Mix-Ansatz "Ampli 2"

(Tabelle 9) und der, laut Ergebnis der Gradienten-*in-situ*-PCR, optimalen Annealingtemperatur des gewählten *nuc*-Primerpaares die Wärmeübertragung des AmpliSpeeds an den Objektträger getestet. Dazu wurde ein silanisierter PET-Objektträger geblockt und mit einem Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chamber versehen, in welches der PCR-Mix-Ansatz "Ampli 2" (Tabelle 9) pipettiert wurde. Das in der Tabelle 10 dargestellte AmpliSpeed slide cycler-Programm wurde umgehend durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Abdeckung des Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chambers vorsichtig entfernt, das *In-situ*-PCR-Produkt in einen PCR-Tube überführt und eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Für die eigentliche Durchführung der Festphasen PCR wurden die PCR-Mix-Ansätze "Ampli 1" und "Ampli 3" (Tabelle 9) mit dem in Tabelle 10 dargestellten AmpliSpeed slide cycler-Programm durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger nach dem Spot-Muster in Abbildung 7c hergestellt und die PCR im Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chamber durchgeführt. Anschließend wurde das Incubation Chamber entfernt, die Objektträger für eine halbe Stunde bei ca. 40 °C unter Schütteln mit PBS/Tween gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff getrocknet. Zur Auswertung des Festphasen-PCR-Produkts wurden die Objektträger gescannt.

Reagenzien	cEnde	Ampli 1	Ampli 2	Ampli 3
	1x Mix	[µL]	[µL]	[µL]
10x PCR Puffer Y	1x	5	5	5
dNTP (10 mM each)	0,2 mM	1	1	1
forward Primer (30 µM)	0,6 µM	0	1	0
forward Primer (1 µM)	0,01 µM	0	0	0,5
reverse Primer (30 µM)	0,6 µM	1	1	1
gDNA (1 ng/µL)	0,02 ng	1	1	1
Taq Polymerase (5 u/µL)	0,05 u	0,5	0,5	0,5
0,12 % BSA und 0,4 % Tween 20	0,06 % BSA und 0,2 % Tween 20	25	25	25
ddH <sub>2</sub> O	variabel	16,5	15,5	16
Gesamtvolumen		50	50	50

Tabelle 9: Ansätze des PCR-Mixes für den AmpliSpeed slide cycler

			-
Phase	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	55 °C	30 s	40
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	3 min	1
Stopp	20 °C	1 min	-

Tabelle 10: Ablauf des AmpliSpeed slide cycler-Programms

#### 4.2.8 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung des in der *In-situ-*PCR entstandenen Produkts genutzt.

Eine Trennung wurde horizontal mit Hilfe eines 1-2 %igen Agarosegels realisiert. Dazu wurde 1-2 % Agarose durch Erhitzen in 1x TAE-Puffer gelöst und nach kurzer Abkühlung mit 3 µL des Fluorophors Ethidiumbromid (1 M) versetzt. Zum Aushärten wurde das flüssige Gelgemisch in die Gelkammer gegeben und ca. 30 Minuten stehen gelassen. Danach wurde das feste Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. In die Geltaschen wurden die mit 1x Loading Dye versetzten Proben und 3 µL der GeneRuler™ Low Range DNA Ladder als Marker pipettiert. Nach Einstellen der Gelelektrophoreseapparatur (Tabelle 11) und dem Anlegen einer Spannung erfolgte die elektrophoretische Auftrennung.

Tabelle 11: Einstellungen der Gelelektrophorese

Größe	Einstellungen
Spannung	140 V
Strom	150 mA
Leistung	21 W
Zeit	35 Minuten

Anschließend wurden die Banden auf dem Gel durch das UV-System Gel iX Imager sichtbar gemacht.

## 4.2.9 Microarray Scanner

Die Objektträger wurden mit dem Microarray Scanner GenePix 4200A gescannt. Die Scans erfolgten unter den in der Tabelle 12 aufgeführten Einstellungen.

Parameter	Fluoreszenzfarbstoff Cy3	Fluoreszenzfarbstoff Cy5
Wellenlänge	594	635
Filter	532R	635R
Laserleistung	100	100
PMT Verstärkung	variabel	variabel

Tabelle 12: Einstellungen am Microarray Scanner GenePix 4200A

Die unterschiedlich eingestellten Verstärkungen beim Scannen sind jeweils im Dateinamen des aufgenommenen Bildes vermerkt.

# 5 Versuchsergebnisse und Diskussion

## 5.1 Optimierung der Aktivierung, Silanisierung und Immobilisierung

## 5.1.1 Erste PCR-Versuche mit Glasobjektträgern

Ziel dieser Untersuchung war eine erste Durchführung einer Festphasen-PCR an herkömmlich verwendeten Glasobjektträgern.

Experimente wurden nur auf den Glasobjektträgern Menzel-Gläser Die Diagnostika und SuperFrost durchgeführt. Die Aktivierung der Oberfläche erfolgte durch fünfminütige Inkubation in 8 M NaOH und Spülung mit destilliertem Wasser. Anschließend wurde die Oberfläche silanisiert und die Quervernetzung des Silans durch 15-minütige Behandlung im Universalofen bei 120 °C realisiert. Die Oligonukleotide Amino (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_95-110\_F und Amino (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_ 284-300\_R wurden mit der DSS- oder EDC/Methylimidazol-Kopplung auf der silanisierten Glasoberfläche nach dem PCR-Muster (Abbildung 7c) immobilisiert. Anschließend wurde der PCR-Mix "Ampli 1" (Tabelle 9) mit dem 16S\_Stau\_95-110\_F\_Cy3 beziehungsweise 16S\_Stau\_284-300\_R\_Cy3 als reverse Primer nach dem zuvor verwendetem Muster gespottet und mit PCR-Öl abgedeckt. Danach erfolgte die Durchführung der Festphasen-PCR mit dem AmpliSpeed slide cycler-Programm aus Tabelle 4. In der Abbildung 8 ist das Ergebnis der optischen Auswertung nach der PCR mit der DSS- und in Abbildung 9 jenes mit der EDC/Methylimidazol- Kopplungsmethode dargestellt.



Abbildung 8: Ergebnis des PCR-Versuchs mit der DSS-Kopplungsmethode a) schematische Darstellung b) Originalaufnahme

In der Reihe I (Abbildung 8 u. Abbildung 9) wurde der *Amino* (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_95-110\_F gespottet, in Reihe II der *Amino* (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_284-300\_R. Im Bereich A (Abbildung 8) wurde als frei bewegliches Oligonukleotid der 16S\_Stau\_95-110\_F\_Cy3 eingesetzt, im Bereich B der 16S\_Stau\_284-300\_R\_ Cy3. Aus diesem Ergebnis konnte keine Aussage über eine spezifische Reaktion des frei beweglichen Oligonukleotids getroffen werden. Nur im Bereich B könnte eine höhere Spezifität vermutet werden. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen die im Bereich B als spezifisch angenommene Primerpaarung verwendet. In einem Versuch mit der EDC/Methylimidazol-Kopplungsmethode (Abbildung 9) konnte jedoch ebenfalls keine Aussage über eine spezifische Reaktion getroffen werden. Eine Ursache für die fast gleichmäßig leuchtenden Spots könnten Verklebungen des verwendeten PCR-Öls mit den Cy3-makierten Oligonukleotiden an der Oberfläche sein.



Abbildung 9: Ergebnis des PCR-Versuchs mit der EDC/Methylimidazol-Kopplung a) schematische Darstellung b) Originalaufnahme

#### 5.1.2 Hybridisierungsexperimente auf Glasobjektträgern

Nachdem ohne Voruntersuchungen eine PCR an einer festen Phase durchführt wurde, erfolgten auf Grund der nicht aussagekräftigen Ergebnisse im Abschnitt 5.1.1 Hybridisierungstests. Ziel dieser Experimente war die Ermittlung einer optimalen Kopplungsmethode der Oligonukleotide an die feste Phase. Für eine spätere Durchführung einer Festphasen-PCR wurden an die OligonukleotidKopplung folgende Anforderungen gestellt: Gute, spezifische Hybridisierungseigenschaften, Thermostabilität unter PCR-Temperaturbedingungen sowie eine dazugehörige, effektive Blockungsmethode.

Für die folgenden Optimierungsschritte wurden die Menzel-Gläser SuperFrost verwendet. Dazu wurden zunächst die Glasobjektträger mit einer PDMS-Matrix (Abbildung 7a) versehen um definierte Bereiche für die Immobilisierung zu generieren. Es wurden die Kopplungsmethoden DSS und EDC/Methylimidazol getestet, jedoch konnte teilweise ein Verlaufen der Immobilisierungslösungen durch eventuell auftretende Kapillarkräfte nicht ausgeschlossen werden (siehe auch Anhang 3). Ein weiterer Nachteil dieser Variante war die für die Immobilisierung und Hybridisierung relativ große Menge an benötigter Oligonukleotid-Lösung. Um einen besseren Vergleich der Immobilisierungskopplungen mit DSS, BS<sup>3</sup> und EDC/Methylimidazol zu erzielen, wurden die Primerlösungen auf die Menzel-Gläser Superfrost nach dem Hybridisierungsmuster (Abbildung 7b) frei gespottet. Damit konnte die Menge der benötigten Oligonukleotid-Lösung verringert und damit auch Kosten eingespart werden. Das Ergebnis der optischen Auswertung dieses Vergleichs ist in der Abbildung 10 verdeutlicht.



Abbildung 10: Kopplungsmethodenvergleich (Verstärkung: 380) a) DSS b) BS<sup>3</sup> c) EDC/Methylimidazol

In Reihe I (Abbildung 10) wurde jeweils der *Amino*  $(GA)_{10}$  *DG74* (spezifisch) immobilisiert, in Reihe II der *Amino*  $(GA)_{10}$  16S\_Stau\_284-300\_R (unspezifisch) und in Reihe III kein Oligonukleotid. Zur Hybridisierung wurde der *Cy5-compl* 

DG74 nach dem zuvor verwendetem Muster gespottet. Für die Vergleichbarkeit der Intensivität der Fluoreszenz wurden alle Glasobjektträger bei einer Verstärkung von 380 gescannt. Die EDC/Methylimidazol-Kopplungsmethode (Abbildung 10c) bestätigte die Erwartungen. Der frei bewegliche, zu hybridisierende Primer konnte an den in Reihe I immobilisierten, komplementären Primer binden. Die Intensität der Fluoreszenz war so stark, dass bei der eingestellten Verstärkung der Microarray Scanner keine Rotabstufungen mehr aufnehmen konnte. Es gab weder eine Bindung an den unspezifischen Primer, der in der Reihe II immobilisiert wurde, noch an der geblockten Silanoberfläche (Reihe III). In den ersten Hybridisierungsexperimenten mit der PDMS-Matrix wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (siehe Anhang 4). Ganz im Gegensatz dazu standen die beiden Kopplungsmethoden mit den Crosslinkern DSS und BS<sup>3</sup> (Abbildung 10a-b). Es war keine rein spezifische Bindung an dem komplementären, immobilisierten Primer erkennbar. Die "tief schwarzen" Spots, vermutlich die "nur" gespottete 1 % BSA-Lösung, wiesen bei den beiden Crosslinker-Kopplungsmethoden unterschiedliche Radien auf, obwohl gleiche Mengen auf die Glasobjektträger pipettiert wurden. Dies deutete auf unterschiedlich starke Benetzbarkeit hin, was auf ungleichmäßig silanisierte Glasobjektträger zurückzuführen sein könnte.

# 5.1.3 Optimierung der Aktivierung und Silanisierung von Glasobjektträgern

Bisher wurden die Glasobjektträger zur Aktivierung für 5 Minuten in die 8 M NaOH gestellt, mit destilliertem Wasser gespült und für 10 Minuten im Universalofen getrocknet. Da in den vorangegangenen Experimenten deutliche Unterschiede im Oberflächenverhalten zu verzeichnen waren, wurde die Methode der Aktivierung und Silanisierung in Frage gestellt, um in weiterführenden Experimenten ein negatives Ergebnis auf Grund der Silanisierung ausschließen zu können. Deshalb wurde die Zeit der Aktivierung in 8 M NaOH von 5 Minuten auf eine Stunde erhöht, nach der Inkubation mit Ethanol statt destilliertem Wasser gespült und die Glasobjektträger lufttrocknen gelassen. Nach der Silanisierung erfolgte die Quervernetzung des Silans im Universalofen statt für 15 Minuten nun eine Stunde bei 120 °C. Die längere Dauer der Aktivierung, wie bei BÖING (2003), IvošEvić (2009) und MARSCHAN (2005) beschrieben, sollte eine reaktivere Oberfläche für die Anbindung des Silans realisieren. Bei den Arbeiten von BöING (2003), IvošEvić

(2009) und LEHMANN (2008) wurde darauf geachtet möglichst wasserfrei zu arbeiten, deshalb wurde nach der Aktivierung nun mit Ethanol gewaschen und die Glasobjektträger lufttrocknen gelassen. Die längere Verweilzeit im Universalofen bei 120 °C zur besseren Quervernetzung des Silans auf der Oberfläche wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Ivošević (2009), LEHMANN (2008) und MARSCHAN (2005) durchgeführt.

Mit der neuen Vorgehensweise der Aktivierung sowie Silanquervernetzung wurden neue Glasobjektträger hergestellt und mit diesen Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Beim Spotten der zu immobilisierenden Primerlösungen war eine deutlich geringere Benetzbarkeit der Oberfläche zu bemerken. In den folgenden Versuchen zum Kopplungsmethodenvergleich wurden nur die beiden Kopplungsmethoden mit DSS und EDC/Methylimidazol verglichen, da BS<sup>3</sup> vorangegangen ähnliche Ergebnisse zeigte wie DSS und zudem die teurere Variante Spotten der Oligonukleotide erfolate ist. Das nach dem Hybridisierungsmuster (Abbildung 7b). Die Ergebnisse der optischen Auswertung sind in Abbildung 11 dargestellt.





In Reihe I (Abbildung 11) wurde jeweils der *Amino* (*GA*)<sub>10</sub> *DG74* (spezifisch) immobilisiert, in Reihe II der *Amino* (*GA*)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_284-300\_R (unspezifisch) und in Reihe III kein Oligonukleotid. Zur Hybridisierung wurde der *Cy3-compl DG74* nach dem zuvor verwendeten Muster gespottet. Beide Glasobjektträger wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit bei der Verstärkung von 320 gescannt.

Die EDC/Methylimidazol-Kopplungsmethode (Abbildung 11b-c) zeigte wie in den vorangegangenen Versuchen hohe Spezifität und keinerlei unspezifische Bindung an dem vermeintlich immobilisierten, unspezifischen Oligonukleotid und der geblockten Silanoberfläche. Bei der eingestellten Verstärkung von 320 war die Intensität der Fluoreszenz so stark, dass der Microarray Scanner keine Grünabstufungen mehr aufnehmen konnte. In der Abbildung 11c unter Verwendung einer geringeren Verstärkung von 280 waren deutlich abgegrenzte, homogen leuchtende Spots erkennbar. Die DSS-Kopplungsmethode (Abbildung 11a) zeigte in der Reihe I mit dem immobilisierten, für die Hybridisierungsreaktion spezifischen Oligonukleotid eine leicht höhere Intensität der Fluoreszenz. Die Bindung des Cy3compl DG74 in Reihe II war vermutlich nicht an das immobilisierte, unspezifische Oligonukleotid, sondern die Interaktion mit der geblockten Silanoberfläche. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Blockung der aktiven Silanoberfläche mit 1 % BSA-Lösung nicht effektiv war. In den folgenden Experimenten wurden daher die Oligonukleotide mit der EDC/Methylimidazol-Kopplungsmethode immobilisiert und mit der Bernsteinsäureanhydridlösung geblockt.

#### 5.1.4 Thermostabilitätstest der Immobilisierung an Glasobjektträgern

Ziel dieser Untersuchung war die Ermittlung der Thermostabilität der Kopplungsmethode mit den beiden 5'-modifizierten Amino- beziehungsweise Phosphor-Oligonukleotiden. Dies ist bei der PCR von besonderer Bedeutung, da der Microarray mehrfach auf 95 °C erhitzt wird.

Zunächst wurden die Kopplungen der beiden 5'-modifizierten Amino- und Phosphor-Oligonukleotide mittels Hybridisierungstests bei RT untersucht. Dazu wurden die Oligonukleotide nach dem Hybridisierungsmuster (Abbildung 7b) gespottet. In Abbildung 12 ist das Ergebnis der optischen Auswertung verdeutlicht. In Reihe I (Abbildung 12) wurde der *Amino-* beziehungsweise *Phosphor (GA)*<sub>10</sub> *DG74* (spezifisch) immobilisiert, in Reihe II der *Amino (GA)*<sub>10</sub> *16S\_Stau\_284-300\_R* beziehungsweise der *P nuc capture probe* (unspezifisch) und in Reihe III kein Oligonukleotid. Zur Hybridisierung wurde der *Cy5-compl DG74* nach dem zuvor verwendeten Muster gespottet. Beide Glasobjektträger wurden zur besseren Vergleichbarkeit bei der Verstärkung von 530 gescannt. Zwischen den beiden Modifizierungen am 5'-Ende konnte bei diesem Hybridisierungsversuch unter RT kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Die Bindung war spezifisch

(Reihe I) und es wurden keine unspezifischen Bindungen in Reihe II und III festgestellt.



Abbildung 12: Hybridisierung auf Glas, Vergleich (Verst.: 530) a) Amino 5'-Modifikation b) Phosphor 5'-Modifikation

Um die Immobilisierung bzw. die Kopplung der Oligonukleotide an der Oberfläche auch unter PCR-Temperaturbedingungen zu testen, wurden Hybridisierungsexperimente unter Wirkung des PCR-Temperaturprofils durchgeführt. Dazu wurden die Glasobjektträger nach dem PCR-Muster (Abbildung 7c) gespottet und das Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chamber aufgeklebt, in welches der *Cy5compl DG74* pipettiert wurde. Anschließend erfolgte der Durchlauf des PCR-Temperaturprofils aus Tabelle 4. In der Abbildung 13 ist das Ergebnis der optischen Auswertung nach Ablauf des Temperaturtests gezeigt.



Abbildung 13: Thermostabilitätstest auf Glas, Vergleich (Verst.: 480) a) Amino 5'-Modifikation b) Phosphor 5'-Modifikation

In Reihe I (Abbildung 13) wurde der Amino- beziehungsweise Phosphor (GA)<sub>10</sub> DG74 (spezifisch) immobilisiert, in Reihe II der Amino (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_284-300\_R beziehungsweise der P nuc capture probe (unspezifisch). Innerhalb des kleinen Quadrates des Incubation Chambers wurde außer den in Reihe I und II gespotteten Oligonukleotiden kein weiteres Oligonukleotid aufgetragen, sodass eine Aussage über die Effektivität der Blockung der reaktiven Silanoberfläche getroffen werden konnte. Aus diesem Versuch konnte kein Unterschied der Thermostabilität der beiden 5'-modifizierten Oligonukleotide festgestellt werden. Jedoch konnte nicht gewährleistet werden, dass gleiche Temperaturbedingungen über den gesamten Glasobjektträger herrschten, da die Menzel-Gläser SuperFrost nicht richtig in den AmpliSpeed-Schacht passten. Laut den Angaben des Herstellers im Benutzerhandbuch passen Objektträger mit den Abmessungen von bis zu 25x76x1 mm (BxLxH) in den Slide-Schacht des Gerätes (BECKMAN COULTER 2009). Die Menzel-Gläser SuperFrost sowie andere Standard-Glasobjektträger anderer Firmen haben allerdings die Abmessungen von 26x76x1 mm (BxLxH). Die Menzel-Gläser Diagnostika erfüllen zwar diese Toleranz, jedoch sollten in dieser Arbeit ebenfalls Kunststoffe auf die Kompatibilität einer Festphasen-Reaktion getestet werden. Diese könnten in einem Chip-System günstig zur Einmalnutzung und zur medizinisch sicheren Entsorgung eingesetzt werden. Dazu wurden unterschiedliche Polymerfolien (Tabelle 1) auf die passenden Maße von 25×76×0,25 mm (B×L×H) gebracht, um damit dem Problem des Abmaßes gerecht zu werden und eine optimale Wärmeübertragung vom AmpliSpeed an den Objektträger zu gewährleisten.

#### 5.1.5 Übertragung der Methoden auf Plastikobjektträger

Zur Übertragung der an den Glasobjektträgern angewendeten Methoden wurde die Optimont® Polyesterfolie zu einem Plastikobjektträger mit den Abmaßen 25×76×0,25 mm (B×L×H) zurechtgeschnitten. Die Aktivierung und Silanisierung erfolgte äquivalent zu den Glasobjektträgern. Es wurde die Hybridisierung an den immobilisierten Oligonukleotiden und die Thermostabilität der Immobilisierung getestet. Verglichen wurden dabei die 5'-Modifizierungen Amino und Phosphor. Das Ergebnis der optischen Auswertung ist in der Abbildung 14 dargestellt.





- a) Hybridisierung, Vergleich Amino/Phosphor 5'-Modifizierung (Verst.: 400)
- b) Thermostabilitätsuntersuchung, Amino 5'-Modifizierung (Verst.: 300)

Die beiden unterschiedlich 5'-modifizierten Oligonukleotide wurden zusammen auf einem Plastikobjektträger immobilisiert, um eine besser Vergleichbarkeit zu erzielen. In Anlehnung an das Hybridisierungsmuster (Abbildung 7b) wurde in der Reihe I (Abbildung 14a) der Amino (GA)<sub>10</sub> DG74 (spezifisch) immobilisiert, in Reihe II der *Phosphor (GA)*<sub>10</sub> DG74 (spezifisch) und in Reihe III kein Oligonukleotid. Zur Hybridisierung wurde der Cy5-compl DG74 nach dem zuvor verwendeten Muster gespottet. In Reihe I und II konnte die spezifische Hybridisierung nachgewiesen werden. In Reihe III gab es keine unspezifischen Bindungen. Auf Grund der höheren Fluoreszenzintensität der Reihe I mit dem immobilisierten Amino (GA)<sub>10</sub> DG74 wurde dieser für das darauffolgende Thermostabilitätsexperiment verwendet. Die Oligonukleotide wurden nach dem PCR-Muster (Abbildung 7c) gespottet. Das Frame-Seal™ Incubation Chamber wurde aufgeklebt, in welches der Cy5-compl DG74 pipettiert wurde. Anschließend erfolgte der Durchlauf des PCR-Temperaturprofils aus Tabelle 4. In Reihe I (Abbildung 14b) wurde der Amino (GA)<sub>10</sub> DG74 (spezifisch) immobilisiert und in Reihe II der Amino (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_284-300\_R (unspezifisch). Innerhalb des kleinen Quadrates des Incubation Chambers wurde außer den in Reihe I und II gespotteten Oligonukleotiden kein weiteres Oligonukleotid aufgetragen, sodass eine Aussage über die Effektivität der Blockung der reaktiven Silanoberfläche getroffen werden konnte. Zu sehen war eine nahezu homogene, intensive Fluoreszenz innerhalb des gesamten kleinen Quadrates des Incubation Chambers. Daraus wurde geschlussfolgert, dass sich entweder womöglich die gesamte Silanschicht von PET-Objektträger ablöste oder die Kopplung der Oligonukleotide an die Oberfläche aufbrach. Nach dem Abkühlen entstand eine unspezifische Bindung des *Cy5-compl DG74* an die Oberfläche.

#### 5.1.6 Neue Aktivierungsmethode für Plastikobjektträger

Mit einer weiteren Aktivierungsmethode nach SOPER et al. (2005) wurde versucht, an der Polymethylmethacrylat (PMMA)-Oberfläche mittels UV-Bestrahlung freie OH-Gruppen zu schaffen. Anschließend erfolgte die Silanisierung analog zu den Glasobjektträgern. Bei der Verwendung der EDC/Methylimidazol-Kopplungsmethode mit anschließendem Blocken mit Bernsteinsäureanhydrid in DMF erwies sich das PMMA als chemisch instabil. Daraufhin wurde eine alternative Blockung mit 1 M Glycin durchgeführt. Das Hybridisierungsexperiment zeigte, dass das Blocken mit 1 M Glycin effektiver war als das Blocken mit 1 % BSA, jedoch nicht so effektiv wie mit dem in DMF gelösten Bernsteinsäureanhydrid. Ein PMMA-Objektträger wurde mit dieser alternativen Methode geblockt und die Thermostabilität der Kopplung der Oligonukleotide an der Oberfläche unter PCR-Bedingungen (Tabelle 4) untersucht. Aus diesem Versuch ergab sich, dass PMMA bei PCR-Temperaturbedingungen verformte und damit optisch mit dem Microarray Scanner nicht mehr auswertbar war. Das ebenfalls in der Arbeit von SOPER et al. (2005) erwähnte Polycarbonat (PC) wurde auf die chemische Stabilität gegenüber der Bernsteinsäureanhydrid-Lösung getestet. Dieses erwies sich jedoch ebenfalls als chemisch instabil und damit für die Entwicklung der Festphasen-PCR als ungeeignet.

Auf Grund der chemischen Instabilität der Materialien PMMA und PC wurde die Aktivierung der Oberfläche mit UV-Bestrahlung an dem zuvor verwendeten Polyethylenterephthalat (PET) angewendet. Um die neue Aktivierung mit anschließender Silanisierung zu testen, wurden Hybridisierungs- und Thermostabilitätstest wie in den vorangegangenen Versuchen durchgeführt. In der Abbildung 15 ist das Ergebnis der optischen Auswertung für die 5'-modifizierten Amino-Oligonukleotide dargestellt.





In Reihe I (Abbildung 15a) wurde der Amino (GA)<sub>10</sub> DG74 (spezifisch) immobilisiert, in Reihe II der Amino (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_284-300\_R (unspezifisch) und in Reihe III kein Oligonukleotid. In Reihe I konnte die spezifische Hybridisierung nachgewiesen werden. In Reihe II und III gab es keine unspezifischen Bindungen. Auf Grund des positiven Hybridisierungsexperimentes wurde ein Thermostabilitätstest mit den Amino-5'-modifizierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden nach dem PCR-Muster (Abbildung 7c) gespottet und das Frame-Seal™ Incubation Chamber aufgeklebt, in welches der Cy5-compl DG74 pipettiert wurde. Anschließend erfolgte der Durchlauf des PCR-Temperaturprofils aus Tabelle 4. In Reihe I (Abbildung 15b) wurde der Amino (GA)<sub>10</sub> DG74 (spezifisch) immobilisiert und in Reihe II der Amino (GA)<sub>10</sub> 16S\_Stau\_284-300\_R (unspezifisch). Wie in den vorangegangenen Thermostabilitätstests wurde innerhalb des kleinen Quadrates des Incubation Chambers kein weiteres Oligonukleotid aufgetragen, sodass eine Aussage über die Effektivität der Blockung der reaktiven Silanoberfläche getroffen werden konnte. Innerhalb des gesamten kleinen Quadrates des Incubation Chambers war eine nahezu homogene Fluoreszenz zu verzeichnen. Dieses Ergebnis deckte sich mit dem Ergebnis in der Abbildung 14b, wobei sich die Methode der Aktivierung und die eingestellte Verstärkung der beiden PET-Objektträger unterschieden. Da auf Grund der Versuchsergebnisse nicht geschlussfolgert werden konnte, ob sich unter Einfluss von hohen Temperaturen die komplette Silanschicht vom PET-Objektträger oder sich nur die Verbindung zwischen dem Silan und der Amino-Gruppe des 5'-modifizierten Oligonukleotids löste. Daher wurde das gleiche Experiment mit dem 5'-modifizierten Phosphor-Oligonukleotid durchgeführt. ANDREADIS *et al.* (2000) beschrieb die Kopplung von 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden an eine Silanoberfläche als robust gegenüber thermischer Beanspruchung und mit einer hohen Effizienz bei der Wiederverwendung nach der PCR. Das Ergebnis der optischen Auswertung ist in der Abbildung 16 dargestellt.





In Reihe I (Abbildung 16a) wurde der *Phosphor (GA)*<sub>10</sub> DG74 (spezifisch) immobilisiert, in Reihe II der P nuc capture probe (unspezifisch) und in Reihe III kein Oligonukleotid. In Reihe I konnte die spezifische Hybridisierung nachgewiesen werden. In Reihe II und III gab es leichte unspezifische Bindungen, die im Gegensatz zur spezifischen Bindung in Reihe I deutlich schwächer in der Intensität waren. Auf Grund des dennoch positiven Hybridisierungsexperimentes wurde ein Thermostabilitätstest mit den Phosphor-5'-modifizierten Oligonukleotiden durchgeführt, welcher analog zu dem vorangegangenen Thermostabilitätstest war. In Reihe I (Abbildung 16b) wurde der Phosphor (GA)<sub>10</sub> DG74 (spezifisch) immobilisiert und in Reihe II der P nuc capture probe (unspezifisch). Es wurde kein weiteres Oligonukleotid innerhalb des kleinen Quadrates des Incubation Chambers aufgetragen. In der Reihe I waren deutlich zwei klar abgegrenzte Spots zu erkennen, was der Erwartung entsprach. Es gab keine Bindung an das immobilisierte, unspezifische Oligonukleotid in der Reihe II und an der geblockten Silanoberfläche in der Reihe III. Daraus wurde geschlussfolgert, dass sich die Kopplung des 5'-modifizierten Amino-Oligonukleotids an die Oberfläche nicht als thermisch stabil erwies. Mit diesen Ergebnissen lieferten die

PET-Objektträger unter UV-Aktivierung, anschließender Silanisierung und der Immobilisierung des 5'-phosphorylierten Oligonukleotids mit der EDC/Methylimidazol-Kopplungs- und Bernsteinsäureanhydrid-Blockmethode die Grundlage für den experimentellen Aufbau einer Festphasen-PCR.

## 5.2 Experimenteller Aufbau der PCR an einer festen Phase

#### 5.2.1 Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur des nuc-Primerpaares

Das Ziel der Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur bestand darin das spezifische PCR-Produkt zu maximieren und damit die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen.

Nach den verschiedenen. Abschnitt 5.1 beschriebenen Testim und Optimierungsschritten fand die Primerpaarung P Nuc capture probe als immobilisierter forward und Cy3- beziehungsweise Cy5 nuc rev als im PCR-Mix frei beweglicher reverse Primer Verwendung. Für die Bestimmung der Annealingtemperatur des gewählten nuc-Primerpaares wurde eine Gradienten-insitu-PCR im Thermocycler TProfessional durchgeführt. Das In-situ-PCR-Produkt wurde durch eine Gelelektrophorese sichtbar gemacht (Abbildung 17).



Abbildung 17: Agarosegel zur Annealingtemperaturoptimierung

In Spur 1 (Abbildung 17) wurde die GeneRuler<sup>™</sup> Low Range DNA Ladder aufgetragen. Die Spuren 2-7 zeigen das entstandene *In-situ*-PCR-Produkt mit einer Länge von 180 bp bei den gewählten Temperaturen des Gradienten (Tabelle 13).

	Spur					
Spur	2	3	4	5	6	7
T [°C]	52	53	55,2	57,6	60	61,7

Tabelle 13: Zuordnung der gewählten Temperatur des Gradienten mit der dazugehörigen

Es konnte bei jeder gewählten Temperatur das In-situ-PCR-Produkt mit einer Länge von 180 bp erzielt werden. Die in Spur 4 gewählte Temperatur von 55,2 °C zeigte bei der Auswertung des Agarosegels mit dem UV-System Gel iX Imager das stärkste Signal. Aus diesem Ergebnis wurde für die folgenden Festphasen-PCR-Versuche die Annealingtemperatur der gewählten nuc-Primerpaarung auf 55 °C festaeleat.

#### PCR-Programmtest des AmpliSpeeds 5.2.2

Für die Übertragung der In-situ-PCR zur Festphasen-PCR musste die Temperaturübertragung des AmpliSpeeds auf den PET-Objektträger gewährleistet werden. Dazu wurde eine In-situ-PCR auf einem geblockten PET-Objektträger unter dem Frame-Seal™ Incubation Chamber durchgeführt. Das In-situ-Produkt wurde mittels einer Gelelektrophorese ausgewertet (Abbildung 18).



Abbildung 18: Agarosegel zum AmpliSpeed-Programm-Test

In Spur 1 (Abbildung 18) wurde die GeneRuler™ Low Range DNA Ladder aufgetragen, in die Spur 2 das In-situ-PCR-Produkt, welches bei einer Annealingtemperatur von 55 °C erzeugt wurde. Es zeichnete sich eine deutliche Bande ab, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Temperatur von der Heizoberfläche des AmpliSpeeds auf den PET-Objektträger und den darauf befindlichen PCR-Mix übertragen wurde.

## 5.2.3 Durchführung einer PCR an einer festen Phase

Auf der Grundlage der Ergebnisse in den Abschnitten 5.2.1 und 5.2.2 mit der optimalen Annealingtemperatur von 55 °C und nach dem positiven Ergebnis der Temperaturübertragungsuntersuchung erfolgten Ansätze der Festphasen-PCR. Dazu wurden in allen folgenden PCR-Versuchen an einer festen Phase die Oligonukleotide nach dem PCR-Muster (Abbildung 7c) gespottet. In der Reihe I wurde jeweils der *P nuc capture probe* (spezifisch) und in Reihe II jeweils der *Phosphor (GA)*<sub>10</sub> *DG74* (unspezifisch) immobilisiert. Danach wurde das Frame-Seal<sup>TM</sup> Incubation Chamber aufgeklebt, in welches je nach Versuch ein bestimmter PCR-Mix pipettiert wurde. Anschließend erfolgte der Durchlauf des AmpliSpeed slide cycler-Programms aus Tabelle 10. In der Abbildung 19 ist das Ergebnis der optischen Auswertung des PCR-Mix-Ansatzes "Ampli 1" (Tabelle 9) mit dem *Cy3 nuc rev* als reverse Primer dargestellt.



Abbildung 19: Ansatz Festphasen-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff Cy3 a) Versuch 1 (vergrößert, Verst.: 320) b) Versuch 2 (Verst.: 330)

Bei den beiden Versuchen in Abbildung 19 konnte kein spezifisches PCR-Produkt optisch nachgewiesen werden. Die heller leuchtenden Kreise, welche vor allem am Innenrand des Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chambers und teilwiese in der Mitte auftraten, waren kleine Luftblasen, die gleich nach dem Abdecken des Incubation Chambers entstanden. Auffällig war, dass die gesamte Oberfläche des PET-Objektträgers bei einer eingestellten Verstärkung von 320 beziehungsweise 330 grünlich leuchtete. Dies deutete auf eine Eigenfluoreszenz des PETs hin. Zur Untersuchung dieser These wurde ein Backgroundtest durchgeführt, bei dem die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide *Cy3 nuc rev* und *Cy5 nuc rev* in verschiedenen Konzentrationen zusammen auf einen PET-Objektträger gespottet wurden. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde der PET-Objektträger mit PBS/Tween gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und mittels Stickstoff getrocknet. Das Ergebnis der optischen Auswertung ist in der Abbildung 20 dargestellt.





In der Reihe I wurde der Cy5 nuc rev und in der Reihe II der Cy3 nuc rev gespottet. In Abbildung 20a wurde der PET-Objektträger mit den Einstellungen des Microarray Scanners für den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 bei einer Verstärkung von 390 gescannt, in Abbildung 20b für den Fluoreszenzfarbstoff Cy3. Zu sehen war, dass der Background in der Abbildung 20a vollkommen schwarz erschien. Die Spots des Cy5 nuc rev waren deutlich abgegrenzt und bei jeder untersuchten Konzentration homogen in derselben Intensität leuchtend. Im völligen Gegensatz dazu stand das optische Ergebnis des Cy3 nuc rev (Abbildung 20b). Der Background leuchtete homogen grünlich, wenn auch nicht so intensiv wie das gespottete Oligonukleotid. Bis zu einer Konzentration von 20 µM des fluoreszenzmarkierten Cy3-Oligonukleotids konnte der Microarray Scanner bei der eingestellten Verstärkung von 390 keine Grünabstufungen mehr aufnehmen. Bei der Konzentration von 10 µM wurde eine erste Grünabstufung detektiert, jedoch diese war nicht SO kontrastreich gegenüber der geblockten PET-Objektträgeroberfläche wie die Rotabstufung des Cy5 nuc rev bei derselben eingestellten Verstärkung. Da es sich bei einem PCR-Produkt um sehr geringe

Mengen handelt, wurde auf Grund des besseren Kontrastes für die folgenden Festphasen-PCR-Versuche der *Cy5 nuc rev* im PCR-Mix als reverse Primer verwendet. Die Ergebnisse der optischen Auswertung der Versuche mit dem 5'- modifizierten Cy5-Oligonukleotid sind in der Abbildung 21 dargestellt.



Abbildung 21: Ansatz Festphasen-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff Cy5 a) Versuch 1 (Verst.: 500) b) Versuch 2 (Verst.: 440)

Bei dem in der Abbildung 21a dargestellten Versuch wurde der PCR-Mix-Ansatz "Ampli 1" (Tabelle 9) verwendet. Es konnte kein spezifisches PCR-Produkt optisch nachgewiesen werden. Zu sehen waren nur die heller leuchtenden Kreise am Innenrand des Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chambers, die wie in den vorangegangenen Versuchen durch kleine Luftblasen entstanden. Dieser Effekt konnte jedoch verringert werden, da der Hinweis des Herstellers umgesetzt wurde, mehr Reaktionsansatz zu pipettieren als das Frame-Seal™ Incubation Chamber Fassungsvermögen besitzt. Statt 25 µL wurden 35 µL des PCR-Mixes pipettiert und somit ein Überschuss von 10 µL geschaffen, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden (BIO-RAD 2012). Nachdem mit dem PCR-Mix-Ansatz "Ampli 1" mit dem Cy5 nuc rev als reverse Primer kein PCR-Produkt optisch nachgewiesen werden konnte, wurde ein alternativer PCR-Mix-Ansatz "Ampli 3" (Tabelle 9) angesetzt. Der Amino nuc capture probe wurde in diesem PCR-Mix-Ansatz als frei beweglicher forward Primer in einer Konzentration von 1:60 gegenüber dem notwendigen freien reverse Primer Cy5 nuc rev verwendet. Das Ziel war eine initiale PCR, welche erst einmal die gewünschte, kurze nuc-Sequenz aus dem gesamten Genom des Staphylococcus aureus frei in der Lösung vervielfältigte. Damit sollte die Bindung der DNA an den immobilisierten Primer erleichtert werden. Das Ergebnis der optischen Auswertung ist in der Abbildung 21b dargestellt. In der Reihe I waren zwei deutlich abgegrenzte, homogen leuchtende Spots zu verzeichnen. Das spezifische PCR-Produkt konnte optisch nachgewiesen werden und es gab kein PCR-Produkt an das immobilisierte, unspezifische Oligonukleotid (Reihe II) und an der geblockten Silanoberfläche. MARSCHAN (2005) beschrieb ebenfalls einen Vorteil bei Zugabe des immobilisierten Primers zusätzlich als frei beweglichen Primer im Reaktionsmix. Dabei erwies sich bei MARSCHAN (2005) ein günstigstes Primerverhältnis von 1:10 bis 1:20 von zusätzlich freien, bereits immobilisierten und notwendigen freien Gegenprimer bei einer On-Chip-PCR mit *M13*-DNA.

Das Ergebnis aus Abbildung 21b wurde versucht zu reproduzieren. Die Ergebnisse der optischen Auswertung sind in der Abbildung 22 dargestellt.





Das Versuchsergebnis aus Abbildung 21b ließ sich bei den Folgeversuchen nicht reproduzieren. Es gab nur teilweise in der Reihe I schwach leuchtende spezifische Spots, jedoch nicht in der Intensität wie im ersten Versuch. Zuvor wurde der PET-Objektträger mit einer eingestellten Verstärkung von 440 gescannt, sodass der Background dunkel blieb. Um bei den Folgeversuchen spezifische Spots sichtbar zu machen, musste eine Verstärkung von ca. 600 eingestellt werden, weshalb auch der Background deutlich heller erschien. Gründe für die Nichtreproduzierbarkeit könnten in der Oberflächenbeschaffenheit des Materials liegen. Nach den Ergebnissen in der Abbildung 22 wurde eine unterschiedliche Oberflächenstruktur der beiden Seiten der Optimont® Polyesterfolie vermutet. Auf Nachfrage beim Hersteller wurde diese Vermutung bestätigt. Eine der Seiten der Optimont® Polyesterfolie besitzt eine Acrylat-Beschichtung. Damit gibt es gravierende Unterschiede bei der Aktivierung und Silanisierung der Oberfläche, welche dann Auswirkungen auf die chemische Kopplung der Oligonukleotide hat. Ebenfalls könnte eine Kontamination des spezifischen Oligonukleotids, dem P nuc capture probe, die verminderte Intensität der Fluoreszenz bewirken. Die

44

Kontamination könnte bei einer Unregelmäßigkeit bei der Versuchsdurchführung, die als solches jedoch nicht als problematisch eingeschätzt wurde, entstanden sein. Um hier ein klares Ergebnis zu bekommen, sind weitere Versuche unter Betracht der oben genannten Erkenntnisse beziehungsweise Fehlerquellen notwendig. Weitere Test- und Optimierungsansätze sind in den Arbeiten von MARSCHAN (2005) und VON NICKISCH-ROSENEGK et al. (2005) zu finden. MARSCHAN beschrieb, dass bei einer On-Chip-PCR die Erhöhung der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration bis zu 7 mM die Effektivität erheblich steigert ohne die Spezifität zu beeinflussen. VON NICKISCH-ROSENEGK et al. verwendeten eine doppelte Konzentration der Primer, dNTPs und Enzyme sowie die doppelte Zeit in jedem PCR-Schritt außer der Amplifikation. Die Anzahl der Zyklen blieb dabei konstant. Zudem bemerkten VON NICKISCH-ROSENEGK et al. eine erhebliche Steigerung der Effizienz der PCR, wenn zwischen dem 5'-phosphorylierten, gebundenen Ende und der wahren Primersequenz ein (GA)<sub>10</sub>-Spacer eingefügt wird. Dies bewirkt einen Vorteil bei großen Zielseguenzen im Genom, die sich auf Grund intramolekularer Watson-Crick-Basenpaarungen wahrscheinlich in sich selbst zusammenfalten. Damit sind diese durch ihre Struktur und Masse eventuell daran gehindert sich der Oberfläche anzunähern (SOUTHERN et al. 1999).

Die auf den Plastikobjektträgern durchgeführte Methode der Festphasen-PCR wurde auf die Menzel-Gläser Diagnostika übertragen. Das Ergebnis der optischen Auswertung ist in der Abbildung 23 dargestellt.



Abbildung 23: Ansatz Festphasen-PCR auf Glasobjektträger (Verst.: 570)

Der weiße Rahmen markiert den Innenrand des Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chambers. In der Reihe I (Abbildung 23) konnten zwei leuchtende Spots und somit das spezifische PCR-Produkt optisch detektiert werden. Sowohl an das Glas, als auch an das auf den Glasträger aufgebrachte Polytetrafluoroethylen (Teflon), konnten die Oligonukleotide immobilisiert und eine PCR an einer festen Phase durchgeführt werden. Die geringere Intensität der Fluoreszenz auf der Glasoberfläche gegenüber dem Polytetrafluoroethylen könnte an der Vertiefung durch die Beschichtung liegen. Es gab kein fluoreszierendes PCR-Produkt an das immobilisierte, unspezifische Oligonukleotid (Reihe II) und an der geblockten Silanoberfläche. Der Effekt der Bläschenbildung am Innenrand des Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chambers war fast gar nicht sichtbar.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung einer optimalen Kopplungsmethode der Oberfläche. Oligonukleotide an eine feste. planare Die Eignung der Kopplungsmethode für eine spätere Durchführung der Festphasen-PCR wurde durch charakterisierende Hybridisierungs- und Thermostabilitätsexperimente untersucht. Daraus konnte ein experimenteller Aufbau zur Durchführung einer Festphasen-PCR im Kontext pathogener, Sepsis-relevanter Erreger entwickelt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf rein qualitativen, optischen Auswertungen, da es sich zum Großteil um Pionierversuche handelte.

Zunächst wurden verschiedene Kopplungsmethoden von Oligonukleotiden an eine mit 8 M NaOH aktivierten und ATPS-silanisierten Glasoberfläche getestet. Mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten stellte sich die EDC/Methylimidazol-Kopplungsmethode mit der Bernsteinsäureanhydrid-Blocklösung als geeignet heraus, da hohe Spezifität nachgewiesen werden konnte. Untersucht wurden die beiden 5'-modifizierten Amino- beziehungsweise Phosphor-Oligonukleotide. Bei den Hybridisierungs- und Thermostabilitätsuntersuchungen gab es keine wesentlichen Unterschiede der positiven Ergebnisse zwischen den beiden verwendeten 5'-Modifikationen. Jedoch konnte die Thermostabilität auf Grund der für den AmpliSpeed zu großen Standard-Glasobjektträger nicht gewährleistet werden.

Aus den verschiedenen Polymerfolien wurden die Plastikobjektträger auf die passenden Maße für den AmpliSpeed-Schacht gebracht. Die Methoden der Aktivierung, Silanisierung und EDC/Methylimidazol-Kopplung wurden von den Glasobjektträgern auf die Plastikobjektträger übertragen. Dabei erwies sich nur die Polyethylenterephthalat-(PET-)Polymerfolie als geeignet, da diese thermo- und chemisch stabil gegenüber der verwendeten Blockmethode war. Mit den Hybridisierungsexperimenten wurden vergleichbare Ergebnisse wie zuvor auf der Glasoberfläche erzielt. Bei den Thermostabilitätstests war die Kopplung der Oligonukleotide an die Oberfläche oder gar die Silanschicht auf dem Plastikobjektträger unter PCR-Temperaturbedingungen instabil.

Aus diesem Grund wurde eine neue Aktivierungsmethode der Plastikoberfläche mittels UV-Bestrahlung realisiert. Die Hybridisierungsexperimente zeigten im Wesentlichen die Ergebnisse wie zuvor mit der 8 M NaOH-Aktivierungsmethode. Bei der Thermostabilitätsuntersuchung erwies sich nur das 5'-phosphorylierte

47

Oligonukleotid unter PCR-Temperaturbedingungen als stabil. Dies bildete die Grundlage für den experimentellen Aufbau der PCR an einer festen Phase.

In dieser Arbeit konnte die Festphasen-PCR an einer Oberfläche aus verschiedenen Materialien, wie Glas, PET und Polytetrafluoroethylen (PTFE), durchgeführt werden. Dazu wurde das *nuc*-Primerpaar, welches eine bestimmte Sequenz des *nuc*-Gens amplifiziert, verwendet. Dieses Gen codiert die thermostabile Nuclease von *S. aureus* und ist nur für diesen Erreger spezifisch. Jedoch konnten die Ergebnisse nur schlecht reproduziert werden.

In weiterführenden Versuchen müsste die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessert werden. Dazu sind erste Ansätze in den Arbeiten von MARSCHAN (2005) und VON NICKISCH-ROSENEGK *et al.* (2005) zu finden, die bereits im Abschnitt 5.2.3 beschrieben wurden.

Weiterführend wären neben den gualitativen auch guantitative Untersuchungen Hier könnte zur Prozessoptimierung beginnend von Vorteil. mit der Zeitoptimierung für die Aktivierung und Silanisierung der Objektträger sowie der Inkubationszeit der Oligonukleotid-Kopplungslösung angesetzt werden. Außerdem wären Qualitätsuntersuchungen für die optimalen Konzentrationen der immobilisierten sowie frei beweglichen Primer günstig. Dabei könnten ebenfalls Aussagen über die Sensitivität der PCR und damit des späteren Sepsis-Tests getroffen werden. Ferner müssten Versuche zur Erweiterung der angewendeten Singleplex-PCR mit S. aureus durchgeführt werden. Da die Sepsis nicht nur einen Erreger zur Ursache hat, empfiehlt sich eine Erweiterung zur Multiplex-PCR aller Sepsis-relevanten Erreger. Daher müsste geklärt werden, ob alle pathogenen Erreger in einer Reaktionskammer gleichzeitig detektiert werden können oder in mehreren Gruppen parallel in Kammern unter gleichen Bedingungen in ein Labon-a-Chip-System integriert werden müssen.

Weiterer Forschungsbedarf ist damit vorhanden, wobei das Grundprinzip der Festphasen-PCR auch für andere klinische Applikationen eine Plattform bilden kann.

48

## 7 Literaturverzeichnis

ANDREADIS, J.D.; CHRISEY, L.A. (2000): Use of immobilized PCR primers to generate covalently immobilized DNAs for *in vitro* transcription/translation reactions. *Nucleic Acids Research 28(2):* e5

ARCHER, G.L. (1998): Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen. *Clinical Infectious Diseases 26*: 1179-1181

BECKMAN COULTER (2009): AmpliSpeed System User Guide.

BIO-RAD (2012): Frame-Seal<sup>™</sup> Incubation Chambers for Sealing Reactions on Slides. Gebrauchsanleitung

BÖING, J. (2003): Modifizierung von Glas- und Titanoberflächen zur Verbesserung der Biokompatibilität. *Dissertation*, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

BRAKSTAD, O.G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J.A. (1992): Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene. *Journal of Clinical Microbiology 30(7)*: 1654-1660

DEURENBERG, R.H.; VINK, C; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A.; STOBBERINGH, E.E. (2007): The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylo-coccus aureus. *Clinical Microbiology and Infection 13*: 222-235

DOW CORNING (2007): Sylgard® 184 Silicone Elastomer. Product Information

Exiqon (2012a): Cy3<sup>™</sup> (Cyanine 3).

URL: http://www.exiqon.com/ls/homeoflna/Chemistry/Cy3.pdf, aufgerufen am 25.05.2012

Exiqon (2012b): Cy5<sup>™</sup> (Cyanine 5).

URL: http://www.exiqon.com/ls/homeoflna/Chemistry/Cy5.pdf, aufgerufen am 25.05.2012

FORCHHEIM, M. (2009): Isolierung und Optimierung antimikrobiell wirkender Phagenproteine zur Bekämpfung antibiotikaresistenter Staphylokokken. *Dissertation*, Universität Regensburg

FUCHS, G. (Hrsg.); SCHLEGEL, H.G. (Begr.) (2007): Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag, 8., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage*, Stuttgart, New York

GASSEN, H.G.; SACHSE, G. E.; SCHULTE, A. (Hrsg.) (1994): PCR: Grundlagen und Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion. *G. Fischer,* Stuttgart, Jena, New York

GOTTSCHALK, G. (2012): Bakterien rüsten auf EHEC & MRSA. *Wiley-VCH Verlag*, Weinheim

IVOŠEVIĆ, I. (2009): Immobilisierung und Quantifizierung von Weizenkeimlektin an silanisierten Glasobjektträgern. *Diplomarbeit*, Universität Wien

KAULEN, H. (2012): Infektion außer Kontrolle. *Online Ausgabe der F.A.Z.*, URL: http://www.faz.net/aktuell/wissen/medizin/sepsis-therapie-infektion-ausser-kontrolle-11590484.html, aufgerufen am 14.04.2012

KLAUSEGGER, A.; HELL, M.; BERGER, A.; ZINOBER, K.; BAIER, S.; JONES, N.; SPERL, W; KOFLER, B. (1999): Gram Type-Specific Broad-Range PCR Amplification for Rapid Detection of 62 Pathogenic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology 37(2)*: 464– 466

KLUYTMANS, J.A. (2010): Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in food products: cause for concern or case of complacency?. *Clinical Microbiology and Infection 16*: 11-15

KRIMMER, V.; MERKERT, H.; VON EIFF, C.; FROSCH, M.; EULERT, J., LÖHR, J.F.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W. (1999): Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in Clinical Samples by 16S rRNA-Directed In Situ Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 37(8): 2667–2673

LEHMANN, D. (2008): Entwicklung eines neuartigen PCR basierten Biochips. *Dissertation*, Freie Universität Berlin

LINDSAY, J.A. (2008): Staphyllococcus – Molecular genetics. *Caister Academic Press*, Norfolk, UK

LOTTSPEICH, F.; ENGELS, J.W. (Hrsg.) (2006): Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage*, München

MARSCHAN, X. (2005): Mikroarray-basierte Detektion von mRNA aus Zellen mittels On-Chip-PCR. *Dissertation*, Universität Potsdam

MÖLLER, R. (2006): DNA-Chips mit elektrischer Detektion: Entwicklung und Anwendung eines Affinitätschips mit elektrisch-resistivem Nachweis. *Dissertation*, Friedrich-Schiller-Universität Jena

MÜLLER, H.-J; RÖDER, T. (2004): Der Experimentator: Microarrays. Spektrum Akademischer Verlag, München

MULLIS, K.B. (1994): The Polymerase Chain Reaction. *Birkhäuser,* Boston-Basel-Berlin

NEWTON, C.R.; GRAHAM, A. (1994): PCR. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Oxford

REHM, H.; LETZEL,T. (2010): Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. *Spektrum Akademischer Verlag*, *6. Auflage*, Heidelberg

REINHART, K.; BRUNKHORST, F.M.(2010): Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. *Thieme*, Stuttgart

SAIKI, R.K; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

SCHENA, M. (2003): Microarray analysis. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey

SHORTLE, D. (1983): A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene* 22: 181–189

SOPER, S.A.; HASHIMOTO, M.; SITUMA, C.; MURPHY, M.C.; MCCARLEY, R.L.; CHENG, Y.W.; BARANY, F. (2005): Fabrication of DNA microarrays onto polymer substrates using UV modification protocols with integration into microfluidic platforms for the sensing of low-abundant DNA point mutations. *Methods* 37: 103–113

SOUTHERN, E.; MIR, K.; SHCHEPINOV, M. (1999): Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics 21(1 Suppl.)*: 5-9.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. (2011): INSTRUCTIONS DSS and BS<sup>3</sup> Crosslinkers.

VON NICKISCH-ROSENEGK, M.; MARSCHAN, X.; ANDRESEN, D.; ABRAHAM, A.; HEISE, C.; BIER, F.F. (2005): On-chip PCR amplification of very long templates using immobilized primers on glassy surfaces. *Biosensors and Bioelectronics 20*: 1491-1498

WERDAN, K.; SCHUSTER, H.P.; MÜLLER-WERDAN, U. (2005): Sepsis und MODS. Springer, 4. vollst. überarb. u. aktualisierte Auflage, Berlin und Heidelberg

WILSON, K.H.; BLITCHINGTON, R.B.; GREENE, R.C. (1990): Amplification of Bacterial 16S Ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 28(9): 1942-1946

52

WOLLENBERGER, U.; RENNEBERG, R.; BIER, F.F.; SCHELLER, F.W. (2003): Analytische Biochemie - Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen. *WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA,* Weinheim

# Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schema einer Festphasen-PCR (MARSCHAN 2005, 3	S. 78)7
Abbildung 2: Systematische Einordung von Staphylococcus aure	eus
(nach Forcннеім 2009)	
Abbildung 3: Nukleotidsequenz des Staphylococcus-Nuclease-G	ens ( <i>nuc</i> )
(SHORTLE 1983, S. 185)	9
Abbildung 4: Modifizierung der Materialoberfläche (MÖLLER 2006	, S. 17) 10
Abbildung 5: Struktur und Spektren der Fluoreszenzmarker (Exic	οον 2012a u. b)
a) Cy3-Fluoreszenzfarbstoff b) Cy5-Fluoreszenzfa	arbstoff12
Abbildung 6: Prinzip eines Microarray-Laser-Systems	
(Müller <i>et al.</i> 2004, S. 86)	13
Abbildung 7: Spot-Muster der Oligonukleotide	
a) Foto: PDMS-Matrix b) Hybridisierungsmuster c	PCR-Muster 19
Abbildung 8: Ergebnis des PCR-Versuchs mit der DSS-Kopplung	gsmethode
a) schematische Darstellung b) Originalaufnahme	
Abbildung 9: Ergebnis des PCR-Versuchs mit der EDC/Methylim	idazol-Kopplung
a) schematische Darstellung b) Originalaufnahme	
Abbildung 10: Kopplungsmethodenvergleich (Verstärkung: 380)	
a) DSS b) BS <sup>3</sup> c) EDC/Methylimidazol	29
Abbildung 11: Kopplungsmethodenvergleich nach Optimierung	
a) DSS (Verst.: 320) b) EDC/Methylimidazol (Vers	it.: 320)
c) EDC/Methylimidazol (Verst.: 280)	31
Abbildung 12: Hybridisierung auf Glas, Vergleich (Verst.: 530)	
<ul> <li>a) Amino 5'-Modifikation b) Phosphor 5'-Modifikat</li> </ul>	ion 33
Abbildung 13: Thermostabilitätstest auf Glas, Vergleich (Verst.: 4	80)
<ul> <li>a) Amino 5'-Modifikation b) Phosphor 5'-Modifikat</li> </ul>	ion 33
Abbildung 14: Übertragung der Methoden auf Plastikobjektträger	
a) Hybridisierung, Vergleich Amino/Phosphor 5'-M	lodifizierung
(Verst.: 400) b) Thermostabilitätsuntersuchung, A	mino 5'-
Modifizierung (Verst.: 300)	35

Abbildung 15:	Versuch mit Amino-5'-Modifikation	
	a) Hybridisierungstest (Verst.: 340) b) Thermostabilitätstest	
	(Verst.: 580)	37
Abbildung 16:	Versuch mit Phosphor-5'-Modifikation	
	a) Hybridisierungstest (Verst.: 360) b) Thermostabilitätstest	
	(Verst.: 720)	38
Abbildung 17:	Agarosegel zur Annealingtemperaturoptimierung	39
Abbildung 18:	Agarosegel zum AmpliSpeed-Programm-Test	40
Abbildung 19:	Ansatz Festphasen-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff Cy3	
	a) Versuch 1 (vergrößert, Verst.: 320) b) Versuch 2	
	(Verst.: 330)	41
Abbildung 20:	Backgroundtest (Verst.: 390)	
	a) Fluoreszenzfarbstoff Cy5 b) Fluoreszenzfarbstoff Cy3	42
Abbildung 21:	Ansatz Festphasen-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff Cy5	
	a) Versuch 1 (Verst.: 500) b) Versuch 2 (Verst.: 440)	43
Abbildung 22:	Versuche der Reproduktion der Festphasen-PCR	
	a) Versuch 1 (Verst.: 520) b) Versuch 2 (Verst.: 600)	
	c) Versuch 3 (Verst.: 600)	44
Abbildung 23:	Ansatz Festphasen-PCR auf Glasobjektträger (Verst.: 570)	45

# Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Objektträger	14
Tabelle 2: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen	15
Tabelle 3: Sequenzen und 5'-Modifikationen der verwendeten Oligonukleoti	de 16
Tabelle 4: Verwendetes PCR-Temperaturprofil für die Thermostabilitätstests	3 21
Tabelle 5: Primerpaarungen für die ersten PCR-Versuche	22
Tabelle 6: Ansatz des PCR-Mixes für den Thermocycler TProfessional	23
Tabelle 7: Ablauf des Thermocycler TProfessional-Programms	23
Tabelle 8: Temperaturgradient der Gradienten-in-situ-PCR	23
Tabelle 9: Ansätze des PCR-Mixes für den AmpliSpeed slide cycler	24
Tabelle 10: Ablauf des AmpliSpeed slide cycler-Programms	25
Tabelle 11: Einstellungen der Gelelektrophorese	25
Tabelle 12: Einstellungen am Microarray Scanner GenePix 4200A	26
Tabelle 13: Zuordnung der gewählten Temperatur des Gradienten mit der	
dazugehörigen Spur	40

# Anhang

Anhang 1: Verwendete Chemikalien und Biomaterialien	VII
Anhang 2: Verwendete Geräte und Materialien	VIII
Anhang 3: Hybridisierungsexperiment mit DSS-Kopplungsmethode	
(Verst.: 390)	IX
Anhang 4: Hybridisierungsexperiment mit EDC/Methylimidazol-	
Kopplungsmethode (Verst.: 310)	IX
Anhang 5: Selbstständigkeitserklärung	X

Anhang 1: Verwendete Chemikalien und Biomaterialien

Chemikalie/Biomaterial	Hersteller
6x Loading Dye	selbst hergestellt
10x Reactionbuffer Y	Peqlab
Aceton	Roth
Agarose, pulverisiert	Peqlab
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS)	Sigma-Aldrich
Bernsteinsäureanhydrid	Sigma-Aldrich
Bis[Sulfosuccinimidyl]-suberat (BS <sup>3</sup> )	Thermo Scientific
Bovines Serumalbumin (BSA)	NewEngland BioLabs®Inc.
Bromphenolblau	Roth
ddH <sub>2</sub> O, 0,1 µm filtriert (für PCR)	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	OML
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Disuccinimidylsuberat (DSS)	Thermo Scientific
Eisessig (Essigsäure)	Prolabo
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	AppliChem
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	Fermentas
Glycerin (Glycerol)	Prolabo
Glycin	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
1-Methylimidazol	Roth
Natriumchlorid	Prolabo
Natriumhydroxid-Plätzchen	AppliChem
PBS	selbst hergestellt
PCR-ÖI	AmpliSens
peqGOLD dNTP-Mix	Peqlab
Sylgard® 184 Silicone Elastomer Base	Dow Corning
Sylgard® 184 Silicone Elastomer Curing Agent	Dow Corning
Stickstoff	Linde
TAE-Puffer	selbst hegestellt
Taq-DNA-Polymerase	Peqlab
Tris-Base	ROTH
Tris-HCI	ROTH

Chemikalie/Biomaterial	Hersteller
Tween 20	ROTH
Xylenecyanol	Sigma-Aldrich

### Anhang 2: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller
Analysewaage	Sartorius
AmpliSpeed Slide Cycler	Beckman Coulter (früher Advalytix)
Becherglas	Sinmax
Färbekästen nach Hellendahl	Duran Group GmbH
Frame-Seal™ Incubation Chambers (9×9 mm)	Bio-Rad
Gelelektrophoreseapparatur	Peqlab
Glasflaschen	Schott Duran
Handschuhe	VWR International
Kühlschrank	Vestfrost
Kühl-Thermomixer MHR 13	HLC
Magnetrührer MR Hei-Mix L	Heidolph
Microarray Scanner GenePix 4200A	Molecular Devices
Mikroliterzentrifuge MIKRO 200 R	Hettich
Mikroliterzentrifuge Rotilabo® Mini-Zentrifuge	Roth
Mikrowelle	Privileg
Pasteurpipetten	VWR International
Petrischalen	Greiner bio-one
pH-Meter	WTW
Pinzette	VWR International
Pipettensatz 0,2 µL–1000 µL	Gilson
Pipettenspitzen (10-1000 μL)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen (5-50 mL)	Falcon
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand
Präzisionswaage	Sartorius
Skalpell	B Braun
Spritzflasche	Nalge
Stoppuhr	Oregon Scientific
Thermocycler TProfessional	Biometra
Tiefkühler	Liebherr

Gerät/Material	Hersteller
Tubes (200 µL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf
Tubes (15 mL, 50 mL)	Falcon
Universalofen	Memmert
UV-Lampe	Osram
UV-System Gel iX Imager	Intas
Vortex	VWR International
Wägeschälchen	VWR International
Wasserbad 7L	GFL

Anhang 3: Hybridisierungsexperiment mit DSS-Kopplungsmethode (Verst.: 390)



Anhang 4: Hybridisierungsexperiment mit EDC/Methylimidazol-Kopplungsmethode

(Verst.: 310)

Anhang 5: Selbstständigkeitserklärung

Bearbeiter:	Carolin Hartwig
	Dresdner Straße 270
	01705 Freital
	geb. am 14.12.1987 in Dresden
Matrikelnummer:	3298421
Studiengang:	Verfahrenstechnik
Studienrichtung:	Bioverfahrenstechnik
	TU Dresden
Hochschulbetreuer:	DiplIng. Philipp Quenzel
Externer Betreuer:	Dr. Dirk Kuhlmeier

Ich versichere, dass ich die vorliegende Interdisziplinäre Projektarbeit mit dem Thema "Neue Applikationsmethoden zur Durchführung einer Nukleinsäurevervielfältigung im Bereich der Pathogendiagnostik" selbstständig verfasst und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften entnommenen Gedanken habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum