

**Entwicklung von
Microarrays für die Multiparameteranalytik
und
Etablierung einer Multiplex-OnChip-PCR**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Dipl.-Biol., MBA Dennie Andresen
geboren am 10. Dezember 1975 in Flensburg

Potsdam, den 5. März 2009

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3946/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-39462>
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-39462>

*Was du mir sagst, das vergesse ich.
Was du mir zeigst, daran erinnere ich mich.
Was du mich tun lässt, das verstehe ich.
Konfuzius*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABKÜRZUNGEN UND GLOSSAR	11
1 EINLEITUNG UND MOTIVATION	13
2 GRUNDLAGEN	15
2.1 MICROARRAYS – EINE KURZE EINFÜHRUNG	15
2.2 EINSATZGEBIETE FÜR MICROARRAYS IN FORSCHUNG UND DIAGNOSTIK	17
2.2.1 MICROARRAY FÜR DIE DETEKTION VON GEFLÜGELPATHOGENEN – DER POULTRYCHIP	21
2.2.2 MICROARRAY FÜR DIE LEBENSMITTELANALYTIK – DER ALLERGENCHIP	25
2.3 ONCHIP-PCR FÜR DIE MULTIPARAMETERANALYSE	33
2.3.1 FUNKTIONSPRINZIP DER ONCHIP-PCR MIT EINEM IMMOBILISIERTEN PRIMER	36
2.4 HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION – HDA	38
3 MATERIAL UND METHODEN	40
3.1 MATERIAL	40
3.2 METHODEN	40
3.2.1 KOPPLUNGSMETHODEN ZUR IMMOBILISATION VON DNA AUF GLASOBERFLÄCHEN	40
3.2.2 VERWENDETE SPOTTINGVERFAHREN	41
3.2.3 BLOCKING	41
3.2.4 DNA-ISOLATION AUS UNTERSCHIEDLICHEN MATRIZES	42
3.2.5 PCR-VERFAHREN	43
3.2.6 SINGLEPLEX-PCR	44
3.2.7 MULTIPLEX-PCR	44
3.2.8 LIGHTCYCLER PCR	45
3.2.9 HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION (HDA)	47
3.3 ONCHIP-AMPLIFIKATIONEN	48
3.3.1 SINGLEPLEX-ONCHIP-PCR	48
3.3.2 ONCHIP-PCR MIT FLUORESCENZMARKIERTEN DUTP	49
3.3.3 MULTIPLEX-ONCHIP-PCR	49

3.3.4	SINGLEPLEX- UND DUPLEX-ONCHIP-HDA	49
3.4	AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE	50
3.5	AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN	50
3.6	GENERIERUNG EINZELSTRÄNGIGER DNA (ssDNA)	51
3.7	CHIP-HYBRIDISIERUNG	52
3.8	DATENAUSWERTUNG	53
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4.1	POULTRY CHIP	56
4.1.1	SINGLEPLEX- UND MULTIPLEX-PCR	56
4.1.2	CHIPLAYOUT POULTRYCHIP	59
4.1.3	HYBRIDISIERUNG AUF DEM POULTRYCHIP	60
4.1.4	ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	66
4.2	ALLERGENCHIP	70
4.2.1	SINGLEPLEX- UND MULTIPLEX PCR	70
4.2.2	SINGLEPLEX-PCR AM LIGHTCYCLER	74
4.2.3	MULTIPLEX-PCR AM LIGHTCYCLER	76
4.2.4	OPTIMIERUNG BEI DUPLEX- UND TRIPLEX-PCR-ANSÄTZEN	78
4.2.5	ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG DER PCR-VERFAHREN	83
4.2.6	DETEKTION VON ALLERGENEN LEBENSMITTELINHALTSSTOFFEN MIT DEM ALLERGENCHIP	83
4.2.7	ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG DER HYBRIDISIERUNGSERGEBNISSE	90
4.3	ONCHIP-AMPLIFIKATION	94
4.3.1	IMMOBILISIERUNGSVERSUCHE AUF GLAS MIT EPOXYSILAN-BESCHICHTUNG	94
4.3.2	VERGLEICH ZWEIER DNA-POLYMERASEN HINSICHTLICH ONCHIP-PCR EIGNUNG	98
4.3.3	ONCHIP-PCR MIT FLUORESCENZMARKIERTEN dJTP	100
4.3.4	NACHWEIS VON ALLERGENEN LEBENSMITTELINHALTSSTOFFEN MIT HILFE DER ONCHIP-PCR	108
4.3.5	ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG DER ONCHIP-PCR VERSUCHE	116
4.3.6	ONCHIP-HDA	125
4.3.7	ONCHIP-MULTIPLEX-HDA	128
5	ZUSAMMENFASSUNG	131
6	AUSBLICK	134
7	LITERATURVERZEICHNIS	137
ANHANG A	MATERIAL	147
1.	LABORGERÄTE	147
2.	HANDELSÜBLICHE KITS UND ENZYME	147
3.	VERBRAUCHSMATERIALIEN	148
4.	CHEMIKALIEN	149

Inhaltsverzeichnis

5. PUFFER	149
6. PRIMER	150
<u>ANHANG B PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN</u>	151
<u>DANKSAGUNG</u>	154
<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u>	156

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Funktionsprinzip der OnChip-PCR mit einem immobilisierten Primer	36
Abb. 2 Schematische Darstellung der HDA	38
Abb. 3 Exonukleaseverdau von dsDNA	51
Abb. 4 Singleplex- und Multiplex-PCR Nachweis von IBD, AIV, Reo und NDV (4% Agarosegel).....	57
Abb. 5 Singleplex-PCR (links) und Singleplex- und 5er Multiplex-PCR (rechts) der viralen Pathogene MDV, CAV, Reo, NDV und IBD (4%Agarosegel).....	58
Abb. 6 Finales PoultryChip Layout.....	60
Abb. 7 Nachweis des Infectious Bursal Disease Virus über Hybridisierungssonden.....	61
Abb. 8 Quantitative Auswertung über den Kontrastwert für die RNA-Viren und bakterielle Erreger	62
Abb. 9 Detektion von vier Geflügelpathogenen nach spezifische Multiplex-PCR.....	63
Abb. 10 Quantitative Auswertung der Kontrastwerte für verschiedene Multiplex-Hybridisierungen auf dem PoultryChip	65
Abb. 11 4% Agarosegel zur Detektion von Singleplex- und Duplex-PCR Produkten	71
Abb. 12 4% Agarosegel; Allergen Multiplex-PCR (4er und 5er Multiplex)	72
Abb. 13 4% Agarosegel; Allergen Multiplex-PCR (7er und 6er Multiplex)	73
Abb. 14 Realtime-PCR mit 1:10 Verdünnungsreihe von Mandel-DNA	74
Abb. 15 Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate aus der Realtime-PCR zum Nachweis von Mandel-DNA	75
Abb. 16 Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte aus Einzel- und Multiplex-PCRs.....	78
Abb. 17 Schmelzpunktanalyse für die Primeroptimierung bei einer Triplex-PCR.....	79
Abb. 18 Triplex-PCR Erdnuss/Mandel/Soja Primerverhältnis 6:1:1	80
Abb. 19 Optimierte Duplex- und Triplex-PCRs mit Haselnuss-, Erdnuss- und Mandel-DNA	81
Abb. 20 4% Agarosegel zur Analyse von Duplex- und Triplex-PCRs zum Nachweis von Allergen-DNA	82
Abb. 21 Nachweis von unterschiedlichen Allergen-DNAs nach spezifischer Multiplex-PCR.....	85
Abb. 22 Kreuzhybridisierungstest mit allergenspezifischen Primern	86
Abb. 23 Kreuzhybridisierungstest mit einer PCR Negativkontrolle	87

Abb. 24 Hybridisierung und Auswertung nach PCR zum Nachweis von Sellerie bzw. Soja aus Realproben (low ppm Bereich)	88
Abb. 25 Strukturformeln verschiedener Blockingreagenzien	95
Abb. 26 Arraylayout	95
Abb. 27 Qualitativer Vergleich zwischen Schott und Corning Epoxysilan-Chip mit Ethanolamin- und GABA-Blocking (Scan bei 30db).....	96
Abb. 28 Quantitative Auswertung von Schott und Corning Epoxysilan-Chip mit Ethanolamin- und GABA-Blocking (Scan bei 30db).....	97
Abb. 29 Vergleich der Kontrastverhältnisse und Signalintensitäten nach Multiplex OnChip-PCR mit FastStart Polymerase bzw. Titanium Taq Polymerase	99
Abb. 30 Hybridisierung mit Erdnuss- und Soja-Amplifikaten nach Duplex-PCR mit Cy3-dUTP und Cy5-Primer	101
Abb. 31 Vergleich der Signalintensitäten zwischen Markierung mit Cy5 Primer / Cy5 dUTP und Cy5 Primer	103
Abb. 32 OnChip PCR zum Nachweis von Haselnuss DNA (10^4 Kopien) mit Cy3-dUTP und Cy5-Primer	104
Abb. 33 OnChip-Multiplex-PCR zum Nachweis von Erdnuss- und Soja-DNA (je 10^4 Kopien) mit Cy3-dUTP und Cy5-Primer	105
Abb. 34 Singleplex-OnChip-PCR mit jeweils 10^7 -Kopien Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA	109
Abb. 35 Zusammenfassung der ermittelten Kontrastwerte für OnChip-PCRs.....	110
Abb. 36 Quantitative Auswertung von Duplex-, Triplex-, und Quadruplex-OnChip-PCRs über den Kontrastwert.....	111
Abb. 37 OnChip-PCR zum Nachweis von allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen aus unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes	113
Abb. 38 6er und 7er Multiplex-OnChip-PCR zum Nachweis von verschiedenen Allergenen	114
Abb. 39 Array Layout OnChip-HDA	126
Abb. 40 OnChip-HDA zum Nachweis von MRSA.....	126
Abb. 41 OnChip-HDA zum Nachweis von <i>N. gonorrhoeae</i>	127
Abb. 42 Duplex OnChip - HDA	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Allgemeine Übersicht der für den PoultryChip ausgewählten Pathogene.....	23
Tabelle 2 Vergleich protein-basierte und DNA-basierte Lebensmittelallergen-Analytik.....	32
Tabelle 3 Verwendete Polymerasen	43
Tabelle 4 Eignung verschiedener Polymerasen für die Singleplex- und Multiplex-PCR zum Nachweis von Geflügelpathogenen	67
Tabelle 5 Zusammenfassung: Tests von Realproben mit dem AllergenChip	89
Tabelle 6 Zusammenfassung der OnChip-PCR Versuche mit fluoreszenzmarkierten dUTP und Primern	107
Tabelle 7 Verschiedene Kompartimentierungsmöglichkeiten für die OnChip-PCR	123
Tabelle 8 Primersequenzen für die HDA Versuche	150

Abkürzungen und Glossar

Abb.:	Abbildung
ADHS:	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
Bp:	Basenpaare
bspw.:	beispielsweise
Ct:	Threshold Cycle = Der PCR Zyklus, in dem das kumulierte Fluoreszenzsignal, das Hintergrundsignal, übersteigt.
cDNA:	complementary DNA
dest.:	destilliert
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP:	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
dsDNA:	double stranded DNA = doppelsträngige DNA
dUTP:	2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat
EDC:	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-carbodiimid
EDTA:	Ethylendiamintetra-Acetat
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr:	Ethidiumbromid
EtOH:	Ethanol
fmol:	Femtomol (femto = 10^{-15})
GABA:	gamma-Aminobuttersäure
h:	Stunde
HDA:	Helicase abhängige Amplifikation
Kb:	Kilobasen
MRSA:	Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
min:	Minute
µg :	Mikrogramm
µl :	Mikroliter (mikro = 10^{-6})
µM:	Mikromolar
µs:	Mikrosekunde
ng:	Nanogramm (nano = 10^{-9})
pg:	Picogramm (pico = 10^{-12})
PCR:	Polymerasekettenreaktion (eng.: Polymerase Chain Reaction)
ppm:	parts per million
RNA:	Ribonukleinsäure
Rpm:	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)

SSC: Saline-Sodium-Citrate-Puffer
s: Sekunde
SDS: Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
ssDNA: single stranded DNA = einzelsträngige DNA
ssRNA: single stranded RNA = einzelsträngige RNA
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
Tab.: Tabelle
TAE: Tris-Acetat-EDTA-Puffer
 T_m : Schmelztemperatur (melting temperature)
z.B.: zum Beispiel

1 Einleitung und Motivation

Die molekulare Diagnostik stellt ein stetig wachsendes Forschungsgebiet dar, welches auch zunehmend an wirtschaftlicher und gesundheitspolitischer Bedeutung gewinnt. Die Anwendung schneller und zuverlässiger Nachweisverfahren wird vermehrt für die Untersuchung einer großen Proben- bzw. Probandenanzahl benötigt. Bestehende Verfahren haben bis auf wenige Ausnahmen Nachteile, da sie oft zu zeit- und kostenintensiv sind. Um dieser Problematik zu begegnen, steht die Miniaturisierung und Parallelisierung konventioneller Nachweisverfahren im Mittelpunkt aktueller Forschungsarbeiten. Hierbei ist vor allem die Microarray-Technologie von Interesse. Microarrays präsentieren eine Vielzahl von Liganden, beispielsweise DNA- oder Proteinmoleküle, in einer örtlich aufgelösten Anordnung, gekoppelt an einen planaren Träger. Dies erlaubt die Durchführung von hochparallelen Experimenten und die Generierung großer Datenmengen in einem einzigen Experiment. Auf Grund dieser Eigenschaften konnten sich Microarrays als wichtige Forschungsinstrumente etablieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Multiplex-PCRs und diagnostische Microarrays zu entwickeln, die für analytische Fragestellungen eine schnelle und zuverlässige Multiparameteranalytik ermöglichen, um diesbezügliche Einschränkungen aktueller Nachweisverfahren zu vermeiden. Als Anwendungen wurde zum einen ein Nachweissystem für acht relevante Geflügelpathogene zur Überwachung in der Geflügelzucht und zum anderen ein Nachweissystem zur Identifikation potentiell allergener Lebensmittelinhaltsstoffe entwickelt.

In den beiden genannten Bereichen ist der Bedarf für Multiparametertests hoch. Bisherige DNA-analytische Verfahren sind derzeit dominiert durch die PCR bzw. Realtime-PCR. Beide Verfahren zeichnen sich durch ihre hohe Sensitivität aus. Technologisch betrachtet sind die Verfahren gut für die Multiparameteranalytik geeignet. Multiplex-PCRs, d.h. PCR-Verfahren, die in einem Reaktionsansatz mehrere Zielsequenzen parallel nachweisen können, wurden für verschiedenste Fragestellungen publiziert [1]. Einschränkungen in der Multiplexfähigkeit liegen bei der Detektion der PCR-Produkte. Klassische PCR-Verfahren nutzen Agarose- oder Polyacrylamidgele zum Nachweis der amplifizierten PCR-Produkte. Durch das relativ geringe Auflösungsvermögen der Gele können PCR-Produkte mit Größenunterschieden <4bp nicht mehr differenziert werden [2]. Multiplex-PCRs müssen daher entsprechend aufwendig entwickelt werden, damit die Amplifikate der gesuchten Zielsequenzen entsprechende Größenunterschiede aufweisen, die eine Differenzierung im Gel ermöglichen. Bei der Realtime-PCR wird eine fluoreszenzbasierte Detektion geführt. Die technologische

Hürde bei dieser Art der Detektion besteht darin, dass für jede Zielsequenz, die in einem Multiplex-Ansatz amplifiziert werden soll, ein spezifischer Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden muss. Derzeit ist allerdings eine Detektion von mehr als vier Parametern mit der Realtime-PCR nicht realisiert worden.

Neben der Entwicklung geeigneter PCR und Multiplex-PCR-Verfahren sowie spezifischer Microarrays für die Detektion der gesuchten Zielsequenzen stand auch die weiterführende Integration von DNA-Amplifikation und Microarray-Technologie im Fokus dieser Arbeit. Die OnChip-Amplifikation stellt eine Möglichkeit dar, um DNA-Analytik und Detektion in einem Reaktionsschritt zu integrieren. Entsprechend wurden die zuvor in der Arbeit entwickelten PCR- und Multiplex-PCR-Verfahren zum sequenzspezifischen Nachweis potentiell allergener Lebensmittelinhaltsstoffe für die OnChip-Amplifikation adaptiert und Reaktionsbedingungen getestet, die eine Multiparameteranalyse auf dem Chip ermöglichen.

Ein Schritt in Richtung einer möglichen Verwendung im Point of Care-Bereich stellt der Einsatz eines isothermalen Amplifikationsverfahrens dar. Vorteile ergeben sich durch den Verzicht auf das sonst in PCR-Verfahren benötigte Thermocycling. Dies bedeutet, dass eine einfache Heizquelle für die isothermale Amplifikation ausreicht, wohingegen für das Thermocycling leistungsfähige Peltierelemente benötigt werden, um die in der PCR benötigten Heiz- und Kühlraten zu gewährleisten. Der Wegfall solcher Peltiers kann die Integration der OnChip-Amplifikation in mobile Analysegeräte oder Lab on Chip-Systeme vereinfachen und für den Einsatz in Point of Care-Umgebungen qualifizieren. In dieser Arbeit wurde eine noch junge isothermale Amplifikationsmethode, die helicase-abhängige Amplifikation, hinsichtlich ihrer Eignung für die Integration auf einem Microarray getestet.

2 Grundlagen

2.1 Microarrays – eine kurze Einführung

Microarrays werden sowohl für die DNA- als auch für die Protein- oder Glycom-Analytik eingesetzt. Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich auf DNA-Microarrays fokussiert, wird nachfolgend die Entwicklung der DNA-basierten Arrays beschrieben.

Die ersten Publikationen, die sich mit der Entwicklung der Microarrays beschäftigten stammen aus den Jahren 1991 und 93 von Fodor et al. [3, 4], die photolithographische Verfahren für die Erzeugung orts aufgelöster Strukturen und die Synthese von Oligonukleotidsonden verwendeten. Die Arbeitsgruppe von Schena und Brown beschrieb 1995 [5] eine weitere Möglichkeit der Microarrayherstellung über Druck- bzw. Spottingverfahren. Beide Arbeitsgruppen gelten heute als die Begründer der Microarray-Technologie.

Bei der OnChip-Synthese werden die Nukleinsäuresonden direkt auf der Chipoberfläche synthetisiert. Dabei reagieren Phosphoramidit-aktivierte dNTPs mit funktionalen Gruppen, wie z.B. Hydroxylgruppen, an der Chipoberfläche. Für die Oligosynthese an der Oberfläche wird ein Startermolekül mit einer photolabilen Schutzgruppe an der Chipoberfläche immobilisiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Dies führt zu der Zerstörung der Schutzgruppe und der Formierung einer Hydroxylgruppe, an die ein korrespondierendes Phosphoramidit-aktiviertes dNTP binden kann. Um eine gezielte orts aufgelöste Synthese zu ermöglichen, werden verschieden strukturierte photolithographische Masken genutzt, so dass gezielt bestimmte Arraypositionen entschützt werden können. Durch das Wiederholen dieses Vorgangs wird mit verschiedenen strukturierten Masken die Synthese eines Oligonukleotids mit einer bestimmten Sequenz an einer definierten Arrayposition ermöglicht [6]. Das Verfahren wurde 1991 von Fodor et al. entwickelt und ermöglicht die Herstellung von Microarrays mit extrem hoher Dichte. Die Firma Affymetrix nutzt dieses Verfahren, um Chips mit Dichten von bis zu 1.8 Mio. Gensonden zu produzieren. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist, dass maximal nur 25 Nukleotide über den photolithographischen Prozess fehlerfrei miteinander verknüpft werden können. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass keine chemische Reaktion zu 100% fehlerfrei abläuft, d.h. dass mit jedem neu angefügten Nukleotid die Fehlerrate steigt [7].

Schena et. al verwendeten 1995 in ihrer Arbeit ein Kontaktprinting-Verfahren mit einem selbst entwickelten Spotting-Roboter. Bei dem Kontaktprinting nutzt man spezielle Nadeln (Pins), mit denen Flüssigkeiten in Piko- bis Nanoliter-Volumina auf die Chipoberfläche übertragen werden. Durch das Kontaktieren der Chipoberfläche wird die an der Nadelspitze adhärierende Flüssigkeit platziert. Als Sonden wurden bereits synthetisierte Oligonukleotide oder cDNAs verwendet. Diese Methode der Dispensierung findet häufiger Anwendung bei der Herstellung von Microarrays, da diese Technologie nicht wie die Photolithographie auf Sondenlängen von 25 Nukleotiden beschränkt ist und somit flexibler und vielfältiger für verschiedene Fragestellungen einsetzbar ist. Neuere Verfahren nutzen Nicht-Kontakt-Verfahren, wie z.B. Piezotechnologien, um die Sonden auf das planare Trägermaterial aufzubringen. Sowohl Kontakt- als auch Nicht-Kontakt-Verfahren ist gemein, dass sie nur sehr geringe Volumina (Tropfen oder Features) auf das Trägermaterial aufbringen.

Zu Beginn der Microarray-Ära wurden in erster Linie Glasobjektträger für die Immobilisierung der DNA-Sonden verwendet, z.T. wurden auch Glasobjektträger mit den vom Blotting bekannten Nylon- oder Nitrocellulose-Membranen beschichtet. Heute werden neben den klassischen Glassubstraten auch vermehrt Polymersubstrate als Trägermaterial eingesetzt.

Damit die Sonden auf dem Trägermaterial immobilisiert werden können, müssen entweder die Trägersubstrate oder die Sonden funktionalisiert werden. Hierfür gibt es eine Vielzahl verschiedener Strategien, die von verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen (Amino-, Aldehyd-, Epoxysilanisierung, Nylon- und Nitrocellulose-Membranen, Plasmaaktivierung, etc.) über verschiedene adsorptive oder kovalente Kopplungsmechanismen bis zu der Verwendung von hetero- und homo-bifunktionalen Crosslinkern reichen [8-22]. Welche der vielfältigen Möglichkeiten die geeignete oder beste ist, hängt dabei häufig von der Anwendung und dem nachzuweisenden Analyten ab.

Für die Detektion stellt der Nachweis über Fluoreszenz die bei weitem gebräuchlichste Methode für die Verwendung auf Microarrays dar. Fluoreszenzfarbstoffe können endständig an einem Primer oder an dUTPs (2'-Desoxyuridin 5'-Triphosphat) gekoppelt werden und so während der PCR spezifisch in das gesuchte PCR-Produkt eingebaut werden. Da Microarrays üblicherweise im trockenen Zustand ausgelesen werden, nutzt man entsprechend im Trocken auslesbare Fluoreszenzfarbstoffe wie die Cyanfarbstoffe Cy5 und Cy3 für die Kopplung an Primern und dUTPs [23, 24]. Eine weitere Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung bieten interkalierende Farbstoffe, die sich im Falle einer erfolgreichen Hybridisierung zwischen den Basenpaaren des DNA-Doppelstrangs einlagern.

Auf Grund der Miniaturisierung und der massiven Parallelisierung, die mit Microarrays erzielt werden konnte, wurden neue bioinformatische Ansätze benötigt, um die Information der hochdichten Microarrays analysieren und interpretieren zu können. Durch die Komplexität

der Informationen sowie der Vielzahl der unterschiedlichen Arbeitsschritte, die bei Experimenten mit hochdichten Microarrays erforderlich sind, wurde eine Standardisierung benötigt, um die Vergleichbarkeit und Qualität der gewonnenen Informationen zu gewährleisten. Insbesondere bei Transkriptomanalysen, die mit hochdichten Microarrays mit mehreren tausenden Genen durchgeführt werden, sollten Richtlinien bei der Planung und Durchführung der Experimente helfen. Erste konkrete Richtlinien für die Standardisierung von Microarray-Experimenten wurden 2001 und 2002 von Quackenbush et al. [25, 26] publiziert. Initiativen wie z.B. die Microarray Gene Expression Data Society (MGED) und das European Bioinformatics Institute (EBI) erarbeiteten weitere Richtlinien für die Durchführung von Microarray-Experimenten [27-29], die als MIAME-Standards (Minimum Information About a Microarray Experiment) bekannt sind.

2.2 Einsatzgebiete für Microarrays in Forschung und Diagnostik

Eines der ersten Anwendungsgebiete und maßgebliche Triebfeder für die Microarray-Technologie war die Transkriptomanalyse. Hierbei wird die Genexpression von mehreren Genen bis hin zu dem gesamten Genom eines Organismus betrachtet. Um Veränderung in der Genexpression zu identifizieren, wird fragmentierte genomische DNA von einem „Test“- und einem „Referenz“-Gewebe unterschiedlich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (z.B. Cy3 für das „Test-“, und Cy5 für das „Referenzgewebe“) und gegen Sonden auf einem Microarray hybridisiert. Ist ein bestimmtes Gen im Vergleich zum Referenzgewebe überexprimiert kommt es an der korrespondierenden Sondenposition zu einem verstärkten Signal von Cy3, bei einer niedrigeren Expression des Gens im „Testgewebe“ wird ein stärkeres Cy5 Signal gemessen. Ist das Gen sowohl in „Test-“, als auch in „Referenzgewebe“ gleich stark exprimiert, so hybridisieren die entsprechenden Sequenzen zu gleichen Teilen an der korrespondierenden Sonde und es wird ein gleich hohes Signal für Cy3 und Cy5 gemessen. In einer Falschfarbendarstellung, in der Cy5-Signale rot und Cy3-Signale grün dargestellt werden, würde bei einer gleich hohen Expression an der entsprechenden Sondenposition eine Mischfarbe aus Rot und Grün resultieren (Gelb). So kann für die Gesamtheit aller Gene auf einem Microarray der Expressionsstatus ermittelt werden. Durch die genomweite Analyse kann somit der *status quo* einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt unter bestimmten Einflüssen analysiert werden. Anwendungsbeispiele sind in der Tumorforschung oder bei der Analyse von charakteristischen Expressionsmustern bei Krankheiten wie Diabetes, Adipositas, Schizophrenie, Alzheimer u.a. [30-33] zu finden.

Neuere Expressionsanalysen, die mit Hilfe von Microarrays durchgeführt werden, untersuchen die Expression von miRNAs (microRNA). miRNAs gehören zu der Klasse nichtkodierender RNA-Moleküle, die eine Rolle bei der Regulation der Genexpression auf

posttranskriptionaler Ebene spielen, indem sie komplementär an die untranslatierte 3'-Region der mRNA binden. Auf Grund der im Vergleich zu normalem Gewebe ungewöhnlich niedrigen Expression von miRNAs in verschiedenen Tumorarten, wurden miRNAs für die Tumorforschung zunehmend interessant [34]. Mit Hilfe hochdichter Microarrays wurde es möglich, die Expression aller bekannten miRNAs humaner Tumorarten zu analysieren und charakteristische miRNA-Expressionsmuster für die Differenzierung der Tumore zu identifizieren, die als diagnostische Marker-Sets dienen.

Neben der Analyse von Expressionsmustern werden Microarrays auch für die Analyse von Chromosomen genutzt. Bei der „Comparative genomic hybridization“ (CGH) werden quantitative Analysen durchgeführt, die es ermöglichen, Chromosomenregionen zu identifizieren, welche Gene enthalten, die für bestimmte Krankheiten bzw. Krankheitsbilder verantwortlich sind. Ähnlich der Transkriptomanalyse wird bei der CGH fragmentierte genomische DNA von einem „Test“- und einem „Referenz“-Gewebe unterschiedlich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (z.B. Cy3 und Cy5) und gegen Sonden auf einem Microarray hybridisiert. Die Sonden repräsentieren dabei einzelne Genomabschnitte, deren Position innerhalb des untersuchten Chromosoms bekannt ist. Das Verhältnis zwischen Test- und Referenz-Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung zeigt die relative Anzahl von Genkopien in den einzelnen Abschnitten des Zielgenoms. Mit Hilfe solcher Studien können z.B. Aberrationen oder Deletionen in einzelnen Chromosomenabschnitten identifiziert werden, die eine wichtige Rolle bei der Initiierung von Tumorwachstum spielen [35].

Auf Grund ihres extrem hohen Parallelisierungspotentials werden Microarrays auch in Bereichen der Pharmakogenomik genutzt. Die Pharmakogenomik wird häufig mit der Pharmakogenetik synonym verwendet. Tatsächlich ist die Trennung der beiden Bereiche nur schwer möglich. Man geht allerdings nach einer Definition der WHO davon aus, dass die Pharmakogenomik versucht über Genotypisierungsstudien gezielt medizinische Wirkstoffe für eine spezifische Patienten-Population zu entwickeln. Wo hingegen die Pharmakogenetik den Einfluss bestimmter Wirkstoffe auf das Genom eines einzelnen Individuums untersucht [36]. Bei der Pharmakogenetik steht also die Arzneimittelwirkung auf das Individuum im Vordergrund, bei der Pharmakogenomik hingegen die Arzneimittelentwicklung. Dieses Anwendungsgebiet für Microarrays ist noch jung, wird aber zukünftig ein immer größeres Einsatzgebiet darstellen.

Die bisher vorgestellten Anwendungsgebiete benötigen Microarrays mit einer möglichst hohen Sondendichte, um eine Vielzahl unterschiedlicher Nukleinsäuresequenzen parallel zu analysieren. Diese sogenannten hochdichten Arrays helfen bei dem Auffinden von Genen, die mit bestimmten Krankheitsbildern assoziiert werden können. Solche Gene werden als genetische Marker bezeichnet. Wenn ein bestimmtes Set an charakteristischen genetischen

Markern bekannt ist, können diese auf sogenannten „low density“-Chips zusammengefasst und für die Diagnostik des entsprechenden Krankheitsbildes eingesetzt werden. Die Nukleinsäuresequenz der Marker-Gene ist im Krankheitsfalle also mit Hilfe eines Microarrays nachweisbar.

Nicht nur für die Diagnostik bestimmter Krankheitsbilder sondern auch für den Spezies-spezifischen Nachweis werden Microarrays mit niedriger Dichte eingesetzt. Dabei werden spezifische Nukleinsäureabschnitte innerhalb des Genoms der gesuchten Spezies ausgewählt und mit Hilfe komplementärer Nukleinsäuresonden identifiziert, die auf dem Microarray immobilisiert sind. Solche Arrays werden vorzugsweise im Bereich der Infektionsbiologie bei der Identifikation von pathogenen Mikroorganismen angewendet, wo in der Regel die Zielsequenzen bereits bekannt sind. Daher werden in diesem Bereich in erster Linie nur Arrays mit geringer Dichte benötigt (max. 100 Sonden). Neben der Identifikation von Pathogenen ist auch die Identifikation von Antibiotikaresistenzen mit Hilfe von Microarrays von zunehmendem Interesse und wurde bereits vielfach beschrieben [37-44]. Weitere Anwendungsgebiete diagnostischer Microarrays finden sich in den Gebiete Autoimmunkrankheiten, Allergien, neurologische Erkrankungen, Pränatal-Diagnostik, u.a. [45].

Bisher gibt es nur wenige für die Diagnostik zugelassene Microarray-basierte Verfahren, wie z.B. den AmpliChip CYP450 der Fa. Roche Diagnostics sowie einige CE-zertifizierte Microarrays der Fa. Greiner BioOne.

Bei dem AmpliChip handelt es sich um einen auf Affymetrix-Technologie basierenden pharmakogenetischen Test für die klinische Anwendung. Mit diesem Chip wird der Genotyp eines Patienten bestimmt, indem CYP450 2D6 und 2C19 analysiert werden. Das Cytochrom P450-System hat einen starken Einfluss auf den Metabolismus vieler Medikamente. Die beiden Gene 2D6 und 2C19 kodieren für Enzyme, die viele Antidepressiva, Antipsychotika, ADHS-Medikamente und andere Arzneimittel metabolisieren [46].

Greiner BioOne bietet verschiedene Arrays für den Nachweis von HPV (humanes Papilloma Virus), Mycoplasmen sowie verschiedenen Parodontoseerregern an. Ein weiteres Produkt wird für die Differenzierung von Tierarten in Lebensmitteln angeboten. Dieses Produkt hilft bei der Analyse tierischer Bestandteile in Lebensmitteln und wird in der Lebensmittelkontrolle eingesetzt.

Ein entscheidender Aspekt in der Diagnostik ist neben der Spezifität die Sensitivität. Die PCR bietet neben einer hohen Spezifität auch eine sehr hohe Sensitivitätsgrenze. Theoretisch ist es möglich ausgehend von einer DNA-Matrize 2^n -Kopien herzustellen, wobei n der Anzahl der verwendeten PCR-Zyklen entspricht. Daher hat sich im Bereich der DNA-Analytik die PCR auch in vielen diagnostischen Fragestellungen als Methode der Wahl

durchsetzen können. Die Realtime-PCR ermöglicht dabei eine Quantifizierung von PCR-Produkten über Fluoreszenzdetektion und bietet damit eine weitere Verbesserung der PCR-Analytik. Allerdings besitzt die Realtime-PCR eine geringe Multiplexfähigkeit. Die Möglichkeit mehrere Zielsequenzen parallel nachzuweisen, ist sehr eingeschränkt. Das entscheidende Problem hierbei ist, dass es momentan nur Realtime-PCR-Geräte gibt, die maximal sieben verschiedene Detektionskanäle für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffen bereitstellen.

Hier bietet die Multiplexfähigkeit der Microarray-Technologie Vorteile gegenüber den bestehenden Verfahren. Durch die Ortsauflösung können verschiedene Zielsequenzen mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff zuverlässig parallel detektiert werden. Derzeit wird bei der Multiplex-Diagnostik von Pathogenen zunehmend eine Kombination aus PCR-Amplifikation mit nachfolgender Microarray-Hybridisierung eingesetzt. Diese Kombination bietet dabei eine schnelle, sensitive und spezifische Plattform für die parallelisierte Detektion. Allerdings bedarf es immer einer Anpassung und Optimierung der Microarrays an die jeweilige Anwendung, damit eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse sichergestellt werden können, die den Einsatz in der späteren Routinediagnostik gewährleisten. Dazu gehören die bereits in der Einführung zur Microarray-Technologie genannten Parameter, wie Oberflächenkopplung, Auswahl geeigneter Trägermaterialien, Signalamplifikation, Detektion und Auswertungsstrategien und die Auswahl geeigneter DNA-Sequenzen für das Sondendesign.

In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, solche Microarrays zu entwickeln, die für die Multiparameteranalytik geeignet sind. Als Anwendungsbeispiele wurden dazu unterschiedliche Einsatzbereiche aus der Agrar- und Lebensmittelindustrie gewählt. Motivation und Hintergrund für die Auswahl dieser beiden Anwendungen werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

2.2.1 Microarray für die Detektion von Geflügelpathogenen – Der PoultryChip

Als erstes Anwendungsbeispiel sollte ein Microarray entwickelt werden, der es ermöglicht, mehrere relevante Pathogene in einem Analysegang zu detektieren. Für den Nachweis wurden sechs virale und drei bakterielle Geflügelpathogene ausgewählt, die eine entsprechende Relevanz in der Geflügelzucht und -produktion haben. Zu diesen zählten *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* und *Campylobacter jejuni*, sowie die viralen Erreger *Avian Reovirus*, *Infectious Bursal Disease Virus*, *Newcastle Disease Virus*, *Chicken Anemia Virus*, *Mareks Disease Virus* und *Avian Infectious Bronchitis Virus*.

Motivation

Als einer der wichtigsten Bereiche der Lebensmittelindustrie zeichnet sich die Geflügelindustrie mit mehreren Mrd. Euro Umsatz in Deutschland aus. Prominente Beispiele wie das Vogelgrippevirus zeigen allerdings auch, wie schnell es zu hohen wirtschaftlichen Verlusten in diesem Industriezweig kommen kann. Aber nicht nur das H5N1-Virus, welches der Auslöser der Vogelgrippe ist, sondern auch andere virale oder mikrobielle Erreger sorgen jährlich für Millionenschäden durch den Tod tausender Tiere. Neben den Ausfällen in der Produktion kann es allerdings auch zu Übertragungen von Krankheitserregern von Geflügel und Geflügelprodukten auf den Menschen kommen.

Man geht davon aus, dass ca. 46% des Geflügelfleisches weltweit mit *Listeria monocytogenes* kontaminiert ist [47, 48]. Kontaminationsraten für *Campylobacter* liegen bei ca. 36% [49, 50]. Grund für die hohe Durchseuchung sind neben der unzureichenden Desinfektion der Stallungen auch die hohen Tierdichten in den Massenproduktionsstätten, die eine Ausbreitung des Erregers in kürzester Zeit ermöglichen. Neben *Campylobacter* und *Listerien* sind vor allem *Salmonellen* die häufigsten Pathogene beim Menschen, die durch den Verzehr von Geflügelfleisch und mangelnde Haushaltshygiene übertragen wird. Nur die Stämme der Spezies *Salmonella enteritica* sind für den Menschen von pathogener Bedeutung. Innerhalb dieser Spezies gibt es allerdings eine Unterteilung in 2300 Serovare. Die Unterteilung in Serovare erfolgt anhand der hypervariablen Antigenausrüstung der einzelnen *Salmonellen*. Die für den Menschen bedeutendsten sind die Serovare *Enteritidis* mit einem Anteil von 58,1% (1999) an allen festgestellten *Salmonellen*-Erkrankungen und *Typhimurium* mit einem Anteil von 27,7 % (1999) [51, 52].

Die viralen Erreger sind hingegen für das Geflügel selbst pathogen und führen bei einer Infektion zu einer schnellen Durchseuchung des Gesamtbestandes im Produktionsbetrieb, so dass nur die radikale Keulung des Gesamtbestandes eine zuverlässige Lösung für den Betrieb darstellt. Eine Behandlung von bereits erfolgten Infektionen ist aus Kosten- und

Zeitgründen wirtschaftlich nicht rentabel und wird daher nicht durchgeführt. Eine Präventionsmethode liegt neben der Vakzinierung von Jungtieren in der Gabe sogenannter Breitbandantibiotika gegen bakterielle Erreger. Diese Kombination von Antibiotika, soll eine Infektion für eine Vielzahl der bekannten Pathogene weitestgehend verhindern. Diese Methode hat allerdings verschiedene Nachteile. Nicht nur, dass hohe Kosten durch die regelmäßige Antibiotikagabe anfallen, auch die Qualität der Geflügelprodukte leidet unter ggf. im Fleisch verbleibenden Antibiotikarückständen. Ferner ist durch die kontinuierliche Gabe der Antibiotika die Gefahr gegeben, dass es zur Bildung von Antibiotikaresistenzen bei den Pathogenen kommt. Durch die Senkung des Wirkungsgrades kann nur eine höhere Dosierung der Antibiotika eine erneute Abwehrwirkung erzielen. Im schlimmsten Falle versagt das Antibiotikum komplett. Betrachtet man den harten Preiskampf in der Geflügelindustrie, wo ein Tier nur einen „Wert“ von wenigen Cent im Verkauf hat, so wird offensichtlich, dass eine Behandlung mit größeren Mengen Antibiotika auch wirtschaftlich nicht rentabel ist. Abhilfe kann hier eine kontinuierliche Überwachung und eine schnelle zuversichtliche Diagnostik schaffen, die Wirksamkeit der Antibiotika und Impfstoffe überwacht

Es ist daher wünschenswert, einen schnellen spezifischen Test zu haben, der hilft, mögliche Infektionen mit Pathogenen zu erkennen und das Erregerspektrum diagnostisch einzugrenzen. Die nachfolgende Tabelle faßt die Eigenschaften der in dieser Arbeit berücksichtigten Erreger zusammen. Die Tabelle wurde auf der Informationsgrundlage des Merck Veterinary Manuals 9th Edition erstellt [53].

Tabelle 1 Allgemeine Übersicht der für den PoultryChip ausgewählten Pathogene

Erreger	Pathogen-Typ	DNA/RNA	Bedeutung und Pathologie	Human-pathogen
Salmonella typhimurium	Enterobacteriaceae Gram-negativ	dsDNA	Gastroenteritis beim Menschen und Säugetieren	Ja
Campylobacter jejuni	Campylobacteraceae Gram-negativ	dsDNA	schwere Diarrhoe	Ja
Listeria monocytogenes	Listeriaceae Gram-positiv	dsDNA	Diarrhoe; in schweren Fällen Hirnhautentzündung Bei Schwangeren Fehlgeburten	Ja
Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)	Birnaviridae	dsRNA	Hämorrhagische Entzündung der Bursa fabricii Durchfall, schwere Darmentzündungen, Ödembildung u Gelbfärbung der Bursa fabricii	Nein Nur Hühner, Truthahn u. evtl Enten
Newcastle Disease Virus (NDV)	Paramyxoviridae	ssRNA	<u>Beim Menschen:</u> In Einzelfällen Bindehautentzündung bei Aufnahme über Trockenei, Fleischverzehr oder Eier möglich <u>Bei Geflügel:</u> Verminderte Legeleistung, Eier dünnchalig oder ohne Schale, hohes Fieber (bis >40°C), Diarrhoe, Apathie, Atemlosigkeit	In Ausnahmen möglich Sonst nur Hühner u. Truthahn u. selten Tauben, Gänse, Enten, u.a.
Avian Infectious Bronchitis Virus (AIV)	Coronaviridae	ssRNA	Infiziert obere Atemwege, aber auch Urogenital-Trakt Verminderte Legeleistung, mindere Eierqualität Hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate Hoch infektiös (komplette Durchseuchung der Bestände in 1-2 Tagen)	Nein Nur Hühner
Mareks Disease Virus (MDV)	Herpesviridae	dsDNA	Weltweite Verbreitung; sehr hohe Durchseuchung Tiere zeigen Depressionen vor ihrem Tod, verminderte Legeleistung, Vögel können über einen Zeitraum mehrerer Tage Lähmung der Extremitäten Erreger ist nach Erstinfektion meist latent infektiös und tritt bei	Nein Nur Hühner u Wachteln, Truthahn experimentell infizierbar

			Immuninsuffizienz in eine Proliferationsphase ein, in der er das lymphatische System angreift	
Chicken Anemia Virus (CAV)	Circoviridae	ssDNA	Weltweite Verbreitung, Verursacht Anämie, Knochenmarks-Atrophie und massive Immunsuppression (Folgeinfektion mit weiteren Erregern sehr hoch)	Nein Nur Hühner, vor allem Jungtiere
Avian Reovirus (Reo)	Reoviridae	dsRNA	Weltweite Verbreitung, virale Arthritis und verminderte Absorption der Darmschleimhäute, sowie neurologische Symptome (pale bird syndrome)	Kommt in verschiedenen Säugern und Vögeln vor

2.2.1.1 Nachweis von Lebensmittelpathogenen nach Vorschriften des Lebensmittel- und Futtermittelrechts (LFGB§64 ehemals LMBG §35)

Die bakteriellen Pathogene der Familien *Campylobacteraceae*, *Listeriaceae* und *Enterobacteriaceae*, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in erster Linie über den Verzehr von Lebensmitteln, vorzugsweise von Geflügelfleisch, für den Menschen infektiös. Die Analyse solcher Pathogene erfolgt üblicherweise anhand von Stichproben, die mit mikro- und molekularbiologischen Nachweisverfahren auf Erreger überprüft werden. Die mikrobiologischen Verfahren nutzen Kultivierungsverfahren in speziellen Nährmedien in Kombination mit Plattierungsverfahren, um die Lebendkeimzahl eines Pathogens in einer Lebensmittelprobe zu bestimmen. Beim molekularbiologischen Nachweis nutzt man den sequenzspezifischen Nachweis über die PCR. Dazu wird nach Vorschrift des Bundesgesundheitsamtes mit nach §35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) zertifizierten Nachweismethoden gearbeitet. Seit dem 7.9.2005 wurde die amtliche Sammlung von Methoden zur Probennahme und Untersuchung von Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen (LMBG§35) durch den §64 Abs.1 ersetzt und durch den §64 Abs.2 im Bereich Futtermittel erweitert. Nur die hier festgelegten Verfahren sind für eine Analyse von Pathogenen in Lebensmitteln zulässig. Neue Verfahren müssen zunächst in Ringversuchen zertifiziert werden und nachweislich eine Verbesserung der bisherigen Methoden darstellen.

Der molekularbiologische Nachweis von Salmonellen mit Hilfe der PCR ist bspw. im Juli 2000 ins §64 LFGB übernommen worden (DIN-Methode 10135:1999). Danach müssen 25g eines zu untersuchenden Lebensmittels in einer passenden Voranreicherung in Nährmedium eingesetzt werden. Diese Voranreicherung dauert zwischen 18 und 24 Stunden. Danach

wird 1ml der Voranreicherungskultur für die DNA-Extraktion eingesetzt. Es folgt ein spezifischer PCR-Nachweis. Werden positive Ergebnisse gefunden, folgt ein Southern-Blot mit anschließender Sondenhybridisierung. Die Detektion erfolgt über Chemilumineszenz oder enzymatische Farbumschlagsreaktion. Die Feststellung der Lebendkeimzahl wird durch Plattierungsverfahren auf Nährböden oder in selektiven Nährmedien erreicht. Der Zeitaufwand für einen Pathogennachweis nach den vorgeschlagenen Referenzmethoden kann so von Probeneingang bis zum Endergebnis bei 3-5 Tagen liegen. Auch der parallele Nachweis mehrerer Pathogene aus einer Probe ist mit den PCR Verfahren zwar möglich, allerdings gelten auch hier die bereits in der Einleitung beschriebenen Einschränkungen bei der Multiplex-PCR und Multiplex-Realtime-PCR.

Ein Diagnostik-Microarray stellt demnach eine verheißungsvolle Möglichkeit dar, um die bestehenden Nachweisverfahren des LFGB §64 zu ergänzen und einen schnellen Hinweis auf mögliche Kontaminationen zu geben. Mit Hilfe eines geeigneten Diagnostikchips kann die Analysezeit nach der Voranreicherung bis zum finalen Ergebnis von mehreren Tagen auf wenige Stunden reduziert werden. Damit können mit Hilfe des Diagnostikchips schnell Entscheidungen getroffen werden, ob bestimmte Produkte eines Betriebes pathogene Kontaminationen beinhalten und deren Produktion gestoppt bzw. diese Produkte aus dem Handel genommen werden sollten. Dies würde einen entscheidenden Qualitätszuwachs für die Endverbraucher entsprechender Produkte bedeuten. Mit den herkömmlichen Verfahren kann anschließend der Nachweis bezüglich der Keimzahlen geführt werden, um die Ergebnisse weiter zu vertiefen.

2.2.2 Microarray für die Lebensmittelanalytik – Der AllergenChip

Die zweite Entwicklung eines analytischen Microarrays wurde für die Anwendung in der Lebensmittelkontrolle durchgeführt. Bei diesem Ansatz wird nicht das allergen wirkende Protein, sondern ein spezifischer Teil der DNA-Sequenz der potentiell Allergie-auslösenden Spezies nachgewiesen. Die nachzuweisende Spezies ist dabei als Lebensmittelinhaltsstoff ein Teil der untersuchten Lebensmittelmatrix. Der entwickelte Microarray soll durch die Auswahl geeigneter DNA-Sonden in der Lage sein, die 10 wichtigsten Lebensmittelallergene zu identifizieren. Der Chip dient dabei nicht der Überprüfung von Patienten auf allergische Reaktionen, sondern ist vielmehr dazu konzipiert, bei der Lebensmittelproduktion bzw. in der Qualitätskontrolle als unterstützendes Werkzeug zum Nachweis allergener Verunreinigungen eingesetzt zu werden.

2.2.2.1 Die Lebensmittelallergie

Lebensmittelallergien sind Überempfindlichkeitsreaktionen gegen an sich harmlose Lebensmittel oder einzelne Bestandteile daraus. Ursache dafür ist die fehlerhafte körpereigene Immunantwort gegen bestimmte (Glyko-)Proteine des jeweiligen Lebensmittels. Die am häufigsten auftretenden Immunantworten sind im Falle der Lebensmittelallergie durch das Immunglobulin E (IgE) bedingt. Bereits geringste Mengen (mg/kg bzw. parts per million; ppm) können bei entsprechend sensibilisierten Personen von leichten Reaktionen bis zum anaphylaktischen Schock alle Symptome auslösen. Reaktionen, die keine Immunantwort bedingen, aber trotzdem Symptome bei betroffenen Personen auslösen, sind sogenannte Lebensmittelintoleranzen. Diese werden in drei unterschiedliche Arten unterteilt, die enzymatischen, die pharmakologischen und die noch unbekannteren Intoleranzen. Zu den enzymatischen Intoleranzen gehört bspw. die Lactoseintoleranz, die bei entsprechenden Personen z.B. nach Milchgenuß Magenkrämpfe und Durchfälle hervorrufen kann. Pharmakologische Intoleranzen treten nach übermäßigem Genuß von Lebensmitteln wie z.B. von Schokolade, Tomaten oder auch Erdbeeren auf, die einen hohen Anteil an pharmakologisch aktiven Substanzen (z.B. gefäß- oder psychoaktive biogene Amine oder Histaminliberatoren) aufweisen [54]. Der größte Anteil der Lebensmittelintoleranzen beruht allerdings auf noch unbekanntenen Mechanismen, die durch Lebensmittelzusatzstoffe ausgelöst werden.

In unterschiedlichen Studien wurde die Prävalenz für Lebensmittelallergien in unterschiedlichen Populationen untersucht. Anhand der Studien wurde belegt, dass die Prävalenz im Bereich von Säuglingen und Kindern bei ca. 5-8% liegt, bei Erwachsenen liegt bei durchschnittlich 1-2% der Bevölkerung eine Lebensmittelallergie vor. Meist sind sich die Betroffenen ihrer Allergie bewußt, erleiden aber trotzdem allergische Reaktionen, da die Allergieauslöser häufig nicht erkennbar sind oder nicht ausreichend gekennzeichnet wurden [55-59]. Dies ist auch als „Problematik der versteckten Allergene“ bekannt. Versteckte Allergene können überall auftauchen, in Restaurants, Kantinen, beim gemeinsamen Essen im Bekanntenkreis, etc., aber auch schon während der Produktion der Lebensmittel kann es zu Verunreinigungen mit Spuren potentiell allergener Lebensmittelinhaltsstoffe kommen. Durch die Produktion von unterschiedlichen Lebensmittelprodukten auf der gleichen Produktionsstraße kann es bei ungenügender Reinigung zwischen den Produktionswechsellinien zu einer Verschleppung kommen. Solche Inhaltsstoffe sind meist nur in geringen Mengen vorhanden, können aber unter Umständen bei sensibilisierten Personen starke allergische Reaktionen hervorrufen [60-68]. Abhilfe können hier getrennte Produktionslinien und strikte Überprüfungsmaßnahmen während des Herstellungsprozesses sowie sorgfältige Reinigung der Produktionsanlagen schaffen. Die Überprüfung der einzelnen Prozessschritte innerhalb

der Produktion müssen durch entsprechende HACCP-Konzepte (Hazard Analysis and Critical Control Points) festgelegt werden, um eine bestmögliche Allergenfreiheit von Lebensmittelprodukten zu gewährleisten.

2.2.2.2 Sicherheitsmaßnahmen

Die Kennzeichnungspflicht und eine damit verbundene Steigerung der Verbrauchersicherheit ist eminent wichtig. Eine Einführung von Schwellenwerten für die Pflichtkennzeichnung von Allergenen wäre hierfür wünschenswert. Damit müssten allerdings Verfahren zur Quantifizierung der allergenen Inhaltsstoffe in einem zusammengesetzten Lebensmittel und auch geeignete Referenzmaterialien verfügbar sein. Bisher sind solche Methoden in vielen Fällen noch nicht ausreichend genau. Es besteht weiterhin Bedarf an Entwicklungsarbeit. Ferner sind bisher wenige belastbare Daten zu Schwellenwerten bzw. den Minimaldosen, die bei Betroffenen noch allergische Reaktionen auslösen können, bekannt [56, 62, 69-73]. Dies ist damit zu begründen, dass solche Studien sehr aufwendig sind. Zur Diagnostik einer Nahrungsmittelallergie gehört neben den *in vivo*- (Hauttest) und *in vitro*-Tests (IgE-Antikörperbestimmung) auch die Eliminationsdiät mit anschließender doppelblinder Plazebo-kontrollierter Nahrungsmittelprovokation (DBPCFC) zur Überprüfung der klinischen Relevanz [59, 71, 72, 74, 75]. Bisher geht man davon aus, dass bereits geringste Mengen im µg bis mg-Bereich allergische Reaktionen hervorrufen können. Demnach müsste für eine absolute Sicherheit von einer "Nullgrenze" ausgegangen werden, was allerdings analytisch und auch in der Lebensmittelproduktion derzeit nicht umsetzbar ist. Daher wird der Schwellenwert zurzeit durch die Sensitivität der aktuell verfügbaren Methoden der Allergenanalytik festgelegt. Dieser liegt in etwa im Bereich von < 10ppm (parts per million).

Trotz der fehlenden bzw. unzureichenden Kenntnis über nötige Schwellenwerte wurden 2003 und nachfolgend 2005 EG-Richtlinien zur Kennzeichnung von Lebensmittelinhaltsstoffen verabschiedet. Für potentiell allergene Inhaltsstoffe ist vor allem der Anhang IIIa der am 25.11.2005 in Kraft getretenen Richtlinie 2003/89/EG von Interesse. In dieser Richtlinie wurde folgendes festgelegt:

„...bei der Herstellung eines Lebensmittels verwendete Zutaten, die in Anhang IIIa aufgeführt sind oder die aus einer Zutat nach Anhang IIIa gewonnen wurden, und die – wenn auch möglicherweise in veränderter Form – im Enderzeugnis vorhanden bleiben, mit einem deutlichen Hinweis auf die Bezeichnung der Zutaten auf dem Etikett angegeben.“

Die in Anhang IIIa aufgeführten zu kennzeichnenden Lebensmittelzutaten sind:

1. Glutenhaltiges Getreide (Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut)
2. Krebstiere
3. Eier
4. Fisch
5. Erdnüsse
6. Soja
7. Milch (einschließlich Laktose)
8. Schalenfrüchte, d. h. Mandel, Haselnuss, Walnuss, Cashewnuss, Pecannuss, Paranuss, Macademanuss
9. Sellerie
10. Senf
11. Sesamsamen
12. Schwefeldioxid und Sulfite (bei mehr als 10 mg/kg od. 10 µl/l).

Einige bereits festgelegte Schwellenwert sind für die nachfolgenden Allergene verfügbar:

- Gluten - 200 ppm (Codex Alimentarius)
 - 0 ppm in Kanada
- Sulfit - 10 ppm in der EU
- Erdnuss - 5 ppm in USA (FDA) = Nachweisgrenze.

Seit dem 22.12.2006 ist die Liste der kennzeichnungspflichtigen potentiellen Allergene um zwei erweitert worden, Lupine (Wolfsbohne) und Weichtiere (Mollusken), sowie Erzeugnisse daraus.

Nach Einschätzung der AG Nahrungsmittelallergie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) wird die Mehrzahl der Allergiker vor schweren Reaktionen geschützt, wenn die Menge von 1-10 mg Protein aus allergenem Lebensmittel pro kg (ca. 10ppm) Gesamtlebensmittel unterschritten wird. Daher befürworten Allergologenverbände einen Grenzwert von 0,001% bis 0,01% (allergenes Lebensmittel) bzw. 1mg/kg bis 10mg/kg (Protein des allergenen Lebensmittels) [54, 67, 70-73].

2.2.2.3 Diagnostik von Lebensmittelallergenen

Betrachtet man die analytischen Methoden zum Nachweis von Lebensmittelallergenen in Lebensmittelprodukten, so sind in erster Linie zwei Technologien bestimmend, der Enzymimmunoassay (z.B. Lateral Flow Strips und ELISA) und die Polymerasekettenreaktion (PCR). Im Bereich der immunochemischen Verfahren ist der ELISA-Assay die dominierende Technologie. Mit diesen Verfahren wird das allergene Protein direkt nachgewiesen. Im Bereich der molekularbiologischen Methoden gilt die Realtime-PCR auf Grund ihrer hohen Sensitivität und Sequenzspezifität als Methode der Wahl [66, 76-79]. Dabei ist zu beachten, dass die Spezies-spezifische DNA nur als Marker für potentiell allergen wirkende Lebensmittelinhaltsstoffe dient. Die DNA Amplifikation stellt also nur eine indirekte Methode dar, um die Lebensmittelsicherheit für entsprechend sensibilisierte Individuen zu gewährleisten.

Proteinbasierte Nachweisverfahren-ELISA:

Die ELISA-Verfahren zeichnen sich zum einen durch ihre einfache Handhabung und zum anderen durch ihr Automatisierungspotential aus. Diese Vorteile haben dazu geführt, dass sich der ELISA im Bereich der proteinbasierten Verfahren durchgesetzt hat. ELISA-Tests sind mittlerweile für nahezu alle wichtigen allergenen Lebensmittelinhaltsstoffe kommerziell erhältlich. Mit dem ELISA werden die für eine allergische Reaktion verantwortlichen Epitope (IgG-reaktive Strukturen) erkannt. Kleinere Peptide, die nur ein Epitop tragen, werden mit Hilfe kompetitiver ELISAs nachgewiesen. Allerdings müssen für eine allergische Reaktion immer zwei Epitope vorhanden sein. Durch Strukturähnlichkeiten können auch falsch-positive Ergebnisse im ELISA erhalten werden, dies bezeichnet man als Kreuzreaktivität [76]. Eignung und Qualität eines ELISA-Tests müssen über entsprechende Validierungsverfahren bzw. Ringversuche verifiziert werden. Dabei werden die Testverfahren auf mögliche Kreuzreaktivitäten und auf ihre Eignung zum Nachweis in unterschiedlichen repräsentativen Lebensmittelmatrizes getestet. Gerade Lebensmittelmatrizes mit hohem Protein und/oder Fettgehalt haben oft einen negativen Einfluss auf die Nachweisbarkeit der Zielproteine.

ELISA-Verfahren wurden für Gliadin bzw. Gluten, Shrimps und andere Krebstieren, Hühnereiovalbumin, Milchproteine, Mandel, Paranuss, Haselnuss, Walnuss und Erdnuss mit Nachweisgrenzen von teilweise weniger als 1mg Protein je kg Produkt (<1ppm) entwickelt [77, 80, 81]. Allerdings sind nicht alle der oben genannten Tests auch vollständig validiert. Daten aus Vergleichsuntersuchungen und unabhängigen Ringversuchen zur Evaluierung der verfügbaren Verfahren sind bis dato kaum oder gar nicht verfügbar. Weitere ELISA-Tests,

insbesondere zum Nachweis von Soja, Senf, Sesam und Baumnüssen (Schalenfrüchten) müssen erst noch entwickelt werden [76].

DNA-basierte Nachweisverfahren – PCR:

Bei der PCR wird ein Nachweis der allergen wirkenden Spezies auf Grundlage der Nukleinsäuresequenzspezifität geführt. Der erste Schritt bei der Suche nach potentiell Allergie-auslösenden Spezies (Inhaltsstoffen) in Lebensmitteln ist die Extraktion der DNA aus der zu untersuchenden Lebensmittelmatrix. Dabei ist auf eine geeignete Extraktionsmethode zu achten, da bei der Lebensmittelprozessierung die DNA z.T. degradiert werden kann und nur noch kleine DNA-Fragmente für den Nachweis vorliegen [65, 78, 82-84]. Auf Grund der möglichen DNA-Degradation sollte bei dem Design der PCR darauf geachtet werden, dass die Primer spezifische Produkte mit einer Größe zwischen 50 und 250bp generieren [78, 79, 85]. Dies ist nötig, um auch kleine DNA-Fragmente in stark prozessierten Lebensmitteln über die PCR nachweisen zu können. Übliche Nachweismethoden beinhalten den Aufschluß mit Hilfe chaotroper Reagenzien wie Guanidinhydrochlorid (GuaCl) oder mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) und die anschließende Extraktion über Silika-Filter [79, 86]. Hier stellen Fette, Zucker, Proteine mögliche Inhibitoren für die PCR dar bzw. erschweren die Aufreinigung der DNA aus der Lebensmittelmatrix.

Für die Analytik von lebensmittelallergenen Inhaltsstoffen auf DNA-Basis werden vor allem die Realtime-PCR (s. 3.2.8) und sogenannte PCR-ELISAs verwendet. Letztere verwenden sequenzspezifische Sonden, die gegen das Amplifikat hybridisiert werden. Die Sonden besitzen eine Markierung, mit der im Anschluss eine ELISA ähnlich Detektion durchgeführt werden kann [87].

Ein Problem in der PCR-Analytik stellt bisher allerdings noch das Fehlen geeigneter Referenzmaterialien dar. Dieses Problem wird derzeit durch ein Joint Research Center der Europäischen Kommission (Institute for Reference Materials and Measurements)¹ bearbeitet. Die Herstellung weiterer Materialien ist für eine umfassende Validierung zumindest der wichtigsten Nachweissysteme unabdingbar [76]. PCR-Verfahren sind derzeit für nahezu alle relevanten Allergene verfügbar. Zu diesen zählen der Nachweis von Haselnuss und Erdnuss [78, 87-89], von Soja [90] sowie kommerzielle PCR-Tests für Erdnuss, Mandel, Haselnuss, Soja, Weizen, Hühnerei, Kuhmilch, Fisch, Sellerie und Sesam (Congen Biotechnologie GmbH, Berlin). Allerdings sind auch im Bereich der DNA-basierten Allergenanalytik bisher nur wenig validierte Ringversuche durchgeführt worden.

¹ FP7 33004⁹ FoodSQ – Food Safety and quality control (and Community Reference Laboratories for mycotoxins and PAH)

ELISA vs. PCR:

Wie bereits erwähnt weist die PCR nicht das allergene Protein, sondern einen spezifischen Teil der DNA-Sequenz der potentiell allergenen Spezies nach. Daher ist eine positive Korrelation zu dem Nachweis der Proteine wichtig. Verschiedene Publikationen [78, 87, 89-92] haben Vergleichsstudien beschrieben, die die Ergebnisse von PCR- und ELISA-Analytik zum Nachweis von allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen untersucht haben. Die Ergebnisse zeigten, dass für verschiedene Allergene die Ergebnisse zwischen beiden Methoden weitgehend korrelierten. Je nach Lebensmittelmatrix konnte entweder der ELISA oder die PCR eine bessere Sensitivität aufweisen. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass weder ELISA noch PCR vollständig in allen Matrices einsetzbar sind. So können mit dem ELISA insbesondere Schwierigkeiten bei nah verwandten Spezies wie verschiedenen Schalenfrüchten auftreten. Ebenso sind bisher kaum ELISA-Verfahren für die Detektion von Soja beschrieben [90]. In diesen Fällen kann die PCR über den sequenzspezifischen Nachweis bessere Ergebnisse liefern als ein ELISA. Jedoch gibt es auch Lebensmittelmatrices wie Kuhmilch oder Hühnerei, die einen eindeutigen Nachweis mit Hilfe von PCR-Verfahren erschweren. Grund hierfür ist die hohe Anfälligkeit gegenüber falsch-positiven Ergebnissen, die durch die Detektion von Rinder- respektive Hühner-DNA resultieren kann [76]. Ein großer Vorteil der DNA-Analytik liegt bei dem Nachweis allergener Lebensmittelinhaltsstoffe, die einer starken Prozessierung unterliegen (z.B. Röstung von Haselnüssen, oder verschiedensten Verarbeitungen von Soja). Hier haben ELISA-Verfahren häufig Probleme mit der korrekten Erkennung der allergenen Proteine, da beispielsweise hohe Temperaturen zu einer Veränderung der Quartärstruktur führen können und damit das Protein im ELISA nicht mehr korrekt detektiert werden kann [65, 82-84, 93].

Ein kurzer Vergleich zwischen ELISA und PCR Analytik ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Vergleich protein-basierte und DNA-basierte Lebensmittelallergen-Analytik

	Protein-basierte Analytik ELISA	DNA-basierte Analytik PCR
Zielmolekül	Hauptallergen, mehrere potentiell allergene Proteine, Gesamtproteinextrakt des Lebensmittels (oder der Spezies), selten gegen das allergene Epitop	DNA-Sequenz, Allergen- oder Spezies-spezifisch
Spezifität	Kreuzreaktionen möglich	sehr spezifisch
Nachweisgrenze	'low ppm', matrixabhängig	theoretisch 5 bis 10 Kopien, matrix-abhängig, 'low ppm', LM spezifisch
Quantifizierung	'semiquantitativ'	quantitative Analytik für Spezies Nachweis möglich
Matrixeffekt	Extraktionsprotokoll muß genau eingehalten werden	PCR-Inhibitoren müssen entfernt werden
Variabilität Zielmolekül	Phänotyp ggf. abhängig von klimatischen, saisonalen oder lokalen Einflüssen (Proteingehalt)	Genotyp ist sehr stabil
Auswirkungen der Prozessierung <ul style="list-style-type: none"> • Temperatur • pH • Druck • Fermentation 	denaturiertes oder enzymatisch verändertes Protein wird u.U. durch die Antikörper nicht erkannt	DNA ist relativ stabil gegenüber Temperaturen < 120°C

Insgesamt lässt sich feststellen, dass es nicht nur „die eine“ Nachweismethode innerhalb der Lebensmittelallergen-Analytik gibt. Sowohl PCR als auch ELISA stellen sehr gute Möglichkeiten für die Allergenanalytik dar, aber nur ein komplementärer Einsatz beider Methoden kann zum jetzigen Zeitpunkt eine komplette Abdeckung aller relevanten potentiell allergenen Inhaltsstoffe gewährleisten.

Alternative Methoden:

Ein Nachteil der bisher beschriebenen Methoden ist die nur eingeschränkte Multiplexfähigkeit. Bisher wurde eine hohe Parallelität meist durch den Einsatz von Mikrotiterplatten, vorzugsweise im 96 well Format, erzielt. Häufig wird dies auch als Multiplex-Analyse oder als PCR-Array (ein Well = ein Spot) bezeichnet. Letzten Endes findet bei diesen Methoden in der Regel aber nur der Nachweis für einen Analyten pro Well statt. Demnach handelt es sich nicht um ein Multiplexing im eigentlichen Sinne.

Eine weitere Miniaturisierung und Verbesserung der Multiplexfähigkeit kann durch die Verwendung von Microarrays erzielt werden. Ein entsprechendes Nachweissystem wurde in der vorliegenden Arbeit entwickelt. Neben der Entwicklung einer geeigneten Multiplex-PCR und einem spezifischen und sensitiven DNA-Microarray sollte die Entwicklung weiter integriert werden, indem die Amplifikation möglichst auf dem Chip selbst durchgeführt wird. Die Grundzüge der OnChip-PCR werden im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

2.3 OnChip-PCR für die Multiparameteranalyse

Der Bedarf an Methoden, die eine simultane Detektion von verschiedenen Zielgenen ermöglichen, steigt stetig. Microarrays stellen hierfür eine ideale Plattform für verschiedene analytische Fragestellungen auf Grund ihres Miniaturisierungs- und Parallelisierungspotentials dar. Allerdings ist die generelle Sensitivität von Microarrays relativ gering. Deshalb wird für die Detektion von geringen DNA-Konzentrationen eine Methode zur Voranreicherung bzw. Amplifikation der gesuchten DNA Zielsequenz benötigt. Dies erfolgt üblicherweise mit Hilfe der PCR, die von einem DNA-Molekül theoretisch 2^n Kopien erstellen kann, wobei n mit der Anzahl der verwendeten PCR-Zyklen gleichzusetzen ist. Die große Sensitivität und Spezifität, die mit der PCR erzielt werden kann, macht sie daher in Kombination mit der Microarray-Technologie zu einem idealen Werkzeug für die Multiparameteranalyse.

Erste Vorläufer der OnChip-PCR waren Sequenzier- und SNP-Analysen, in denen mit Hilfe von Enzymen Primerextensionsreaktionen durchgeführt wurden [94, 95]. Erdogan et al. beschrieben einen Ansatz, indem sie allel-spezifische Oligonukleotid-Primer auf einem Glasobjektträger immobilisierten und einzelsträngige PCR-Produkte gegen die Sonden hybridisierten. Die Sonden für Wildtyp und Mutation (match und mismatch) unterschieden sich durch eine variable am 3'-Ende befindliche Base. Es folgte eine allel-spezifische Elongation an den hybridisierten einzelsträngigen PCR-Produkten in Gegenwart aller vier dNTPs, wobei eines mit Cy3-Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Eine Elongation und Markierung mit Cy3 erfolgte nur im Falle eines „perfect match“. Für die Versuche wurde humane mitochondriale DNA als Ausgangsmaterial für die Analysen verwendet. Die maximale Länge der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Produkte lag bei 5,7kb. Erdogan et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, dass eine Primerextension darüber hinaus nicht möglich ist [96]. Eine nachfolgende Arbeit durch von Nickisch-Roseneck et. al konnte allerdings erfolgreich die OnChip-Elongation bis zu einer Länge von 16,5kb zeigen [97].

Die OnChip-PCR oder auch Festphasen-PCR (Solid phase-PCR) ist die Weiterentwicklung der Primerextensionsreaktionen. Sie kombiniert die Sensitivität der PCR mit den multiparametrischen Vorteilen von Microarrays. Häufig wird die OnChip-PCR oder Chip-PCR in der Literatur in Verbindung mit Lab-on-Chip-Systemen oder μ TAS (mikro-

Totalanalyseysteme) genannt. Man muss hier allerdings beachten, dass in diesen Systemen die PCR in einem mikrofluidischen, strukturierten Mikrokanalchip im Durchfluss durchgeführt wird. Die OnChip-PCR, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, synthetisiert hingegen das finale Amplikon an immobilisierten Primern.

Die erste PCR, die an der Oberfläche von Microarrays durchgeführt wurde, stammte von Adessi et al. [98]. Bei diesem Ansatz schlugen die Autoren vor, dass sowohl Vorwärts-, als auch Rückwärts-Primer an der Oberfläche eines Glassubstrates immobilisiert werden. Die Immobilisierung erfolgte kovalent am 5'-Ende des jeweiligen Primers. Die Autoren haben in ihrer Arbeit verschiedene Immobilisierungsmethoden im Kontext zur OnChip-PCR untersucht. Generell konnten sie feststellen, dass kovalente Immobilisierungsmethoden den wiederholten Denaturierungsschritten bei Temperaturen um 95°C während der PCR am besten Stand hielten. Zwei sehr robuste Immobilisierungsverfahren waren die kovalente Kopplung von 5'-Thiol-modifizierten Primern mit heterobifunktionalen Crosslinkern (*m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysulfo-succinimide-ester) auf aminosilanisierten Glasoberflächen sowie die EDC-Kopplung.

Durch die Immobilisierung beider Primer am 5'-Ende stehen die freien 3'-Enden für den Beginn der DNA-Amplifikation bereit. Da keine freien Primer in der Lösung vorliegen, kommt es, ähnlich der Primerextensionsreaktion, zu einer DNA-Synthese an den immobilisierten Primern. Durch die örtliche Nähe der immobilisierten Vorwärts- und Rückwärtsprimer findet eine Brückenbildung durch die Hybridisierung der Einzelstränge mit dem jeweiligen komplementären Primer statt und die Polymerase kann den Komplementärstrang erneut synthetisieren. Diese Art der OnChip-Amplifikation ist daher auch als „Bridge amplification“ bekannt.

Im Gegensatz zu der „Bridge amplification“ wurden in verschiedenen Publikationen eine erfolgreiche Amplifikationen auf der Chipoberfläche beschrieben, wo ein Primer immobilisiert wurde und der Gegenprimer frei in Lösung vorlag [99, 100]. Diese Methode wurde erfolgreich für den Nachweis von SNPs [99, 100], verschiedener bakterieller Pathogene [101] und die reverse Transkription von mRNA aus 5pg Total-RNA [102] eingesetzt.

Eine weitere Verbesserung der Amplifikationseffizienz bei der OnChip-PCR wurde in Arbeiten beschrieben, wo der bereits immobilisierte Primer in einer geringen Konzentration zusätzlich zu dem Gegenprimer in dem PCR-Mix eingesetzt wurde [100, 103-107]. Neben der Immobilisierung an planaren Trägersubstraten, wie z.B. Glas- oder Polymersubstrate, wurde die OnChip-PCR auch erfolgreich in Hydrogelpads auf einem Glassubstrat beschrieben [107-109].

Die OnChip-PCR erfordert eine Anpassung an die Besonderheiten des Chipformates. Dazu müssen spezielle Thermocycler verwendet werden, die vergleichbare Heiz- und Kühlzyklen mit den verwendeten Substraten, erzielen, damit die OnChip-PCR erfolgreich durchgeführt werden kann. Da die Temperaturleitfähigkeit von Glasobjektträgern nicht sehr gut ist, kommt es zu zeitlichen Verzögerungen, bis die benötigte Temperatur an der Oberfläche des Glaschips erreicht wird. Eine Anpassung des Thermocyclings ist dabei unbedingt bei der Entwicklung von OnChip-PCR Verfahren zu beachten.

Auch bei dem Primerdesign für die OnChip-PCR ist neben den üblichen Kriterien wie Schmelztemperatur (T_m) und G/C-Gehalt auf folgende Punkte zu achten:

1. Die Primer müssen in einer ausreichend hohen Dichte immobilisiert sein, damit eine Detektion der resultierenden Amplifikate gewährleistet ist.
2. Die Kopplung der Primer an die Substratoberfläche muss stabil genug sein, um den hohen Temperaturen zu widerstehen, die während der Denaturierungsschritte der PCR auftreten.
3. Für die Effizienz der PCR ist es entscheidend, dass eine ausreichend lange Spacersequenz an das 5'-Ende des Primers angefügt wird. Dieser Abstandshalter steigert die Annealingeffizienz und ermöglicht einen besseren Zugang des immobilisierten Primers für die DNA-Polymerase. In der Literatur wird beschrieben, dass eine optimale Spacerlänge mit 10-18 Nukleotiden (z.B. in Form eines polyT-Spacers) oder einem C6-Linker erreicht wird [98, 110].

Die Detektion der OnChip-PCR Amplifikate erfolgt üblicherweise über den Einbau fluoreszenzmarkierter dUTPs oder über die direkte Markierung der freien Primer am 5'-Ende. Im Falle der Arbeiten von Adessi et al. wurden fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die gegen die synthetisierten Einzelstränge hybridisiert wurden. Neben der direkten Markierung ist auch die indirekte Markierung über Interkalatoren wie z.B. SYBRGreen möglich, allerdings wurde diese Methode bisher noch nicht erfolgreich beschrieben, da bei dieser Methode neben hohem Hintergrundsignal auch falsch-positive Signale eine Auswertung der Arrays erschweren können.

2.3.1 Funktionsprinzip der OnChip-PCR mit einem immobilisierten Primer

In dieser Arbeit wurde die OnChip-PCR an einem immobilisierten Primer durchgeführt. Das Funktionsprinzip wird anhand der nachfolgenden Abbildung verdeutlicht (Abb.). Dabei findet über eine gerichtete kovalente Kopplung die Immobilisierung des Rückwärts- oder des Vorwärtsprimers statt. Der jeweilige Gegenprimer wird in Lösung mit dem PCR-Reaktionsmix zugegeben. In verschiedenen Publikationen wurde berichtet, dass der bereits immobilisierte Primer als eine Art „Katalysator“ in geringer Konzentration in der Flüssigphase zugesetzt wurde. Dadurch findet eine Voramplifikation in der Flüssigphase, was zu einer verbesserten Amplifikation an der Festphase führt [100, 103-107].

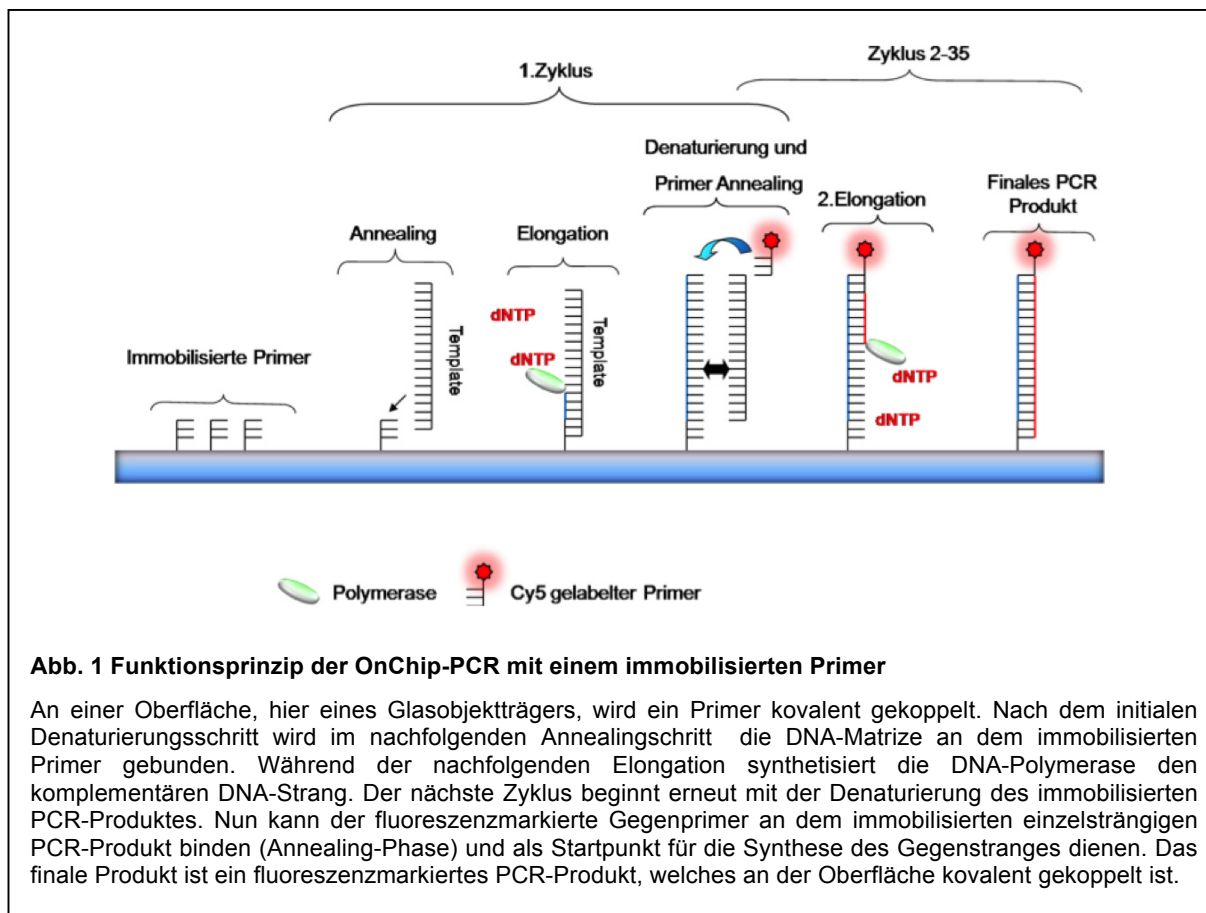


Abb. 1 Funktionsprinzip der OnChip-PCR mit einem immobilisierten Primer

An einer Oberfläche, hier eines Glasobjektträgers, wird ein Primer kovalent gekoppelt. Nach dem initialen Denaturierungsschritt wird im nachfolgenden Annealingschritt die DNA-Matrize an dem immobilisierten Primer gebunden. Während der nachfolgenden Elongation synthetisiert die DNA-Polymerase den komplementären DNA-Strang. Der nächste Zyklus beginnt erneut mit der Denaturierung des immobilisierten PCR-Produktes. Nun kann der fluoreszenzmarkierte Gegenprimer an dem immobilisierten einzelsträngigen PCR-Produkt binden (Annealing-Phase) und als Startpunkt für die Synthese des Gegenstranges dienen. Das finale Produkt ist ein fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt, welches an der Oberfläche kovalent gekoppelt ist.

Der Vorteil der OnChip-PCR gegenüber der herkömmlichen Kombination von separater PCR und nachfolgender Hybridisierung auf einem Microarray liegt sowohl in der Zeit- als auch in der Kostenersparnis. Zeitaufwendige Hybridisierungen sowie Aufreinigung der PCR-Produkte und ggf. nötige ssDNA-Präparierung entfallen. Gleichzeitig ist es möglich, mehrere Parameter parallel zu untersuchen und die Vorteile der Microarray-Technologie mit der Sensitivität der PCR zu kombinieren. Bei der konventionellen Multiplex-PCR besteht das

Problem, dass nach der Amplifikation eine Bestätigung der Syntheseprodukte anhand der Größe oder Sequenz erfolgen muss, bevor die Ergebnisse ausgewertet und interpretiert werden können. Ein weiterer Nachteil ist das sehr arbeitsintensive Primerdesign, welches mit steigender Anzahl der parallel zu detektierender Zielsequenzen sehr komplex werden kann. Neben der Vermeidung von Primer-Primer Interaktionen muß auch die Amplikongröße beachtet werden, um eine spätere Differenzierung gewährleisten zu können. Durch die orts aufgelöste Immobilisierung verschiedener Primer kann eine Multiplex-PCR auf dem Microarray durchgeführt werden, ohne dass die Produktgrößen beim PCR-Design auf einander abgestimmt werden müssen. Die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. Cy5 oder Cy3 ist ausreichend, um die verschiedenen Amplikons auf dem Microarray differenzieren zu können.

Auch bei der Realtime-PCR gibt es Probleme, mehrere Parameter parallel zu detektieren. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt über ein quantifizierbares Fluoreszenzsignal. Um verschiedene Zielsequenzen in der Realtime-PCR parallel nachweisen zu können, werden daher unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe für die Differenzierung benötigt. Bei der Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe muss darauf geachtet werden, dass es keine Interferenzen zwischen den einzelnen Farbstoffen gibt (Crosstalk), da sonst keine einwandfreie Aussage über die Amplifikation getroffen werden kann. Bisher gibt es geräteseitige Einschränkungen bei der parallelen Detektion von mehreren Multiplex-PCR Produkten. Der Realtime-PCR Thermocycler der Fa. Roche (Ligthcycler 480) gilt derzeit als Technologieführer im Bereich der Realtime-Multiplex-PCR. Mit diesem Gerät ist es theoretisch möglich, bis zu sieben verschiedene Parameter in einem Reaktionsansatz auszuwerten. In der Praxis konnte dies bisher noch nicht gezeigt werden. Derzeit sind nur Nachweise mit bis zu vier verschiedenen Parametern realisiert worden. Eine größere Anzahl paralleler Amplifikationen ist auf Grund der technologischen Hürden, wie z.B. Interferenzprobleme (Crosstalk), daher nicht realisiert worden.

Diese Probleme können mit den bereits genannten Vorteilen der OnChip-PCR umgangen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode weiterentwickelt, um neben den Einzelnachweisen auch Multiplexnachweise zu ermöglichen.

2.4 Helicase dependent amplification – HDA

Die Helicase dependent amplification (HDA) ist eine isothermale Amplifikation, die das erste Mal von Kong et al. 2004 beschrieben wurde [111]. Helikasen sind Enzyme, die bei der DNA-Replikation eine entscheidende Rolle spielen. Sie initiieren die Replikation, indem sie die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren eines DNA-Doppelstrangs aufbrechen und so den Doppelstrang entwinden. Insgesamt existieren bisher (Stand Dezember 2008) sechs Publikationen, in denen diese neue Technologie genutzt wurde. Kong *et al.* nutzen in ihren Arbeiten eine thermostabile UvrD-Helikase aus *Thermoanaerobacter tengcongensis*. Diese Tte-UvrD-Helikase zeigte eine zuverlässige Aktivität von 45°C bis 65°C. Als Substrat für die Helikase dienen sowohl DNA-Doppelstränge mit glatten Enden als auch solche mit 3'-oder 5'-Überhängen. Es konnte gezeigt werden, dass in Kombination mit einer mesophilen Bst-Polymerase erfolgreich verschiedene Pathogene wie *Neisseria gonorrhoeae* und Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden können [111-115]. Dazu wurde genomische DNA zusammen mit geeigneten Primern, der Helikase und der Bst-Polymerase bei 65°C für 2h inkubiert. Die Produktanalyse kann entweder mit Hilfe eines Agarosegels oder auch über eine Realtime-Detektion quantitativ (z.B. SYBRGreen) erfolgen. In Kombination mit einer reversen Transkriptase kann die Helicase auch für die RT-PCR eingesetzt werden. Das Funktionsprinzip ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

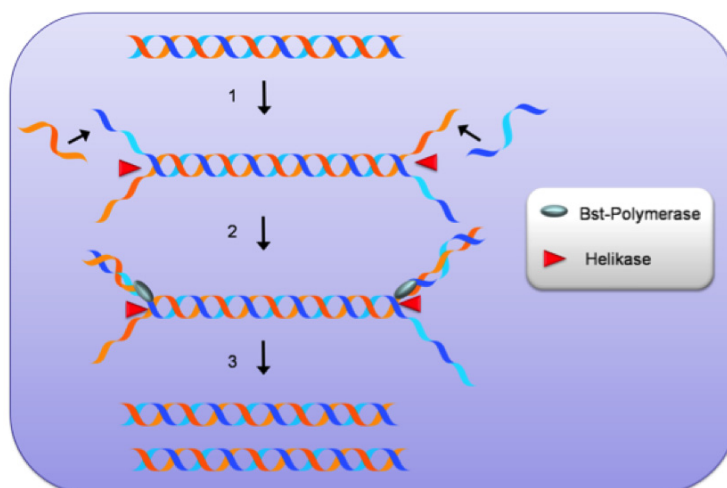


Abb. 2 Schematische Darstellung der HDA

Zu Beginn der Reaktion entwindet die Helikase den DNA-Doppelstrang, indem sie die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren aufbricht. An den entwirren DNA-Einzelsträngen können nun nachfolgend die Primer binden (1). In dem darauf folgenden Schritt (2) findet die DNA-Amplifikation durch die Bst-Polymerase statt, so dass nach abgeschlossener Amplifikation zwei identische Kopien der Ausgangs-DNA vorliegen. (3) Der gesamte Amplifikationsvorgang, sowie die Entwindung der DNA durch die Helikase finden isothermal bei 65°C statt.

Die HDA ist in ihrem Ablauf im Wesentlichen analog zur PCR. Auch bei der HDA kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation. Durch den Einsatz der Helikase kann der Denaturierungsschritt vermieden werden. Dies ermöglicht es, die Amplifikation isothermal durchzuführen. Dadurch wird der Einsatz von Thermocyclern überflüssig und es können kostengünstige Heizelemente verwendet werden, wodurch die HDA vor allem für die Point of Care Diagnostik attraktiv wird [114, 115].

Allerdings arbeitet das System bisher nur unter eingeschränkten Bedingungen. So können derzeit nur Amplifikate bis zu einer Länge von 120bp amplifiziert werden [116]. Das Primerdesign ist ebenfalls sehr aufwendig. Zwar liegen im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Primern die gleichen Voraussetzungen vor, was GC-Gehalt, Annealing- und Schmelztemperaturen betrifft, allerdings kann es sein, dass ein Primersystem trotz Beachtung aller Vorgaben nicht in der HDA funktioniert. Bisher gibt es noch keine näheren Kenntnis darüber, wann ein bestimmtes Primersystem trotz aller erfüllten Parameter funktioniert und wann es versagt (persönliche Kommunikation mit Support-Mitarbeitern der Fa. Biohelix). Derzeit ist noch kein Algorithmus für das Design von HDA-Primern entwickelt worden. Daher ist das empirische Testen verschiedener Primerpaare momentan noch nötig, um ein optimales Primersystem zu finden, das alle o.g. Kriterien erfüllt und im Bereich der Zielsequenz liegen.

In einer kürzlich erschienen Publikation von Motre et al. ist die erfolgreiche Fusionierung von Bst-Polymerase und Tth-UvrD Helikase beschrieben worden [112]. Das Fusionsprotein wird Helimerase genannt. Damit ist es nun möglich, die Effizienz der HDA deutlich zu steigern. Bisherige Restriktionen durch die maximale Amplifikatgröße von 120bp sind dank des neuen Enzyms, behoben. In der Publikation wurden erfolgreiche HDAs bis zu einer maximalen Amplifikatgröße von bis zu 2,3kb beschrieben.

In einer Publikation von Tong et al. vom November 2008 wird eine weitere Anwendung der HDA in Kombination mit TaqMan Sonden beschrieben [117]. Darin wird der erfolgreiche Einsatz der HDA für die Realtime-Detektion von *Vibrio cholerae* und *Bacillus anthracis* gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HDA auf ihre Multiplexfähigkeit getestet. Ein weiteres Ziel war die Etablierung der HDA an immobilisierten Primern in einem Microarray. Beides wurde zum Stand Dezember 2008 noch nicht publiziert. Vorteile einer Festphasen HDA liegen z.B. in der Integrationsmöglichkeit in mikrofluidischen Systemen für die Point of Care Diagnostik, sogenannten Lab on Chip-Systemen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

s. Anhang A

3.2 Methoden

3.2.1 Kopplungsmethoden zur Immobilisation von DNA auf Glasoberflächen

In dieser Arbeit wird mit zwei unterschiedlichen kovalenten Kopplungsansätzen gearbeitet, um DNA auf Glasoberflächen zu immobilisieren.

3.2.1.1 EDC / Methylimidazolmethode

Das N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC) ist ein Carbodiimid. Carbodiimide wurden 1953 von Sheehan und Hess entdeckt und sind äußerst reaktive Verbindungen. Die Aktivierung phosphorylierter Oligonukleotide mit Carbodiimiden wurde bereits 1962 durchgeführt [118]. Der Vorteil von EDC gegenüber anderen Carbodiimiden ist seine Wasserlöslichkeit, so dass die chemische Reaktion im wässrigen Medium nicht durch Unlöslichkeit eingeschränkt wird.

Die verwendeten Sonden bzw. Primer wurden phosphoryliert von der Firma Roth oder Biomers.net bezogen. Um sie auf der Glasoberfläche koppeln zu können, werden sie auf die gewünschte Konzentration mit 30mM 1-Methylimidazol und 25% DMSO verdünnt und durch Zugabe von 5mg/ml EDC aktiviert. Die Lösung wird dann mit einem Spottingroboter in einer Konzentration von 25 μ M auf aminosilanisierte Glassubstrate gespottet.

3.2.1.2 Immobilisierung auf epoxysilanisierten Substraten

Für die kovalente Kopplung werden epoxysilanisierte-Glasslides und Oligonukleotide mit einem am 5'-Ende gekoppelten C6-Aminolinker eingesetzt. Es werden kommerzielle Slides der Marken Schott Nexterion E und Corning Epoxide-coated Slides verwendet, auf denen 15 μ M C6-Aminolinker-modifizierte Primer bzw. Sonden in 1x PBS immobilisiert werden.

3.2.2 Verwendete Spottingverfahren

In dieser Arbeit werden die DNA-Sonden bzw. Primer mit dem SciFlex Arrayer oder dem TopSpot M / Microarray-Spotter auf Glasobjektträger transferiert. Die verwendeten Tropfverfahren sind kontaktfrei.

3.2.2.1 Spotten mit dem SciFlex Arrayer ("InkJet-Technik")

Der SciFlex Arrayer der Firma Scienion arbeitet nach dem "InkJet"-Prinzip. Mit dieser Technologie wird die Probe in Pikoliter -großen Volumina auf die Chipoberfläche „geschossen“. Dabei können bis zu 1000 Tropfen/s getropft werden. Für die Versuche werden die jeweiligen Sonden/Primer in einer Mikrotiterplatte positioniert und nach einem vorher festgelegten Muster (Array) auf der Chipoberfläche bei einer Spannung von 120V und einer Pulsweite von 45µs mit je 3 Tropfen/Spot (Gesamtvolumen von 300pl) aliquotiert. Der Abstand zwischen den einzelnen Spots liegt bei 500µm, der Spotdurchmesser bei 150µm. Pro Array werden die Sonden bzw. Primer in Duplikaten oder Quadruplikaten gespottet.

3.2.2.2 Spotten mit dem TopSpot (TopSpot-Technik)

Das TopSpot-Verfahren ist für die Massenherstellung von Microarrays konzipiert worden. Dabei können mit einem speziellen Druckmodul theoretisch bis zu 5000 Microarrays/Tag bearbeitet werden. Es gibt verschiedene Druckmodule, die in der Anzahl von 24, 96 bis zu 384 parallel tropfbaren Proben variieren. Das in dieser Arbeit verwendete Druckmodul besitzt an seiner Oberfläche 24 kleine 2µl fassende Probenreservoirs, die entsprechend mit den zu immobilisierenden Proben beladen werden. Das Tropfenvolumen liegt hierbei zwischen 500-800pl/Kanal, der Tropfendurchmesser bei 150µm. Der Abstand zwischen den applizierten Tropfen liegt in Abhängigkeit zu den Abständen der Düsenöffnungen des Druckkopfmoduls bei 500µm. Mit einer angeschlossenen CCD-Kamera (charge coupling device) wird die Qualität der getropften Arrays für jeden Chip kontrolliert. Kommt es zu Inhomogenitäten der Tropfen auf der Chipoberfläche, können die betroffenen Substrate aussortiert werden. Die Sonden bzw. Primer für ein Pathogen bzw. Allergen, sowie die Kontrollen, sind in Duplikaten bis Quadruplikaten in einem Array vorhanden.

3.2.3 Blocking

Für aminofunktionalisierte Chips, auf denen DNA mit der EDC-Methode immobilisiert wurde, wird eine von Diehl et al. beschriebene Blocking-Methode eingesetzt [119]. Diese Methode beruht auf einer Alkylierung der freien Aminogruppen auf der Glasoberfläche durch Bernsteinsäureanhydrid. Es kommt dabei zu einer Reaktion der Aminogruppen zu Amidinen und zusätzlich zu einer negativen Oberflächenladung. Die DNA wird so von der Chipoberfläche abgestoßen und kann nicht unspezifisch binden [24].

Für epoxysilanisierte Chips wurde entweder nach Angaben der Chiphersteller die Oberfläche mit Ethanolamin oder alternativ mit gamma-Aminobuttersäure (GABA) geblockt.

3.2.3.1 Blocking nach Diehl et al.

Für Chips mit EDC-Kopplung wurde eine von Diehl et al. beschriebene Methode für das Blocking angewendet [119]. Dazu wurden 0,5g Bernsteinsäureanhydrid in 100ml Dichlorethan für 5min im Ultraschallbad gelöst. Danach wurden 1,25ml Methylimidazol zugegeben. Das Blockingreagenz wurde in eine Färbekammer für acht Objektträger gegeben, die Chips wurden schnell in die Lösung eingetaucht und für 1h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach dem Blocken wurden die Chips zwei Mal in H₂O_{dest.} gewaschen und unter Stickstoff getrocknet.

3.2.3.2 Blocking mit Ethanolamin

Für die Herstellung der Blockinglösung wurden 50mM Ethanolamin und 0.1% SDS mit 100ml 0.1M Tris (pH 9.0) gemischt. Danach werden die epoxysilanisierten Chips in der Blockinglösung für 60min im Dunkeln inkubiert. Nach dem Blocken werden die Chips ein Mal mit H₂O_{dest.} bei RT gespült und anschließend unter Stickstoff getrocknet.

3.2.3.3 Blocking mit gamma-Aminobuttersäure (GABA)

Epoxysilanisierte Chips werden mit 100mM GABA-Lösung in einer QuadriPERM Kulturschale geblockt. Das Blocking wird für 60min bei RT auf dem Wippschüttler im Dunkeln bei 200rpm durchgeführt. Nach dem Blocken werden die Chips in ein H₂O_{dest.} bei RT gespült und anschließend unter Stickstoff getrocknet.

3.2.4 DNA-Isolation aus unterschiedlichen Matrices

3.2.4.1 PoultryChip

Alle für die Arbeit verwendeten DNAs wurden durch die Fa. Congen zur Verfügung gestellt.

3.2.4.2 AllergenChip

Für die Isolation von Proben-DNA aus unterschiedlichen Lebensmittelmatrices wird das SureFood PREP Allergen-Kit der Fa. Congen nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Verwendete Lebensmittelmatrices waren u.a. Fischkonserven, Schokolade, Bratwurst, Salami, Suppen und Backmischungen, etc.. Referenz-DNAs wurden direkt von der Fa. Congen bezogen.

3.2.5 PCR-Verfahren

Im Rahmen der Arbeit wurden neben herkömmlichen Einzel-PCRs auch Multiplex- und Realtime-PCR-Verfahren zur Detektion von Pathogenen bzw. Lebensmittelallergenen entwickelt. Diese Methoden wurden im späteren Verlauf für den Einsatz der OnChip-PCR bzw. Multiplex-OnChip-PCR auf Microarrays weiterentwickelt. Die nachfolgend beschriebenen PCR-Verfahren wurden für die Detektion von Geflügelpathogenen (PoultryChip) oder DNA aus potentiell allergen wirkenden Lebensmitteln (AllergenChip) eingesetzt. Die Primer wurden optimiert, damit sie unter Multiplex-Bedingungen nicht kreuzhybridisieren bzw. falsch-positive Ergebnisse liefern. Das Primerdesign erfolgte *in silico* mit der Software Primer Premier 5 (Premier Biosoft, Palo Alto, USA). Die verwendeten Sequenzen sind in den Tabellen im Anhang (s. Tabelle 8, Tabelle 9 und Tabelle 10) einzusehen. Während der Versuche wurden verschiedene Polymerasen hinsichtlich ihrer Eignung für die Amplifikation in Einzel- und Multiplex-PCR, sowie für die OnChip-PCR getestet. Eine Übersicht der verwendeten Polymerase ist in der nachfolgenden Tabelle gegeben.

Tabelle 3 Verwendete Polymerasen

Polymerase	Hotstart	Synthesetemperatur	Besonderheit
Titanium Taq	Ja	68°C	Sehr hohe Sensitivität; Hohe Prozessivität; Optimierter PCR Puffer mit eingestellter MgCl ₂ Konzentration
FastStart SybrGreen I DNA Master	Ja	72°C	Enthält SybrGreen für den Realtime Nachweis
FastStart SybrGreen DNA Master ^{Plus}	Ja	72°C	Enthält SybrGreen für den Realtime Nachweis; Optimierter PCR Puffer mit eingestellter MgCl ₂ Konzentration
FastStart Multiplex Hyb Probe	Ja	72°C	PCR-Puffer ist speziell für Multiplex PCR optimiert
Biotaq	Ja	72°C	Hohe Prozessivität, Produziert PCR Produkte mit „A“-Überhang am 3'-Ende
Platinum Taq	Ja	72°C	Hohe Prozessivität und Sensitivität
Phusion Taq	Ja	72°C	Besonders hohe Prozessivität; Produziert „Blunt End“ PCR-Produkte

3.2.6 Singleplex-PCR

Für die Amplifikationen wurden unterschiedliche Polymerasen eingesetzt (s. Tabelle 3). Das Titanium Taq Kit der Fa. Takara Bioscience zeigte die besten Ergebnisse, so dass die nachfolgenden Protokolle sich auf die Verwendung dieser Polymerase beziehen. Die Titanium Taq gehört zu den Hotstart-Polymerasen. Diese Polymerasen werden durch einen speziellen Antikörper in ihrer Aktivität blockiert. Dies bewirkt, dass die Polymerase nicht vor Erreichen des ersten Denaturierungsschrittes ggf. unspezifisch gebundene Primer elongiert, d.h. es treten weniger Artefakte in der PCR auf. Die Aktivierung der Polymerase erfolgt in der PCR demnach erst, wenn bei 95°C der blockierende Antikörper denaturiert wird.

Für die Singleplex-PCR werden 1x Titanium Taq Puffer, 3,5mM MgCl₂, 0,4mM dNTPs, 0,4µM PrimerMix (je 0,2µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer), 1U Titanium Taq und 19,3µl H₂O_{DEPC} eingesetzt.

Je nach Anwendung werden DNAs verschiedener Geflügelpathogene oder potentiell allergen wirkender Lebensmittel in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die jeweils verwendeten DNA Ausgangsmengen sind im Ergebnisteil entsprechend aufgeführt.

Die PCR wird auf einem MJResearch PTC-200 Thermocycler durchgeführt. Das Programm besteht aus einem Aktivierungsschritt für 1min bei 95°C und nachfolgend 42 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 30s, einem Annealingschritt bei 60°C (für Geflügelpathogene) bzw. 58°C (Lebensmittelallergene DNA) für 30s und einem Elongationsschritt bei 68°C für 45s. Nach den 42 Zyklen folgt ein finaler Elongationsschritt bei 68°C für 5min.

3.2.7 Multiplex-PCR

Wie bereits für die Singleplex-PCR werden auch die Multiplex-Amplifikationen mit dem Titanium Taq Kit der Fa. Takara Bioscience durchgeführt.

Die eingesetzte Ausgangs-DNA stammte im Falle des PoultryChips von den Geflügelpathogenen *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Chicken Anemia Virus (CAV)*, *Infectious bursal disease Virus (IBD)*, *Newcastle disease Virus (NDV)*, *Mareks disease Virus (MDV)*, *Avian Reovirus* und *Infectious bronchitis Virus (AIV)*. In der Multiplex-PCR wurden bis zu fünf verschiedene Zielsequenzen parallel amplifiziert.

Im Falle des AllergenChips wird die DNA entweder direkt aus verschiedenen Lebensmittelmatrizes oder aus der allergen wirkenden Spezies selbst isoliert und in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die DNA-Nachweise werden gegen die folgenden allergen wirkende Spezies durchgeführt: Haselnuss, Erdnuss, Mandel, Walnuss, Soja, Gluten, Fisch, Sesam, Senf und Sellerie.

Die Annealingtemperatur für die Multiplex-PCR wird bei Bedarf mit Hilfe von Gradienten-PCRs optimiert. Dabei wird über den Heizblock des Thermocyclers ein Temperaturgradient angelegt und mit jeweils identischen PCR-Ansätzen eine PCR durchgeführt. Über die Analyse im Agarosegel kann für jede Annealingtemperatur innerhalb des Temperaturgradienten das jeweilige PCR-Produkt anhand der Bandenintensität im Gel bewertet werden. PCR-Ansätze mit der optimalen Annealingtemperatur zeigen dabei die höchste Bandenintensität.

Generell wird für die Multiplex-PCR 1,5x Titanium Taq Puffer, 6mM MgCl₂, 0,8mM dNTPs, 0,2µM je eingesetztem Primer und 2,5U Titanium Taq in einem Gesamtvolumen von 30µl eingesetzt. Die eingesetzte DNA-Konzentration variiert je nach Fragestellung.

Das Cycling wird in einem PTC200 Thermocycler der Fa. MJResearch durchgeführt. Die verwendeten Parameter beinhalten einen Aktivierungsschritt bei 95°C für 1min, 42 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 45s, einem Annealingschritt bei 58°C (AllergenChip) bzw. 60°C (PoultryChip) für 30s sowie einem Elongationsschritt bei 68°C für 45s. Nach Ablauf der 42 Zyklen erfolgt eine finale Elongation bei 68°C für 5 min.

3.2.8 Lightcycler PCR

Die Realtime-PCR ermöglicht dem Nutzer, im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, die DNA Amplifikation quantitativ in Echtzeit zu bewerten. Dies wird möglich durch den Einsatz eines fluoreszenzoptischen Nachweises in jedem Amplifikationszyklus. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wird mit Hilfe eines CCD-Kamera-Systems ausgelesen und mit einer Software ausgewertet.

In der vorliegenden Arbeit wird mit dem Lightcycler 1.5 der Fa. Roche gearbeitet. Das Gerät unterstützt bis zu 3 Fluoreszenzdetektionskanäle (530, 640, 710nm). Die Probengefäße sind dünnwandige Glaskapillaren mit einem Volumen von 20 bis 100µl. Das Heizen während des Cyclings wird mit Heißluft erreicht. Auf Grund dieser besonderen Technologie sind mit dem Lightcycler sehr schnelle PCRs möglich. Eine PCR mit 30 Zyklen dauert ca. 20min.

In den durchgeführten PCR- und Multiplex-PCR-Versuchen wird mit dem Lightcycler FastStart SybrGreen I-Kit, dem Lightcycler FastStart SybrGreen I Plus-Kit und dem Lightcycler FastStart Multiplex-Kit gearbeitet. Mit Ausnahme des letztgenannten beinhalten alle Kits den Interkalator SYBRGreen I für einen fluoreszenzoptischen Nachweis. SYBRGreen I interkaliert in Doppelstrang-DNA und fluoresziert bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 530nm im gebundenen Zustand.

Das Fluoreszenzsignal wird nach jedem Syntheseschritt der PCR gemessen. Mit jedem erfolgreichen Amplifikationszyklus wird die Ausgangsmenge an DNA verdoppelt (2^1 , 2^2 , 2^3 , ..., 2^n), in Korrelation dazu steigt das Fluoreszenzsignal an.

Für die Durchführung der Realtime-Singleplex-PCR wird 1X FastStart Mastermix (3mM $MgCl_2$ final) mit 0,2 μ M Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer gemischt. Je nach Anforderung werden verschiedene Allergen-DNA Konzentrationen eingesetzt.

Das Cycling wird für 10min bei 95°C zur Aktivierung der FastStart Hotstart-Polymerase, 10s bei 95°C Denaturierung, 10s Annealing bei 58°C bzw. 60°C und 15s Elongation bei 72°C für 45 Zyklen, durchgeführt. Das Fluoreszenzsignal wird nach jeder Elongation gemessen.

Für Multiplex-Ansätze wird die Konzentration des FastStart-Mastermix auf 2x und die $MgCl_2$ -Konzentration von 3mM auf 7mM erhöht. Primer werden jeweils in einer Konzentration von 0,2 μ M eingesetzt. Ansonsten bleiben die Versuchsbedingungen und das Cycling im Vergleich zu den Singleplex-Ansätzen unverändert.

Im Anschluß an die PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Da jedes PCR-Produkt auf Grund seiner einzigartigen Basensequenz einen spezifischen Schmelzpunkt (T_m -Wert) besitzt, kann mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse zwischen den verschiedenen Amplifikationsprodukten differenziert werden. Dazu wird nach dem letzten Amplifikationszyklus der PCR-Ansatz zunächst bei 95°C denaturiert, anschließend auf 50°C abgekühlt und dann in Schritten von 0,5°C/s auf 95°C geheizt und die Fluoreszenzabnahme kontinuierlich gemessen. Mit steigender Temperatur werden die Wasserstoffbrückenbindungen des DNA-Doppelstranges destabilisiert und bei Erreichen des spezifischen Schmelzpunktes folgt die vollständige Denaturierung. Während des Denaturierens und dem damit verbundenen Aufbrechen des DNA-Doppelstranges nimmt die Menge an gebundenem SYBRGreen und somit auch das Fluoreszenzsignal ab. Anhand der charakteristischen Schmelzkurve lässt sich dann die Schmelztemperatur des PCR-Produktes mit Hilfe der Lightcycler Software (Version 3.5) auswerten.

3.2.9 Helicase dependent amplification (HDA)

Für die Singleplex- und Duplex-HDA wird mit publizierten Primer-Systemen [111, 113, 115] zum Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae* und Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* gearbeitet. Die verwendete DNA von *Staphylococcus aureus* wurde von der Fa. Congen und im Falle von *Neisseria gonorrhoeae* vom MPI für Infektionsbiologie gestellt.

Alle HDA-Amplifikationen werden mit dem IsoAmp II thDA Amplifikations-Kit der Fa. Biohelix durchgeführt.

3.2.9.1 Singleplex-HDA

Die HDA wurde entsprechend des Protokolls des Herstellers in einem 2-Schritt Ansatz vorbereitet. Dabei wird Ansatz 1 mit 1x Annealing Buffer II, 0,2 µM Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer sowie der nachzuweisenden DNA in einem Volumen von 25µl bei 95°C für 1min erhitzt. Nach dem Erhitzen wird der gesamte Ansatz mit einem Reaktionsansatz 2 gemischt. Dieser Ansatz enthält 1x Annealing Buffer II, 4mM MgCl₂, 40mM NaCl, IsoAmp dNTP und IsoAmp Enzymmix (alle Komponenten stammen aus dem IsoAmp thD-Kit). Das Gesamtvolumen des finalen Reaktionsansatzes liegt bei 50µl. Die Amplifikation wird anschließend bei 65°C für 2h in einem PTC200-Thermocycler durchgeführt.

3.2.9.2 Duplex-HDA

Je Reaktionsansatz werden 1x Annealing Buffer II, je 0,2µM Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer sowie die nachzuweisende DNA in einem Volumen von 25µl bei 95°C für 1min erhitzt. Nach dem Erhitzen wird der gesamte Ansatz mit einem zweiten Ansatz gemischt. Der zweite Ansatz enthält 1x Annealing Buffer II, 5mM MgCl₂, 40mM NaCl, IsoAmp dNTP und IsoAmp Enzymmix (alle Komponenten aus dem IsoAmp thD-Kit).

Die Duplex-HDA wird für 2 Stunden bei 65°C auf einem PTC 200 Thermocycler durchgeführt.

3.3 OnChip-Amplifikationen

3.3.1 Singleplex-OnChip-PCR

Für die OnChip-PCR werden gespottete Epoxysilan-Glassubstrate (Corning und Schott) mit GABA geblockt (s. 3.2.3.3). Auf den Epoxysilan-Glassubstraten wird jeweils der Rückwärtsprimer in einer Konzentration von 15µM immobilisiert. Um mehrere Versuche auf einem Slide durchführen zu können, wird eine Kompartimentierung mit selbstklebenden HybriWells erzielt.

Das Cycling wird auf einem PTC 200 Thermocycler mit Hybridisierungsturm (MJResearch) durchgeführt. Im Laufe der Arbeit wurden zwecks Optimierung verschiedene PCR-Programme getestet, die sich durch Zyklenanzahl und –länge unterschieden.

Ferner wurden verschiedene Annealingtemperaturen und –zeiten getestet. Durch die Dicke der verwendeten Glasslides, sowie einer geräteseitigen Verzögerung im Heizprofil des Thermocyclers, werden die tatsächlichen Annealingtemperaturen und -zeiten mit einem Temperaturfühler auf der Slideoberfläche ermittelt und die Cyclingparameter entsprechend optimiert. Das Gewicht der verwendeten Slides wird anhand der gemessenen Temperaturrampen von 5g auf 11g erhöht. In Abhängigkeit von der Gewichtsangabe wird die Heizleistung des Thermocyclers erhöht.

Das finale Protokoll für die OnChip-Amplifikation wird mit einem 37µl Reaktionsansatz bestehend aus 80mM Trizin-KOH, 32mM KCl, 5mM MgCl₂, 7,5µg/ml BSA, 0,5mM dNTP, je 0,2µM Vorwärts- und 0,02µM Rückwärtsprimer, 2,5U Titanium Taq und der zu untersuchenden Proben DNA durchgeführt.

Das verwendete Cycling-Programm besteht aus einem Aktivierungsschritt bei 95°C für 90s, 45 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt für 45s bei 95°C, einem Annealingschritt bei 58°C (AllergenChip) bzw. 60°C (PoultryChip) für 30s und einem Elongationsschritt bei 68°C für 45s, sowie einem finalen Elongationsschritt für 7min bei 68°C.

Nach der Amplifikation folgen 3 Waschschrte mit Waschpuffern steigender Stringenz (Waschpuffer 1-3, s. I.A.5) für jeweils 5 min bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen der Chips erfolgt das Trocknen unter Stickstoff.

3.3.2 OnChip-PCR mit fluoreszenzmarkierten dUTP

Die OnChip-PCR mit fluoreszenzmarkierten dUTP (Cy3 oder Cy5) wurde analog zu dem OnChip-PCR Protokoll durchgeführt. Anstelle des konventionellen dNTP-Mix wurde ein Cy-dUTP Mix eingesetzt. Der Mix wurde als 10x Stammlösung hergestellt und besteht aus je 2mM dATP, dGTP, dCTP sowie 0,2mM dTTP und 500pmol des jeweils benötigten Cyaninfarbstoff-dUTPs (Cy3 oder Cy5). Der Cy-dUTP-Mix wird jeweils in einfacher Konzentration für die OnChip-PCR eingesetzt. Für Multiplex-OnChip-PCRs wird der Mix 2x konzentriert eingesetzt.

3.3.3 Multiplex-OnChip-PCR

Die Multiplex OnChip-PCR wurde analog zu den zuvor beschriebenen OnChip-PCR Versuchen vorbereitet.

Ein Multiplex OnChip-PCR Ansatz beinhaltet die folgenden Komponenten:

80mM Trizin-KOH, 32mM KCl, 7mM MgCl₂, 7,5µg/ml BSA, 0.8mM dNTP, je 0,2µM Vorwärts- und 0,02µM Rückwärtsprimer, 4U Titanium Taq und die jeweils zu untersuchende Proben-DNA.

Für das Cycling werden folgende Parameter verwendet:

Aktivierungsschritt bei 95°C für 90s, 45 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt für 45s bei 95°C, einem Annealingschritt bei 58°C (AllergenChip) bzw. 60°C (PoultryChip) für 30s und einem Elongationsschritt bei 68°C für 1min, sowie einem finalen Elongationsschritt für 7min bei 68°C.

Nach der Amplifikation erfolgt das Waschen wie unter 3.3.1 beschrieben. Das Trocknen der Chips erfolgt unter Stickstoff.

3.3.4 Singleplex- und Duplex-OnChip-HDA

Die Vorbereitung der OnChip-HDA wird analog zu der OnChip-PCR durchgeführt. Da die HDA eine isothermale Amplifikationsmethode ist, wurde die OnChip-HDA in einer Hybridisierungsstation der Fa. Epigenomics durchgeführt. Die Hybridisierungsstation ermöglicht im Anschluss an die isothermale Amplifikation ein automatisiertes Waschen der Chips. Während der Amplifikation wird eine aktive Durchmischung über Pumpen erzeugt, um eine homogene Verteilung des Reaktionsansatzes über dem Array zu erhalten.

Da die Hybridisierungskammern nur ein Kompartiment mit einem minimalen Füllvolumen von 150µl besitzen, werden für die OnChip-HDA pro Kammer das 3-fache Reaktionsvolumen

hergestellt. Dazu wird entsprechend der Zusammensetzung der Reaktionsansätze unter 3.2.9.1 bzw. 3.2.9.2 verfahren.

Die Amplifikation erfolgt für 2h bei 65°C. Nach der Amplifikation folgen drei Waschschriffe mit Waschpuffern steigender Stringenz (Waschpuffer I und II; s. 3.3.1) für jeweils 5 min bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen der Chips erfolgt das Trocknen unter Stickstoff.

3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese erfolgt die Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten, z.B. PCR-Produkten, nach ihrer Größe. Dabei macht man sich die negative Gesamtladung von DNA-Molekülen zu Nutze, die es ermöglicht, DNA in einem elektrischen Feld zu einem positiven Pol zu wandern zu lassen. Die Stärke des elektrischen Feldes ist dabei abhängig von Gellänge und der Differenz des angelegten Potentials. Je nach eingesetzter Agarosegelkonzentration werden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Je größer das DNA-Fragment ist, desto langsamer bewegt es sich in der Gelmatrix und es kommt zu einer Auftrennung der DNA-Fragmente. Hochprozentige Agarosegele eignen sich dabei besser für kleine DNA-Fragmente, da die Porengröße in der Gelmatrix kleiner ist und somit auch geringfügige Größenunterschiede von ca. 10bp in einem Gel differenziert werden können [120].

Die zu analysierende Probe wird 1:6 mit Probenpuffer versetzt und in einer Geltasche der Kammer aufgetragen. Je nach Größe der zu analysierenden Proben werden 2-4%ige Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei kleinen Gelen (25ml) bei 5 V/cm für 30 min und bei großen Gelen (50ml) bei 8 V/cm für 30 min. Die Proben werden mit Hilfe von Ethidiumbromid (0,5mg/ml), einem interkalierenden Farbstoff, unter UV-Bestrahlung in einem Geldokumentationssystem sichtbar gemacht.

3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um nachfolgende Anwendungen nicht negativ zu beeinflussen, wird nach einer PCR das amplifizierte Produkt aufgereinigt. In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Systemen gearbeitet. Anwendung fanden verschiedene säulenbasierten Lösungen wie das CentriSpin 20 Kit, Amicon Microcon Aufreinigungssäulen und das Invisorb Spin PCRapid Kit. Alle Aufreinigungen werden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.6 Generierung einzelsträngiger DNA (ssDNA)

Für die Hybridisierungsversuche werden die PCR-Produkte aus einer Einzel- bzw. Multiplex-PCR verwendet. Es wurden Versuche mit gereinigten und ungereinigten PCR-Produkten durchgeführt. Für die nachfolgenden Versuche werden nur die Cy5-markierten DNA-Stränge benötigt. Von den getesteten Methoden zur Generierung einzelsträngige DNA zu generieren, hat sich der Verdau mit λ -Exonuklease als besonders effizient herausgestellt. Die λ -Exonuklease besitzt eine hohe 5'-3' Prozessivität und verdaut bevorzugt 5'-phosphorylierte DNA-Stränge [121-123]

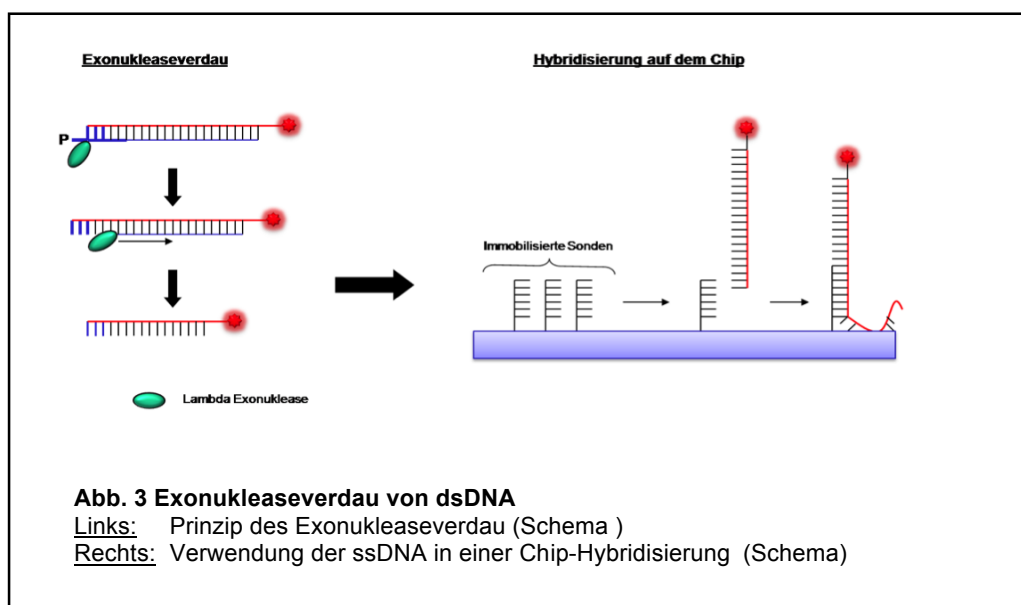


Abb. 3 zeigt den schematischen Ablauf eines Exonukleaseverdau. Mit Hilfe eines 5'-phosphorylierten Primers werden in der PCR entsprechend phosphorylierte PCR-Produkte generiert. Nach einer Aufreinigung wird das PCR-Produkt mit λ -Exonuklease bei 37°C inkubiert. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten von 15min-4Std. getestet, um eine optimale Inkubationsdauer zu ermitteln. Danach erfolgt der Abbruch der Reaktion durch Denaturieren des Enzyms bei 95 °C für 5 min. Die generierten Einzelstränge werden für die Chip-Hybridisierung eingesetzt.

Die Exonuklease bevorzugt zwar 5'-phosphorylierte DNA-Stränge, kann aber, wenn das bevorzugte Substrat aufgebraucht ist, auch nicht phosphorylierte DNA-Stränge verdauen. Als günstig hat sich erwiesen, nach einem Protokoll zu arbeiten, welches sich an das von Null et al. anlehnt [124].

5U Exonuklease werden zusammen mit 10x Exonuklease Puffer und gereinigten PCR-Produkten in einem 50 μ l Ansatz für 1 Std. inkubiert. Der Ansatz kann auch mit ungereinigten PCR-Produkten durchgeführt werden, allerdings sollte dann auch mit einer entsprechend

höheren Enzymkonzentration von 7U, als auch einer längeren Inkubationszeit von 1,5h, gearbeitet werden. Grund für die Erhöhung der verlängerten Inkubationszeit und der erhöhten Enzymkonzentration ist das mögliche Vorhandensein freier, nicht in der PCR eingebauter, phosphorylierter Primer. Diese dienen ebenfalls als Substrat für die λ -Exonuklease und stehen somit in Konkurrenz zu den in der PCR generierten phosphorylierten Amplifikaten.

3.7 Chip-Hybridisierung

Ziel bei der Hybridisierung ist es, eine hohe Spezifität bei gleichzeitiger Minimierung unspezifischer Hintergrundsignale zu erreichen [43]. Um dies zu gewährleisten, werden aminosilanisierte bzw. epoxysilanisierte Glassubstrate nach dem Spotting mit den unter 3.3 beschriebenen Methoden geblockt. Alle Sonden bzw. Primer werden im Falle der aminosilanisierten Substrate in einer Konzentration von 25 μ M über EDC-Kopplung immobilisiert. Bei Verwendung von epoxysilanisierten Substrate werden die Sonden/Primer in einer Konzentration von 15 μ M immobilisiert. Alle immobilisierten Sonden sind mit einem 18dT-Linker (aminosilanisierte Substrate) bzw. C6-Aminolinker (epoxysilanisierte Substrate) versehen. Für die Detektion wird der komplementäre Cy5-markierte DNA-Strang eingesetzt. Die DNA-Einzelstränge (ssDNA) werden durch die unter 3.8 beschriebene Methode generiert. Die ssDNA wird nachfolgend mit einem Hybridisierungspuffer (5x SSC, 0,5% SDS, 50mM HEPES, 0,5 μ M Hybridisierungskontrolle) gemischt. Der Hybridisierungspuffer wird vor der Hybridisierung für 30s bei 70°C erwärmt. Auf dem Chip wird mit einem Kleberahmen (HybriWells) eine Hybridisierungskompartiment geschaffen und mit 35 μ l des Hybridisierungsgemisches befüllt. Die Hybridisierung wird in einem PT200 Thermocycler mit *in situ* – Hybridisierungsturm bei 58°C (AllergenChip) bzw. 60°C (PoultryChip) für 4h durchgeführt. Längere Inkubationszeiten sind möglich, haben aber keinen Einfluss auf das finale Ergebnis gezeigt.

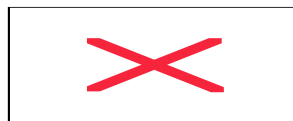
Nach der Hybridisierung werden die selbstklebende Hybridisierungskammer entfernt, die Chips sofort in Waschpuffer I getaucht und für 5min auf dem Wippschüttler gewaschen. Nachfolgend sind die Chips in Waschpuffer II überführt und ebenfalls für 5min gewaschen worden. Ein dritter Waschschrift erfolgt ebenfalls für 5min in H₂O_{bidest.}. Abschließend folgt das Trocknen der Chips unter Stickstoffstrom.

3.8 Datenauswertung

Die Auswertung der Chips erfolgt in einem Affymetrix GMS 428 bzw. Axon 4200A Microarray-Scanner. Die Fluoreszenzsignale werden mit Hilfe der Software ImaGene V (Biodiscovery, El Segundo, USA) bzw. GenePix 6 (MDS, Sunnyvale, USA) quantitativ analysiert. Die Falschfarbendarstellung der Bilder erfolgt mit Hilfe der Software Farbverlauf (Fraunhofer IBMT, Golm, Deutschland).

Die mit den oben beschriebenen Scannern und Softwaresystemen ermittelten Rohdaten werden nachfolgend in Microsoft Excel für die weitere Analyse verarbeitet.

Für die Datenauswertung der Pathogen- bzw. Allergenarrays wird eine Beurteilung über die Berechnung des Kontrastwertes C durchgeführt. Dabei wird das arithmetische Mittel der Fluoreszenzintensitäten aller spezifischen Spots eines Pathogens bzw. Allergens (S_{Target}) in Bezug zu dem arithmetischen Mittel der Fluoreszenzintensitäten der Negativkontrolle (S_{Neg}) gesetzt. Die Negativkontrollen sind die Bewertungsgrundlage für das jeweilige Hintergrundsignal innerhalb des betrachteten Arrays.



(Formel 3-1)

Der Kontrast C stellt eine normierte Größe dar, da maximal ein Wert von 1, das entspricht 100% Kontrast, erreicht werden kann. Durch die Normierung können Ergebnisse zwischen verschiedenen Microarrays besser miteinander verglichen werden, als dies anhand der reinen Signalintensitäten möglich ist. Voraussetzung ist die Verwendung identischer Einstellungen während des Laserscans. Da für die diagnostische Fragestellung in den Microarray-Experimenten nicht primär die Quantifizierung eines Signals, sondern vielmehr die Frage nach der Gegenwart einer bestimmten Nukleinsäuresequenz im Vordergrund des Interesses steht, bietet der Kontrastwert eine Bewertungsgrundlage, wann sich ein Signal von dem unspezifischen Hintergrundsignal abgrenzt.

Da der Kontrastwert ein sehr sensibles Kriterium darstellt, ist es wichtig, eine Nachweisgrenze zu definieren. Da die Prozessierung von Chip zu Chip unterschiedlich verlaufen kann, können Hintergrundsignale die Berechnung der Kontrastwerte für jeden Chip unterschiedlich stark beeinflussen. Es ist daher nötig, dass die Nachweisgrenze dynamisch an die Hintergrundsignale eines Microarrays angepasst wird. Dabei wird der Schwellenwert über folgende Gleichung berechnet:

$$LOD = \frac{(S_{Neg} + 5 \times SD_{SNeg}) - S_{Neg}}{(S_{Neg} + 5 \times SD_{SNeg}) + S_{Neg}} \quad (\text{Formel 3-II})$$

Dabei ist S_{Neg} der Mittelwert aus den Fluoreszenzintensitäten der Negativkontrollen und SD_{SNeg} die Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten aus den Negativkontrollen für den entsprechenden Chip. Der Nachweis eines gesuchten Pathogens bzw. Allergens wird als positiv gewertet, wenn das berechnete arithmetische Mittel der Kontrastwerte dieses Pathogens/Allergens abzüglich der zugehörigen Standardabweichung oberhalb der LOD liegt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Arbeit wurde vor dem Hintergrund verschiedener Anwendungsbereiche diagnostischer Fragestellungen bearbeitet. Es galt für diese Fragestellungen eine Multiparameteranalytik zu entwickeln, die auf der Microarray-Technologie basiert. Als Anwendungen wurden jeweils Microarrays zum Nachweis von Geflügelpathogenen (PoultryChip) sowie potentiell allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen (AllergenChip) entwickelt.

Um diese Anwendungen zu entwickeln, wurden zunächst geeignete Multiplex-PCR-Systeme entworfen. Weitere Schritte zielten auf die Entwicklung von Microarrays, die die PCR-Produkte aus den entwickelten Multiplex-PCR-Verfahren spezifisch und sensitiv über eine Hybridisierung nachweisen. Neben der Entwicklung dieser Microarrays lag der Fokus der Arbeit auf der Entwicklung von OnChip-Technologien, die die Amplifikation und Detektion integrieren. In der Arbeit wurden Multiplex-OnChip-PCRs und ein isothermales Amplifikationsverfahren, die Helicase dependent amplification, an immobilisierten Primern durchgeführt. Die Verfahren wurden vor dem Hintergrund der o.g. Anwendungen entwickelt. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse sind entsprechend der Anwendungsgebiete gegliedert und stellen die wichtigsten Ergebnisse der jeweiligen Entwicklungsschritte dar.

Im Anschluss an die Ergebnisse zur Entwicklung der PCR-Verfahren und der entsprechenden Microarrays, folgen Ergebnisse, die eine weitere Integration von Analytik und Detektion vorstellen. In dem Kapitel 4.3 werden die Resultate verschiedener OnChip-Amplifikationsansätze vorgestellt, die die Amplifikation und Detektion in einem Reaktionsschritt vereinen. Neben der OnChip-PCR wird auch die Erweiterung auf eine Multiplex-OnChip-PCR vorgestellt.

Zum Abschluß des Ergebnisteils wird eine isothermale Amplifikationsvariante, die der PCR im Ablauf sehr ähnlich ist, vorgestellt. Die helicase-abhängige Amplifikation konnte an einem Modellsystem erfolgreich auf der Chipoberfläche etabliert werden. Diese Methode besitzt für den Einsatz in diagnostischen Anwendungen und der Konzipierung diagnostischer Arrays ein großes Potential.

Zum Ende eines Themenkomplexes folgt eine abschließende Bewertung und Diskussion der durchgeführten Arbeiten.

4.1 Poultry Chip

Der PoultryChip wurde entwickelt, um die folgenden Pathogene zu detektieren:

1. *Salmonella typhimurium* (Sal)
2. *Listerien monocytogenes* (List)
3. *Campylobacter jejuni* (Camp)
4. *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV)
5. *Avian Infectious Bronchitis Virus* (AIV)
6. *Newcastle Disease Virus* (NDV)
7. *Reo Virus* (Reo)
8. *Mareks Disease Virus* (MDV)
9. *Chicken Anemia Virus* (CAV)

Die Pathogene 1-3 wurden als bakterielle Vertreter, die sowohl für Mensch als auch für das Geflügel selbst infektiös sind, ausgewählt. Bei den Viren 8 und 9 handelt es sich um DNA-Viren, bei den Viren 4-7 um RNA-Viren, die zunächst in einer reversen Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben wurden. Alle DNA Isolationen und Umschreibungen von RNA Material wurden von der Fa. Congen durchgeführt. Das isolierte DNA Material wurde für die weiteren Arbeiten zur Verfügung gestellt. Die DNA wurde nachfolgend für den Nachweis durch PCR- und Multiplex PCR-Verfahren eingesetzt.

4.1.1 Singleplex- und Multiplex-PCR

Für den Nachweis der Viren wurden Primersysteme mit Hilfe einer Primerdesign-Software (Primer Premier 5) entworfen. Diese Primer wurden *in silico* auf Multiplexfähigkeit geprüft. Dabei wurden für alle Primer kombinatorisch Primer-Dimer-Bildungen berechnet.

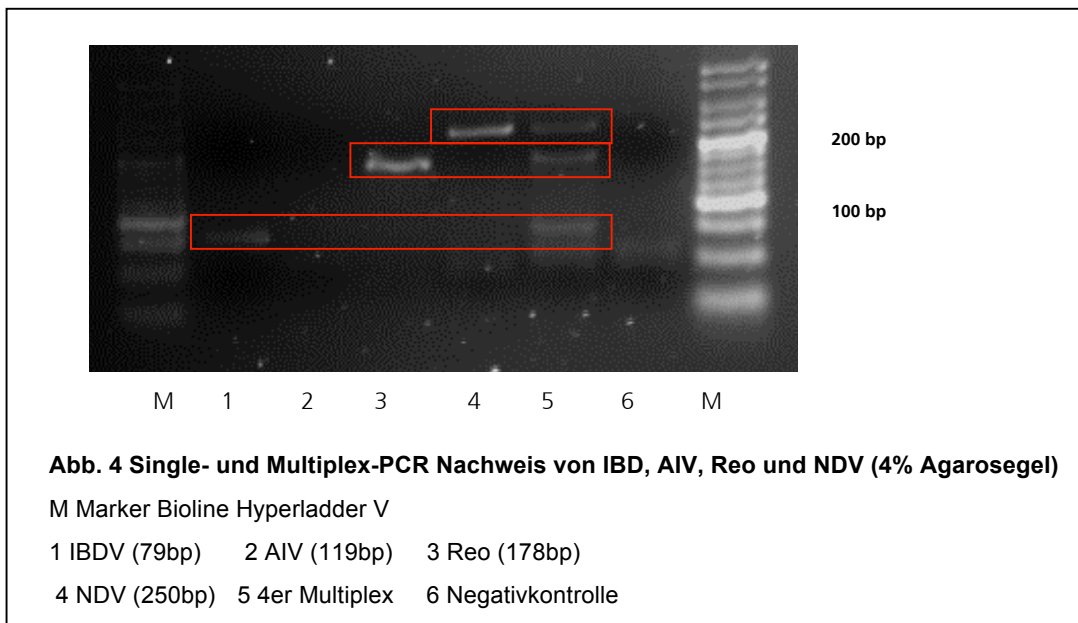
Die Schmelztemperatur für Primer-Dimer wurde nach der sog. "nearest neighbour"-Methode berechnet, die sowohl Stapelkräfte benachbarter Basenpaare (Base-Stacking) als auch „Mismatching“ berücksichtigt [125]:

$$Tm^{primer} = \frac{dH}{dS + R \ln(c/4)} + 16.6 \lg \frac{[K^+]}{1 + 0.7[K^+]} - 273.15 \quad (\text{Formel 4-I})$$

Hierbei ist dH die Enthalpieänderung durch Helixbildung, dS die Entropieänderung bei Helixbildung, R ist die Rydbergkonstante (1,987 cal/°C mol), c ist die Konzentration der Nucleinsäuren und [K+] die Kaliumionen-Konzentration.

4.1.1.1 Singleplex- und Multiplex-PCR für den Nachweis viraler Pathogene

Die *in silico* entworfenen Primersysteme wurden für den Nachweis der viralen Erreger in Singleplex- und Multiplex-PCRs getestet. Als DNA-Matrizen wurde die jeweiligen Referenz-DNAs der Fa. Congen eingesetzt. Die im Vorfeld für die Multiplex-PCR ermittelten Primersysteme wurden mit einer optimalen Annealingtemperatur bei 60°C entwickelt. Neben der Annealingtemperatur wurden auch die üblichen Kriterien bei der Berechnung der Primersysteme wie Primerlänge, Annealingtemperatur ca. 5°C unter T_m , keine Palindromstrukturen, etc., einbezogen. Das Ergebnis der PCR zur Detektion von vier verschiedenen RNA-Viren (*Infectious Bronchitis Virus*, *Reovirus*, *Infectious Bursal Disease Virus* und *Newcastle Disease Virus*) ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Die Auswertung erfolgte in einem 4%igen Agarosegel.



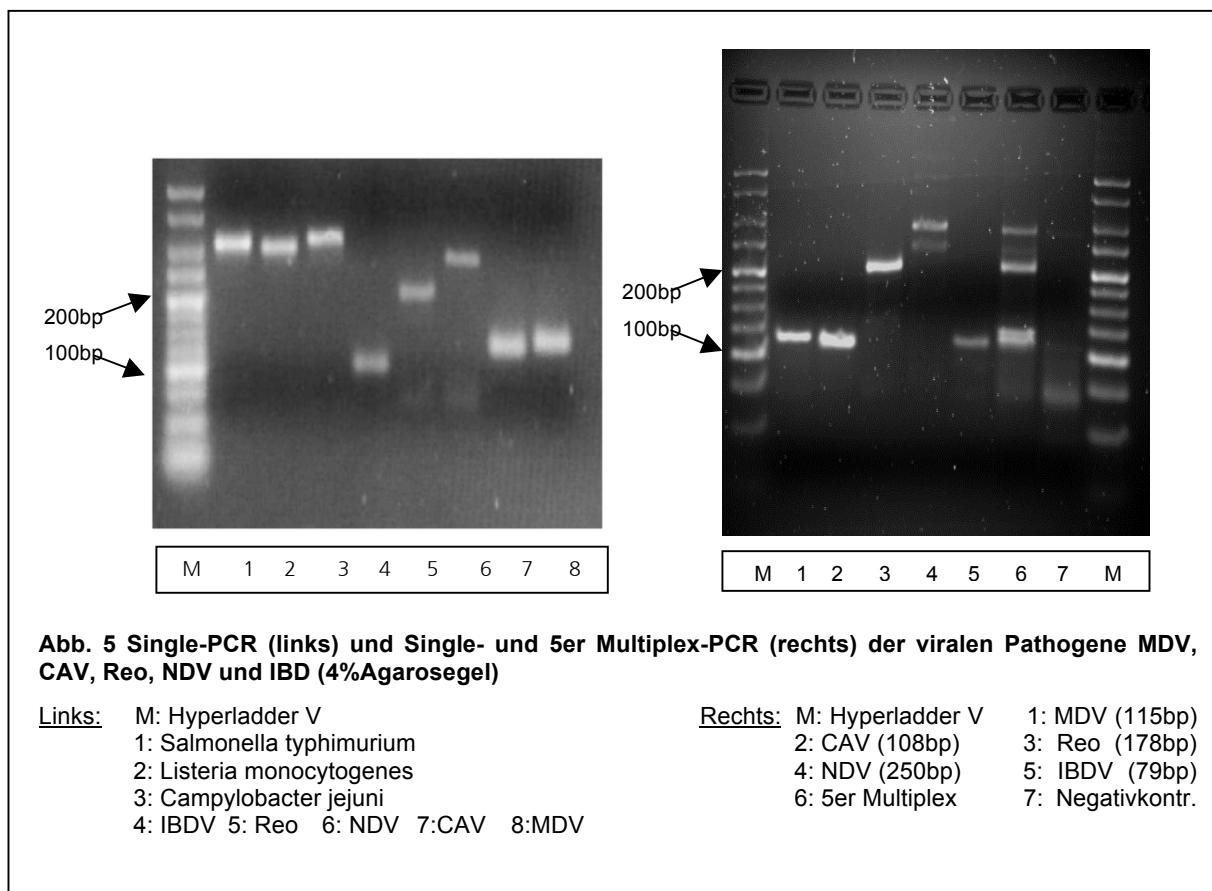
Die Auswertung erfolgte über Einzel- und die Multiplex-Amplifikation. gezeigt. Sowohl in der Einzel-PCR zum Nachweis der RNA Viren IBDV (1), AIV (2), Reo (3) und NDV (4), als auch in der Multiplex-PCR (5) sind die zu detektierenden Viren, mit Ausnahme von AIV, spezifisch amplifiziert worden. Die Negativkontrolle zeigt bis auf eine schwache Primer-Dimer Bande keine Amplifikate. AIV konnte in der PCR nicht nachgewiesen werden. Nach Aussage der Fa. Congen kam es bereits bei der reversen Transkription der RNA von AIV in cDNA zu wiederholten Problemen, so dass AIV-Referenzmaterial nicht in ausreichender Qualität für die PCR zur Verfügung stand. Für nachfolgende Nachweisreaktionen wurde AIV daher nicht weiter mit einbezogen. Für die anderen drei Referenzviren konnte bei einer

Annealingtemperatur von 60°C neben den Singleplex-PCRs auch die Multiplex-PCR zum parallelen Nachweis aller drei RNA-Viren gezeigt werden.

Versuche, in denen mit einer niedrigeren Annealingtemperatur als 60°C für die Multiplex-PCR gearbeitet wurde, zeigten eine ineffiziente oder keine Amplifikation.

Nach den erfolgreichen Versuchen mit den RNA-Viren wurde das Spektrum der nachzuweisenden Viren um zwei weitere DNA-Viren, dem *Mareks Disease Virus* und dem *Chicken Anemia Virus*, und die bakteriellen Erreger *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* und *Campylobacter jejuni* erweitert. Die Primersysteme wurden ebenfalls für eine Annealingtemperatur von 60°C entwickelt, um die Integration in das bereits bestehende Multiplex-System zu vereinfachen. Die zu erwartende Produktgröße für MDV lag bei 115bp und die von CAV bei 108bp. In einem 4% Agarosegel waren die Größenunterschiede in einem Multiplex-Ansatz nicht mehr eindeutig zu differenzieren und sind demnach als eine Bande sichtbar. In Hinblick auf die spätere Detektion auf dem Microarray wurden alle Analysen in 4% Agarosegelen als ausreichend genau bewertet, da die spätere Differenzierung über den Microarray erfolgen sollte.

In Abb. 5 ist das Ergebnis der Einzel- als auch einer 5er Multiplex-PCR zum Nachweis aller relevanten Viren gezeigt.



In allen Einzel-PCRs konnten die gesuchten Viren spezifisch amplifiziert werden. Bei der Auswertung des *Newcastle Disease Virus* ist im rechten Bild eine zweite unspezifische Bande zu sehen (Abb. 5 rechts, Spur 4), die auch in dem Multiplex-Ansatz amplifiziert wurde. Es ist nicht nachvollziehbar, welchen Ursprung dieses Amplifikat hat. Bei anderen PCRs mit NDV konnte keine unspezifischen Produkte beobachtet werden, wie z.B. auch in der Auswertung im linken Bild (Abb.9 links) zu sehen ist. Die 5er Multiplex-PCR zeigte für alle gesuchten Viren ein positives Signal, allerdings ist auf Grund der geringen Größenunterschiede zwischen CAV und MDV für diese Amplifikate nur eine Bande zu detektieren.

Damit konnte mit Ausnahme von AIV für alle gesuchten viralen Pathogene ein Multiplex-System etabliert werden. Das zweite Multiplex-System für den Nachweis von Salmonellen, Listerien und *Campylobacter* war bereits in einer früheren eigenen Arbeit etabliert worden [126].

4.1.2 Chiplayout PoultryChip

Zu Beginn der Arbeiten wurde das Chiplayout für die Detektion der RNA Viren und der drei bakteriellen Erreger ausgelegt. Als Trägermaterial wurden aminosilanisierte Glassubstrate aus eigener Herstellung oder kommerzielle aminosilanisierte Glassubstrate der Fa. Genetix verwendet. Die Sonden wurden über eine 5'-Phosphorylierung mittels EDC-Kopplung in einer Konzentration von 25µM immobilisiert. Als Kontrollen wurden Immobilisierungskontrollen, Hybridisierungskontrollen sowie Negativkontrollen in das Chiplayout aufgenommen. Als Immobilisierungskontrolle diente ein 20bp Oligomer, welches am 5'-Ende Cy5-fluoreszenzmarkiert und am 3'-Ende phosphoryliert war. Die Negativkontrolle bestand aus dem verwendeten Spottingpuffer ohne DNA-Anteil. Die Negativkontrolle diente auch für die Bewertung eines ggf. durch den Spottingpuffer verursachtes unspezifisches Hintergrundsignal, welches bspw. durch Kristallisierung der im Puffer enthaltenen Salze auftreten kann. Die Hybridisierungskontrolle ist eine 50bp lange Sequenz, die am 5'-Ende mit Cy5 fluoreszenzmarkiert ist und nicht mit den anderen Sonden kreuzhybridisiert. Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgte wie unter 3.10 beschrieben.

Nachdem weiteres Material für die DNA Viren MDV und CAV verfügbar waren, wurde das Chiplayout entsprechend erweitert. Auf diesem Chip wurden Sonden für den parallelen Nachweis von *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *IBDV*, *AIV*, *Reo*, *NDV*, *MDV* und *CAV* wie beschrieben immobilisiert (s. o.). Das Chiplayout beinhaltet zudem Sonden für zwei verschiedene AIV Typen, die allerdings auf Grund des fehlenden Probenmaterials als eine Art Spezifitätskontrolle behandelt wurden. Zudem beinhaltet der Chip zwei 1:2 Verdünnungsreihen der Immobilisierungs- und Hybridisierungskontrolle, von 50 – 1µM. Dies soll eine schnelle qualitative Beurteilung der

Ergebnisse ermöglichen, indem Signalintensitäten gegeneinander verglichen werden können. Das Chiplayout wurde in einem 8x8 Array gespottet. Pro Chip werden zwei Kompartimente mit je 4 Arrays des in Abb.6 gezeigten finalen Layouts verwendet. Die Kompartimentierung auf dem Chip erfolgt durch die Verwendung von selbstklebenden Hybridisierungskammern.

Reo	Reo	List	List	Camp	Camp	Neg	Neg
Reo	Reo	List	List	Camp	Camp	Neg	Neg
Sal	Sal	IBDV	IBDV	NDV	NDV	Hyb 1 μ M	Immo 1 μ M
Sal	Sal	IBDV	IBDV	NDV	NDV	Hyb 3 μ M	Immo 3 μ M
CAV	CAV	MDV	MDV	Neg	Neg	Hyb 6 μ M	Immo 6 μ M
CAV	CAV	MDV	MDV	Neg	Neg	Hyb 12 μ M	Immo 12 μ M
AIV 1	AIV 1	AIV 2	AIV 2	Hyb 50 μ M	Hyb 50 μ M	Hyb 25 μ M	Immo 25 μ M
AIV 1	AIV 1	AIV 2	AIV 2	Hyb 50 μ M	Hyb 50 μ M	Hyb 50 μ M	Immo 50 μ M

Abb. 6 Finales PoultryChip Layout

Die pathogenspezifischen Sonden sind in einer Konzentration von 25 μ M immobilisiert, die Kontrollen in den jeweils angegebenen μ M-Konzentrationen.

4.1.3 Hybridisierung auf dem PoultryChip

Die in den Multiplex-PCRs gewonnenen Amplifikate werden mit Hilfe konventioneller Aufreinigungskits von unerwünschten Komponenten, wie nicht eingebauten Primern oder dNTPs, separiert und anschließend nach dem etablierten λ -Exonuklease Protokoll zu ssDNA verdaut. Die ssDNA der Amplifikate aus Singleplex- oder Multiplex-PCR werden nach erfolgreicher Hybridisierung auf dem PoultryChip in einem konfokalen Laserscanner mit identischen Einstellungen ausgewertet.

Zu Beginn der Arbeit wurden die Hybridisierungen bzw. generell die Ergebnisse der Chipversuche qualitativ ausgewertet. Die schwankende Qualität der verwendeten Substrate und die geringen Mengen nachzuweisender DNA lassen eine rein qualitative Auswertung jedoch nicht immer eindeutig zu. Daher wurde eine quantitative Bestimmung mit Hilfe geeigneter Microarray-Analysesoftware durchgeführt. Für die beschriebenen Versuche mit dem PoultryChip wurde die Software ImaGene5 verwendet.

4.1.3.1 Einzelnachweis verschiedener Pathogene

Anfänglich wurde die Spezifität der immobilisierten Sonden auf dem Microarray durch Hybridisierung mit jeweils einem der gesuchten Pathogene durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte für 4 Stunden bei 60°C. Nachfolgend ist exemplarisch die qualitative Auswertung des Infectious Bursal Disease Virus gezeigt (siehe Abb. 7 links).

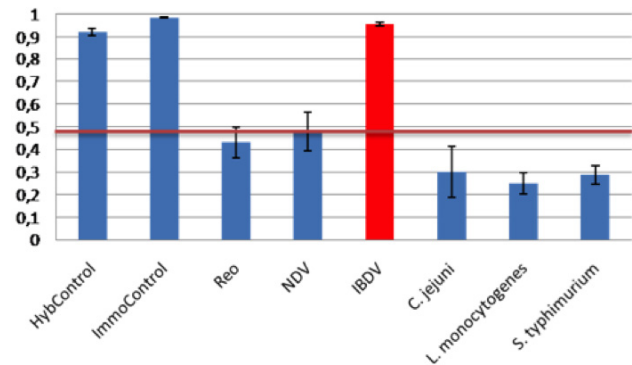
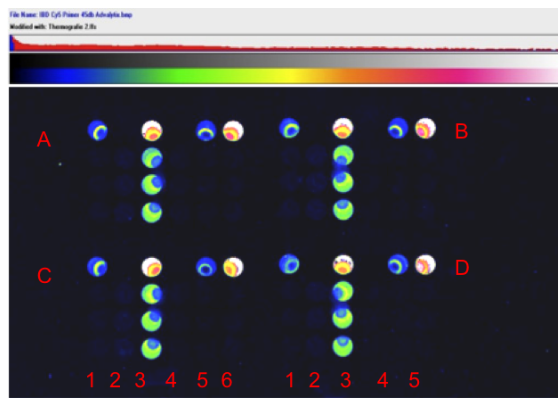


Abb. 7 Nachweis des Infectious Bursal Disease Virus über Hybridisierungssonden

Die Auswertung erfolgte bei 45db Gain Einstellung in einem Affymetrix GMS 428 Laserscanner bei 635nm.

Links: 4fach-Bestimmung (Subarrays A,B,C,D): 1=REO, 2=NDV, 3=IBDV, 4=Camp., 5=List, 6=Sal, Kontrollen (oberste Reihe von links nach rechts): Hybridisierung, Negativ, Immobilisierung, Negativ, Hybridisierung, Immobilisierung

Rechts: Quantifizierung der Hybridisierungsergebnisse über den Kontrast und die mittlere Standardabweichung (Mittelwert aus n=12 Spots bei Pathogenen bzw. n=8 für die Kontrollen). Die rote Linie stellt den berechneten Schwellenwert (LOD; Limit of Detection) dar.

Das in den ersten Versuchen verwendete Layout wurde in vier Subarrays mit je 24 Spots angelegt. Die spezifischen Sonden sind jeweils in Triplikaten in einem Subarray angeordnet, so dass pro Pathogen insgesamt 12 Sonden in einem kompletten Array zur Verfügung stehen. Durch die Anordnung in Subarrays werden die Sonden räumlich innerhalb des Arrays verteilt. Dies soll verhindern, dass die Ergebnisse durch Inhomogenitäten der Substratoberfläche oder ggf. auftretende Verunreinigungen für eine Auswertung nicht mehr nutzbar sind. Bei der räumlichen Verteilung der Sonden muss erst ein Großteil des Arrays (>30%-50%) ausfallen, bevor keine Aussage mehr möglich ist.

Das in Abb. 7 (links) gezeigte Array zeigt für alle IBDV-Sonden spezifische Signale. Auch die Hybridisierungs- und Immobilisierungskontrollen zeigen deutliche Signale. Die Negativkontrollen blieben ohne Signal, ebenso die Positionen, an denen die Sonden der übrigen Pathogene immobilisiert waren. Für die Quantifizierung wurde jeweils das arithmetische Mittel aus den Kontrastwerten an den jeweiligen Sondenpositionen für jedes Pathogen sowie die entsprechende Standardabweichung berechnet. Der Schwellenwert

(LOD) wurde gemäß der Formel in Abschnitt 3.10 (Formel 3-II) ermittelt. In Abb.11 (rechts) ist die quantitative Auswertung gezeigt. Die Kontrollen und das gesuchte Pathogen zeigen Signale, die deutlich oberhalb der LOD liegen und damit eindeutig als positiv gewertet werden. Die ermittelten Kontrastwerte für *Reovirus* (Reo) und *Newcastle Disease Virus* (NDV) liegen bei der Bewertung über den Kontrast nur knapp unterhalb der LOD. Die qualitative Auswertung zeigt allerdings nur sehr schwache Signale an diesen Positionen, die mit bloßem Auge kaum erkennbar, über den Kontrast allerdings noch von dem Hintergrund differenzierbar sind. Dieses schwache Signal lässt sich auf geringfügige Anlagerung von Puffersalzen an den DNA-Sonden oder leichte Eigenfluoreszenz der Spots zurückführen. Über den Schwellenwert und die qualitative Aussage kann man allerdings eindeutig erkennen, dass es sich um einen spezifischen Nachweis des *Infectious Bursal Disease Virus* handelt. In Abb. 8 werden nachfolgend die jeweils quantitativen Auswertungen über den Kontrastwert für die übrigen Pathogene aufgeführt.

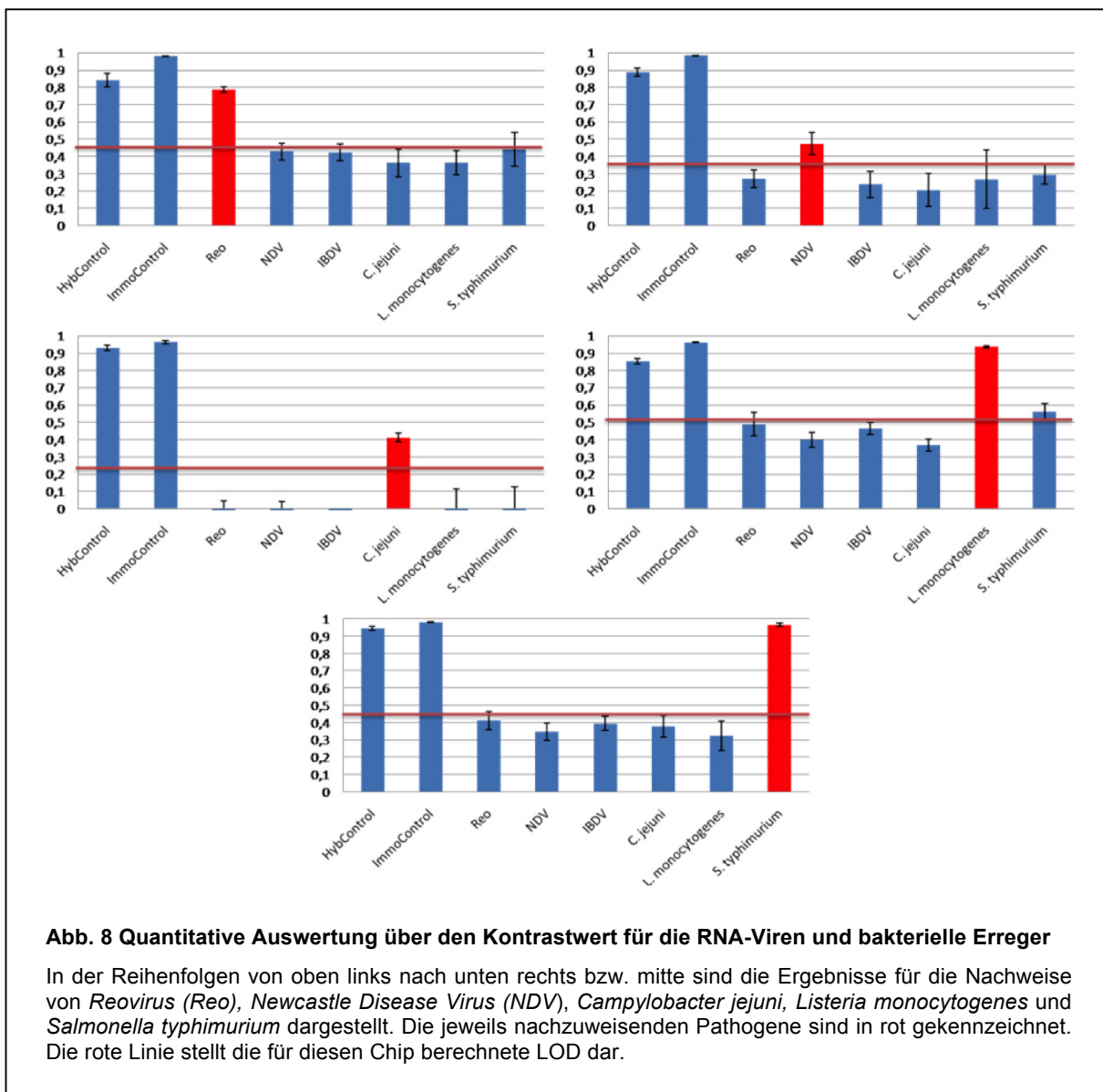
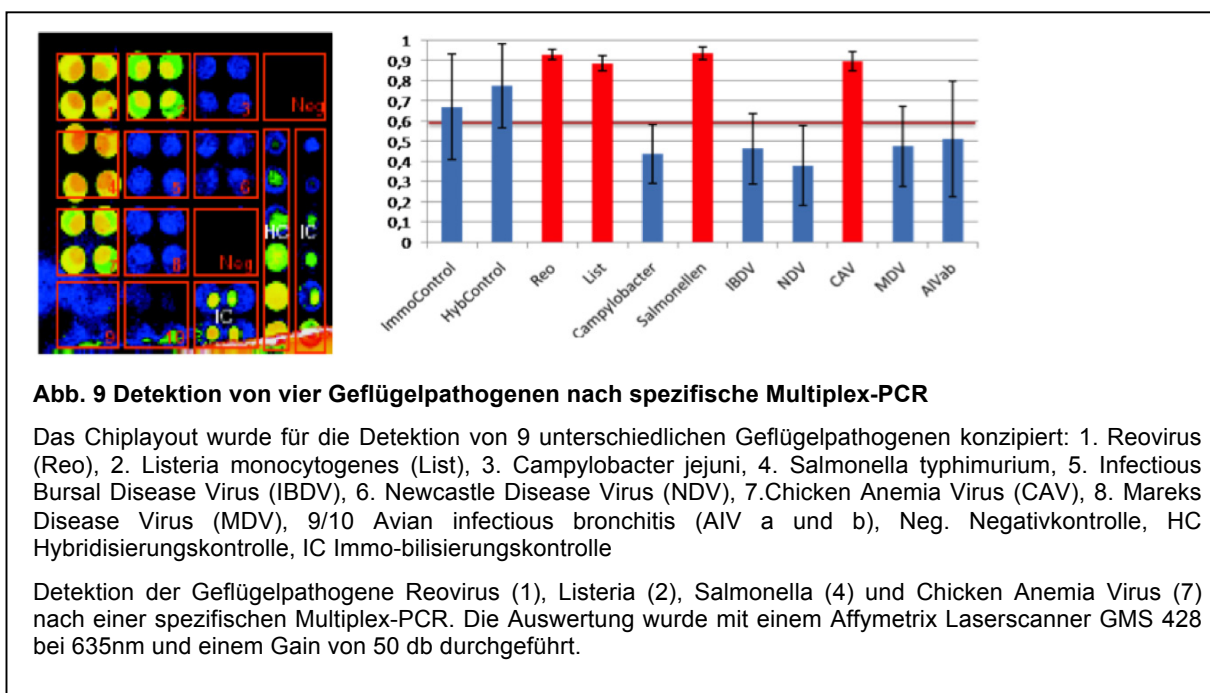


Abb. 8 Quantitative Auswertung über den Kontrastwert für die RNA-Viren und bakterielle Erreger

In der Reihenfolgen von oben links nach unten rechts bzw. mitte sind die Ergebnisse für die Nachweise von *Reovirus* (Reo), *Newcastle Disease Virus* (NDV), *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* dargestellt. Die jeweils nachzuweisenden Pathogene sind in rot gekennzeichnet. Die rote Linie stellt die für diesen Chip berechnete LOD dar.

Die jeweils in dem Versuch nachzuweisenden Pathogene konnten spezifisch über den Kontrastwert identifiziert werden (Abb. 8). Alle Kontrollen und nachzuweisenden Pathogene zeigen Kontrastwerte deutlich oberhalb der LOD. Bei den Nachweisen von *Reovirus* und *Listeria monocytogenes* sind die Kontrastwerte an den Positionen der übrigen pathogenspezifischen Sonden wie zuvor auch bei dem Nachweis von *IBDV* nahe an der LOD. Vermutlich kommt es auch hier zu einer geringen Eigenfluoreszenz durch Salzablagerungen an den Sondenpositionen. Das schwache positive Signal von *Salmonella typhimurium* bei dem Nachweis von *Listeria monocytogenes* ließ sich auf Verunreinigungen an den entsprechenden Sondenpositionen zurückführen. Die Signalintensitäten lagen bei qualitativer Bewertung weit unterhalb der Werte, die für *Listeria* und die Kontrollen gemessen wurden.

4.1.3.2 Pathogennachweis nach Multiplex-PCR

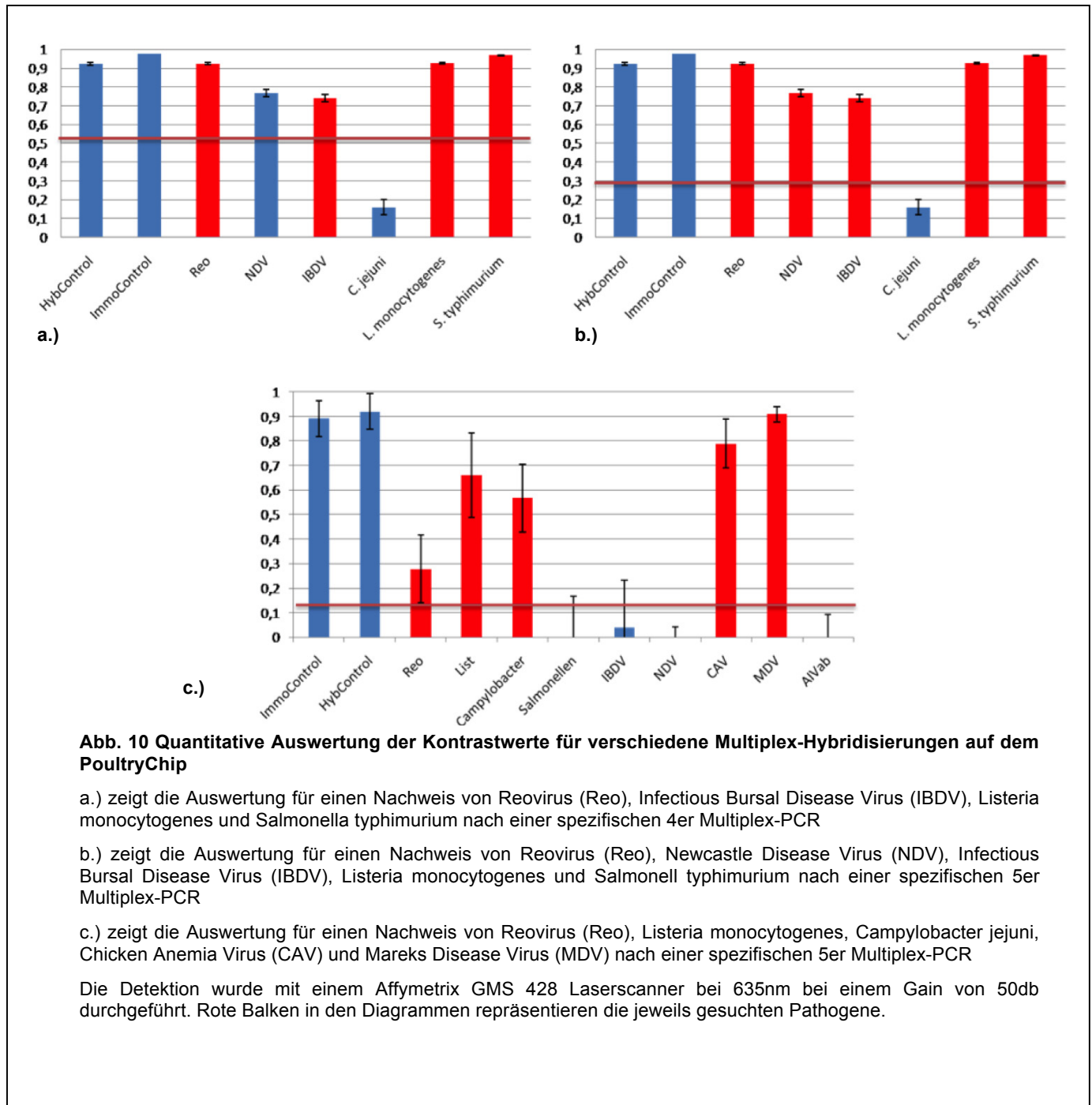


Die Abb. 9 zeigt den Nachweis von den vier Geflügelpathogenen *Reovirus*, *Salmonella typhimurium*, *Chicken Anemia Virus* und *Listeria monocytogenes*. Die aus einer Multiplex-PCR stammenden Amplifikate wurden auf dem PoultryChip in einer Hybridisierung spezifisch nachgewiesen. Die Signale der nachzuweisenden Pathogene liegen deutlich über der berechneten Detektionsgrenze. Ebenfalls deutlich erkennbar ist die geringere Standardabweichung bei spezifisch nachgewiesenen Pathogenen im Vergleich zu den ermittelten Standardabweichungen der Signale an unspezifischen Sonden. Die

Kontrastwerte, die an den Immobilisierungs- und Hybridisierungskontrollen ermittelt wurden liegen ebenfalls über der ermittelten LOD. Bei der Betrachtung ist allerdings zu beachten, dass die Kontrollen in einer 1:2 Verdünnungsreihe gespottet wurden. Dementsprechend nehmen die Kontrastwerte mit zunehmender Verdünnungsstufe ab. Da für die Berechnung des Kontrastwertes ein Mittelwert aller Kontrollen genommen wurde, kommt es zu hohen Schwankungen zwischen den betrachteten Werten und somit ergibt sich die hohe Standardabweichung für die Kontrollen.

Anhand der qualitativen Bildanalyse lassen sich an den Sondenpositionen der gesuchten Pathogene jeweils deutliche Signale beobachten. Dass weitere schwache Signale an den übrigen Sondenpositionen zu sehen sind, kann auf Salzablagerungen zurückgeführt werden, die von dem Spottingpuffer stammen. Die Integration der Immobilisierungs- und Hybridisierungskontrolle in einer 1:2 Verdünnungsreihe in das Chiplayout, um eine schnelle semiquantitative Aussage über die Signalintensität zu führen, zeigt in dem Ergebnis in Abb. 9 deutlich Schwächen, da auf Grund von Spotinhomogenitäten ein klare Aussage nur schwer möglich ist.

Nachfolgend werden beispielhaft weitere quantitative Auswertungen anderer Multiplex-Versuche gezeigt (Abb. 10)



Die Ergebnisse zeigen, dass Multiplex-PCRs für den Nachweis spezifischer Zielsequenzen aus einem DNA-Gemisch von unterschiedlichen viralen und bakteriellen Erregern möglich ist. Die synthetisierten Amplikons sind geeignet, um einen positiven Multiparameternachweis von verschiedenen Pathogenen über die Hybridisierung auf einem Microarray zu erbringen. Die z.T. hohen Standardabweichungen sind auf Spotinhomogenität zurückzuführen, da die

zu dieser Zeit verwendeten Glassubstrate der Fa. Genetix hohen Qualitätsschwankungen unterworfen waren. Selbst innerhalb einer Chipcharge wurden Unterschiede hinsichtlich der Kopplungseffizienz an den aminosilanisierten Substraten beobachtet.

4.1.4 Abschließende Bewertung der Ergebnisse

In der Lebensmittelkontrolle wird vorzugsweise die PCR in Kombination mit klassischen Blot-Verfahren (Southern-Blot) für den Nachweis pathogener Kontaminationen in Nahrungsmitteln verwendet. Diese Verfahren sind zumeist sehr arbeitsintensiv und benötigen daher viel Zeit. Es besteht also Bedarf an schnellen, unkomplizierten und spezifischen Nachweismethoden. Für die Diagnostik von Geflügelpathogenen werden bisher vorzugsweise PCR-ELISAs oder Realtime-PCR-Verfahren als kostengünstige und schnelle Nachweise angeboten. Microarrays stellen auf Grund ihres Miniaturisierungs- und Parallelisierungspotential eine Option zu den bestehenden Verfahren dar.

4.1.4.1 PCR-Verfahren

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die entwickelten PCR-Verfahren in der Lage sind, die gesuchten Pathogene spezifisch aus isolierter Gesamt-DNA nachzuweisen. Die Nachweisbarkeit ist allerdings auch stark abhängig von den benötigten DNA-Isolierungsverfahren. Diese müssen in der Lage sein, genomische DNA bzw. virale RNA aus unterschiedlichen Matrices, wie Blut, Kot, Fleischprodukten, Eiern u.ä., in ausreichender Menge und Qualität für weitere „Downstream-Verfahren“ zu isolieren. Die Fa. Congen stellte das in dieser Arbeit verwendete DNA bzw. cDNA-Material zur Verfügung. Die isolierten DNAs konnten mit Ausnahme des *Avian Infectious Bronchitis Virus* für alle PCR-Verfahren erfolgreich eingesetzt werden. Durch die Schwierigkeiten bei der Isolation und reversen Transkription, wurde auf Grund der geringen Ausbeuten an cDNA, der *Avian Infectious Bronchitis Virus* für die Versuche aus dem nachzuweisenden Erregerspektrum herausgenommen.

In den PCRs wurden jeweils 50ng der jeweiligen Referenz-DNA eingesetzt. Für die Amplifikation wurden verschiedene Polymerase getestet. Zum Einsatz kamen dabei zwei Hot-Start-Polymerasen verschiedener Hersteller, wie die Platinum Taq und die Titanium Taq sowie eine konventionelle Taq-Polymerase, die Biotaq. Die nachfolgende Tabelle fasst die Eignung der getesteten Polymerasen für den Nachweis der gesuchten Pathogene im Überblick zusammen.

Tabelle 4 Eignung verschiedener Polymerasen für die Singleplex- und Multiplex-PCR zum Nachweis von Geflügelpathogenen

Polymerase	Singleplex	Multiplex	Hot-Start	Preis
Platinum Taq	+++	+++	Ja	++
Biotaq	++	++	Nein	+++
Titanium Taq	+++	+++	Ja	+

Die Bewertung erfolgt auf Grundlage der Detektierbarkeit der Zielsequenzen, der Bandenintensität im Agarosegel, sowie den Preisangaben des Herstellers
 +++ sehr gut, ++ gut, + ausreichend

Generell konnten mit allen getesteten Polymerasen gute bis sehr gute Ergebnisse in den Einzelnachweisen erzielt werden. In der Multiplex-PCR hingegen zeigten die beiden Hot-Start Polymerasen weniger unspezifische Produkte als die konventionelle Taq-Polymerase. Grund hierfür ist ein Antikörper, der die Polymeraseaktivität hemmt und somit verhindert, dass unspezifische Amplifikationsprodukte in der Aufheizphase vor dem ersten PCR-Zyklus entstehen. Der Antikörper wird in einem Prä-Denaturierungsschritt von der Polymerase entfernt. Nach dieser Aktivierung kann die Taq-Polymerase mit der Synthese der PCR-Produkte beginnen.

Die Ergebnisse der Multiplex-PCRs haben gezeigt, dass alle fünf im Erregerspektrum verbliebenen Viren in einem 5er Multiplex-PCR Nachweis zusammengefasst werden konnten. Die bakteriellen Erreger wurden bereits in einer früheren Arbeit in einer 3er Multiplex-PCR zusammengefasst [126]. Eine Integration beider Multiplex-Systeme in einem 8er Multiplex-PCR-System ist allerdings nicht gelungen. Versuche hierzu zeigten regelmäßig unspezifische Produkte oder Ausfälle eines oder mehrerer Produkte, obgleich in parallelen Einzel-PCR-Ansätzen das Produkt nachweisbar war. Auch eine Optimierung der $MgCl_2$ -Konzentration oder der Primerverhältnisse zeigte keine Verbesserung. Die entsprechenden Pathogene wurden daher in den verschiedenen Multiplexsystemen amplifiziert und für den Nachweis auf dem Microarray als DNA-Gemisch aufgebracht. Für das finale Multiplex-PCR Protokoll wurde die Titanium Taq gewählt, da sie gleichzeitig im zweiten Teil der Arbeit für den Nachweis von allergen wirkenden Spezies in einer OnChip-Amplifikation verwendet wurde und dort sehr gute Ergebnisse zeigte. Anhand der Ergebnisse für den PoultryChip ist die Platinum Taq aber gleichermaßen gut geeignet. Die $MgCl_2$ -Konzentration wurde in der Multiplex-PCR im Vergleich zu den Singleplex-PCRs von 3,5mM auf 6mM erhöht. Dies geschah in Anlehnung an eine Publikation von Henegariu et al., die sehr ausführlich die Optimierung von Multiplex-PCR Parametern beschreibt und einen Leitfaden für die Entwicklung von Multiplex-PCRs darstellt [127]. In seiner Publikation testeten Hengariu et al.

den Einfluss verschiedener $MgCl_2$ -Konzentrationen auf eine Multiplex-PCR mit sieben verschiedenen Zielsequenzen. Für die Multiplex-PCR wurden Konzentrationen von 1,5 – 10,8mM $MgCl_2$ getestet. Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender Konzentration die Bildung unspezifischer Banden abnimmt. Allerdings wurde ebenso festgestellt, dass Produkte aus Multiplex-PCRs mit >10,8mM deutlich an Intensität in der Gelanalyse verloren. Die Autoren gehen davon aus, dass zu hohe $MgCl_2$ -Konzentrationen die Polymeraseaktivität inhibieren können. Ferner fanden die Autoren, dass, um ein optimales Verhältnis zwischen $MgCl_2$ und dNTP in der Multiplex-PCR zu erhalten, eine Erhöhung auf bis zu 0,8mM bei einer eingesetzten Konzentration von 6-7mM $MgCl_2$ zu empfehlen ist.

Von diesen Ergebnissen ausgehend wurden in der Multiplex-PCR final 0,8mM dNTP und 6mM $MgCl_2$ eingesetzt. Diese Kombination stellte den Kompromiss zwischen Amplifikationseffizienz und Spezifität dar. Eine Optimierung der Primerverhältnisse wurde in diesem Teil der Arbeit nicht durchgeführt, war aber Gegenstand innerhalb der Entwicklungsarbeiten zum AllergenChip. Für die Multiplex-PCR-Versuche wurde die Konzentration der Titanium Taq Polymerase auf 2U/35 μ l erhöht, um die Amplifikation aller Amplifikate zu gewährleisten. Auch dies deckt sich mit den von Henegariu et al. beschriebenen Ergebnissen, die zeigten, dass 1-2U Enzym ideal für den Einsatz in der Multiplex-PCR sind. Eine zu hohe Konzentration an Taq-Polymerase hingegen führt zu einer Erhöhung von unspezifischen Hintergrundamplifikaten, eine zu niedrige Konzentration zu einem Verlust von Amplifikaten.

4.1.4.2 Hybridisierung

Die Hybridisierung der PCR-Produkte aus Einzel- oder Multiplex-PCRs zeigte, dass sowohl einzelne Pathogene als auch bis zu fünf Pathogene aus einer Multiplex-PCR bzw. einem Gemisch aus verschiedenen Multiplex-Ansätzen spezifisch mit Hilfe des entwickelten Microarrays nachgewiesen werden konnten.

Das Chiplayout umfasste in der ersten Version neben Sonden für die drei bakteriellen Pathogene die der drei RNA Viren. Es handelt sich hierbei um ein 6x4 Array, welches mit dem TopSpot gespottet wurde. Alle Sonden wurden in Triplikaten gespottet. Als Kontrollen wurden jeweils Immobilisierungskontrollen, Hybridisierungskontrollen und Negativkontrollen in Duplikaten in das Layout integriert. Die in dem Chiplayout verwendeten Sonden und die Hybridisierungskontrollen wurden in einer Konzentration von 25 μ M gespottet, die Immobilisierungskontrolle in einer Konzentration von 10 μ M. Als Negativkontrolle dient der Spottingpuffer, in dem die zu immobilisierenden Oligonukleotide gelöst sind. Hierzu wurde ein Methylimidazolpuffer (pH7) mit 25% DMSO und EDC (5mg/ml) verwendet.

Das finale PoultryChip-Layout umfasst Sonden für die viralen und bakteriellen Pathogene *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Infectious Bursal*

Disease Virus, Avian Infectious Bronchitis Virus, Reovirus, Newcastle Disease Virus, Mareks Disease Virus und *Chicken Anemia Virus*. Das Chiplayout wurde auf Grund der höheren Sondenanzahl zu einem 8x8 Array erweitert. Diese Arraygröße ließ sich mit den zu dieser Zeit verfügbaren Druckköpfen nicht mehr mit dem TopSpot realisieren. Es wurde daher mit dem SciFlex-Arrayer der Fa. Scienion gearbeitet. Der SciFlex-Arrayer arbeitet mit Piezotechnik, bringt das Immobilisat also ohne direkten Kontakt zur Substratoberfläche auf den Chip.

Als Substrat dienten aminosilanisierte Genetix Glaschips. Die Genetix Substrate zeigten die zu erwartenden Ergebnisse, allerdings war die Spotmorphologie nicht allen Fällen homogen. Donuteffekte, Verlaufen der Spots oder zu großer Spottedurchmesser traten auf, da es häufig Problemen mit der Qualität der Genetix Chips gab. Durch Kontaktwinkelmessungen wurde festgestellt, dass die Glassubstrate inhomogene Oberflächen aufwiesen. Zeitweise wurden deshalb aminosilanisierte Substrate der Fa. Schott (Nexterion Slides A) verwendet. Zwar zeigten diese Substrate eine bessere Spotmorphologie, aber im Gegenzug wesentlich geringere und z.T. falschpositive Signale. Die bei den späteren Arbeiten zum AllergenChip eingesetzten qualitativ hochwertigeren, epoxysilanisierten Glassubstrate waren zum Zeitpunkt der Arbeiten zum PoultryChip noch nicht kommerziell erhältlich. Dies zeigt eines der generellen Probleme, die zu einer Verzögerung bei der Etablierung der Microarray-Technologie in den letzten Jahren geführt haben. Über lange Zeit gestaltete sich die Verfügbarkeit oberflächenmodifizierter Microarraysubstrate mit gleichbleibender Qualität als große Herausforderung. Mit der Qualität des Trägersubstrates und dessen funktionalisierter Oberfläche wird die Basis für die spätere Multiparameteranalytik gelegt. Treten hier bereits Qualitätsschwankungen auf, wird eine sinnvolle Assayentwicklung oder –übersetzung in das Microarray-Format stark erschwert. Ziel dieser Teilarbeit war es daher zunächst anhand des Anwendungsbeispiels die generelle Eignung der Microarray-Technologie für die Multiparameteranalyse von verschiedenen Geflügelpathogenen zu demonstrieren.

Der Nachweis mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Microarrays benötigt inklusive Amplifikation und anschließender Hybridisierung 6h, sofern die DNA der zu untersuchenden Probe bereits vorliegt. Gegebenenfalls benötigte Voranreicherungsverfahren sind demnach weiterhin notwendig. Gegenüber konventionellen mikrobiologischen Verfahren, die in der Regel 2-3 Tage dauern, bis ein positives Ergebnis ausgewertet werden kann, sind Microarrays in Kombination mit leistungsfähigen DNA-Isolationsverfahren und sensitiven PCR- bzw. Multiplex-PCR-Verfahren ein geeignetes Schnellnachweissystem für die Diagnostik von Pathogenen.

4.2 AllergenChip

In dem ersten Teil der Arbeit wurde die generelle Eignung der Microarray-Technologie für die Multiparameteranalyse von Nukleinsäuren am Beispiel des spezifischen Nachweises von bis zu acht verschiedenen Pathogenen gezeigt. Auf die gewonnenen Erkenntnisse aufbauend galt es in diesem Teil der Arbeit, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Indikation von allergenen Spezies in Lebensmitteln durch den Nachweis von DNA-Spuren der verursachenden Spezies geführt wird. Für die Multiparameteranalytik wurden PCR-Verfahren entwickelt, die sowohl als Vorstufe für Hybridisierungsversuche als auch für die Multiplex-OnChip-Amplifikation geeignet sind. Dabei ging es zu Beginn der Arbeiten um den simultanen Nachweis von Spuren von Mandel, Soja, Haselnuss und Erdnuss in Nahrungsmitteln. Im späteren Verlauf der Arbeit wurden die PCR-Verfahren erweitert, um eine möglichst hohe Anzahl relevanter Allergene in Lebensmitteln parallel nachweisen zu können. Die Allergene wurden gemäß der Relevanz in der Lebensmittelanalytik ausgewählt und stellen die sogenannten „Big 8“ dar, also die Allergene, die bis zu 90% aller lebensmittelallergischen Reaktionen auslösen. Dazu gehören neben den bereits genannten vier Allergenen noch Sellerie, Sesam, Senf, Walnuss, Gluten und Fisch, so dass insgesamt 10 verschiedene Allergene mit dem finalen Chip nachgewiesen werden können. Zu beachten ist dabei, dass zu den „Big 8“ allgemein Schalenfrüchte gezählt werden. Für den AllergenChip wurden verschiedene Schalenfrüchte (Haselnuss, Mandel, Walnuss) ausgewählt, so dass nicht acht sondern zehn Allergene in die Auswahl genommen wurden.

4.2.1 Singleplex- und Multiplex PCR

Zu Beginn wurden für den Nachweis von lebensmittelallergener DNA vorerst Haselnuss, Erdnuss, Mandel und Soja als Zielspezies ausgewählt. Nach Etablierung der Verfahren für diese vier Allergene wurde das Nachweisspektrum um sechs zusätzliche Allergene erweitert.

Die Sequenzen der Primer wurden dabei besonders unter Beachtung der Multiplex-PCR, die den Prozess der Analyse auf im Idealfall in einem PCR-Schritt zusammenfassen soll, ausgewählt.

Die DNA-Proben wurden von der Fa. Congen (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt oder z.T. mit Hilfe des SureFood PREP Allergen-Kits eigenständig aus verschiedenen Lebensmittelmatrizes isoliert. Die DNA-Proben wurden zunächst Singleplex- und später Duplex- und Multiplex-PCRs etabliert.

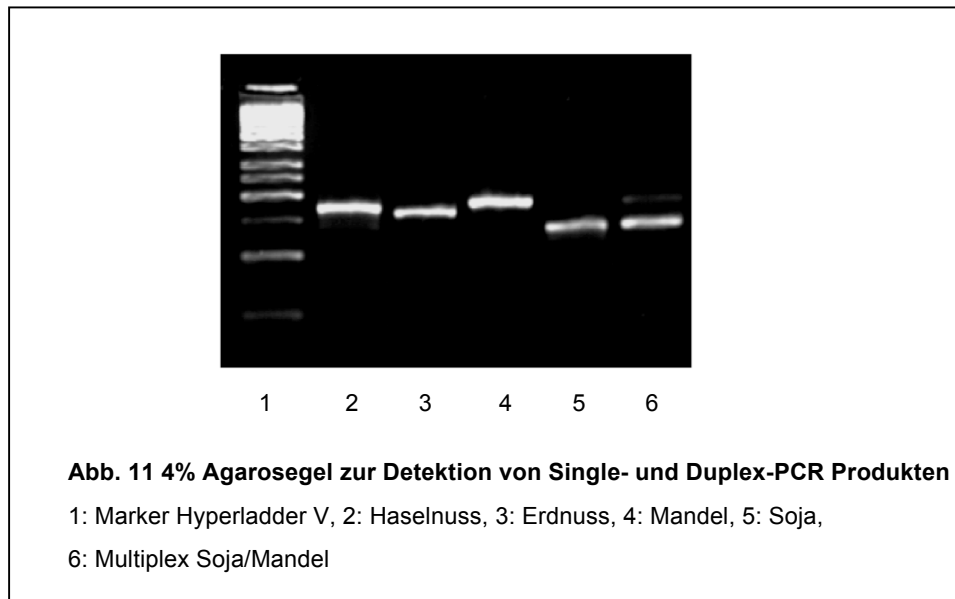
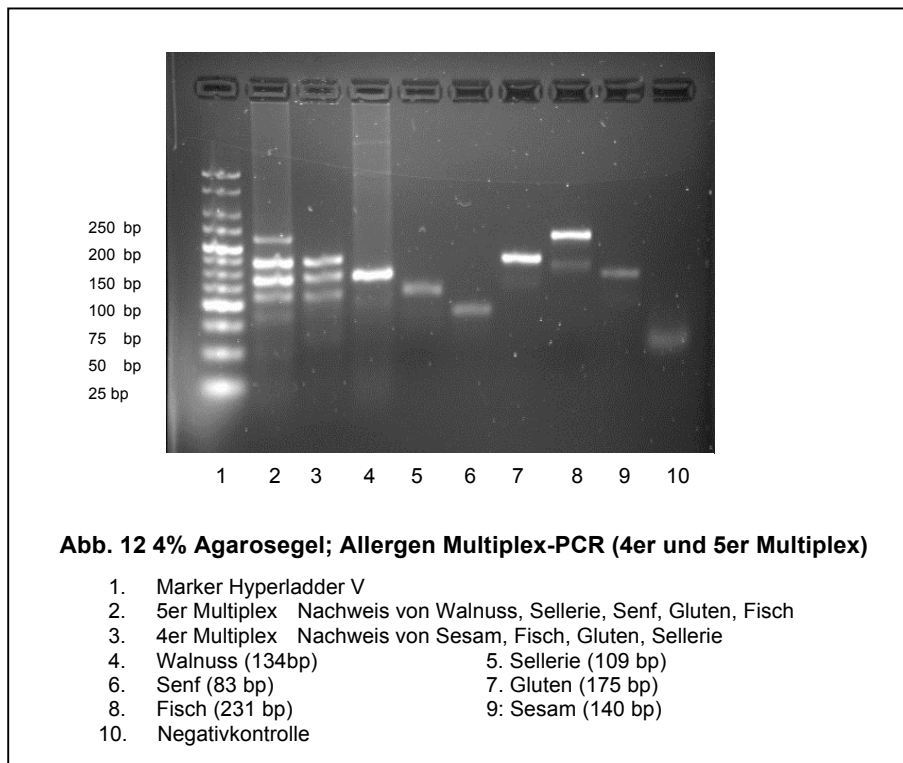


Abb. 11 zeigt die erfolgreiche Amplifikation für die Spezies Haselnuss, Erdnuss, Soja und Mandel (Produkte 2-5). Die erfolgreiche parallele Amplifikation von Mandel- und Soja-DNA ist hier ebenfalls dargestellt (Produkt 6). Es wird aber deutlich, dass die Bedingungen während der PCR eine unterschiedlich starke Amplifikation der beiden Spezies hervorbringt.

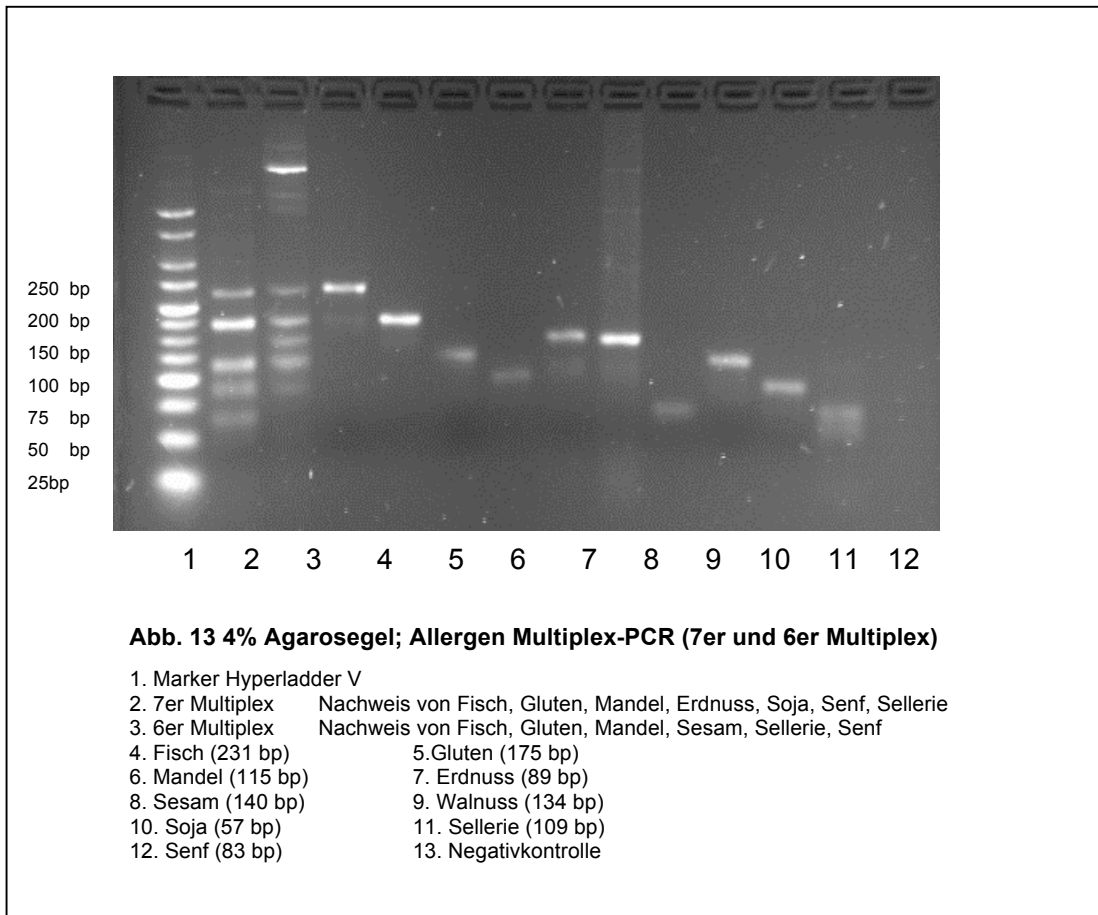
Die unterschiedliche Amplifikationseffizienz der einzelnen PCR-Systeme ist zu Beginn der Arbeit mit Hilfe der Realtime-PCR für die oben gezeigten Allergene optimiert worden. Die Ergebnisse hierzu sind in den folgenden Kapiteln 4.2.2 bis 4.2.4 dargestellt.

Durch die ähnliche Länge der PCR-Produkte, wird die Gelauswertung bei Multiplex-PCRs auf Grund der Auflösungsgrenze von 5-10bp erschwert. Die orts aufgelöste Detektion eines Microarrays würde dabei den Vorteil bieten, dass ein eingeschränktes Auflösungsvermögen wie es bei Agarose- oder auch Polyacrylamidgelen vorkommt, die parallele Analyse nicht einschränkt. Dies würde ermöglichen, die Multiplex-PCR besser zu nutzen. Dies wird offensichtlicher je mehr verschiedene Targetsequenzen nachgewiesen werden sollen. Ein einheitliches Design von Produktlängen kann es zusätzlich ermöglichen, die Amplifikation näherungsweise gleich effizient für alle Zielsequenzen durchzuführen.

Nachfolgend wird dies auch bei den Ergebnissen einer Multiplex-PCR mit vier, fünf (s. Abb. 12) und sechs bzw. sieben (s. Abb. 13) verschiedenen DNAs allergener Lebensmittelinhaltsstoffe deutlich, wo eine Differenzierung der verschiedenen Targets durch die ähnlichen Produktgrößen erschwert wird. Die in Abb. 12 und 13 gezeigten Multiplex-PCRs wurden durchgeführt, nachdem bereits erfolgreich Versuche mit Haselnuss-, Erdnuss- Soja- und Mandel-DNA etabliert werden konnten. Der in Abb. 12 gezeigte Nachweis zeigt Einzel- und Multiplex-PCRs zum Nachweis der lebensmittelallergenen Spezies Walnuss, Sesam, Senf, Sellerie, Gluten und Fisch.



Die Singleplex-PCRs konnten erfolgreich durchgeführt werden. Alle der nachzuweisenden DNAs allergener Lebensmittelinhaltsstoffe sind gemäß ihrer Produktgröße im Agarosegel zu detektieren. Gleiches gilt für die 5er Multiplex-PCR. Bei der 4er Multiplex PCR konnte kein Amplifikat für die Fisch-DNA detektiert werden. Mögliche Ursache kann ein Pipettierfehler sein oder eine zu geringe Primerkonzentration sein. Alle übrigen Allergen-DNAs wurden wie erwartet amplifiziert. Die Negativkontrolle zeigt nur eine schwache Primer-Dimer Bande. Für die Amplifikation wurde DNA-Material eingesetzt, welches aus unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes gewonnen wurde, in denen Verunreinigungen im Bereich von >100ppm vorlagen. Die Multiplex-Amplifikation wurde mit 2U Titanium Taq-Polymerase durchgeführt. Dies entspricht der doppelten Enzymkonzentration gegenüber den Reaktionsansätzen für Einzelnachweise.



Die Multiplex-PCR zum Nachweis von sechs bzw. sieben verschiedenen DNAs allergener Spezies verlief erfolgreich. Auch alle Singleplex-PCRs waren erfolgreich. Die Amplifikate sind im Gel bei der erwarteten Produktgröße detektierbar. Die Negativkontrolle ist bis auf die Primer-Dimer Bildung negativ.

Bei der 7er Multiplex-PCR sind nur fünf Banden zu erkennen, da die Amplifikate für Mandel und Sellerie bzw. Erdnuss und Senf sich nur um 6bp in ihrer Produktgröße unterscheiden. Dieser geringe Unterschied war im Agarosegel nicht mehr aufzulösen, kann aber bei der Hybridisierung auf dem AllergenChip korrekt nachgewiesen werden, wie die Ergebnisse in Kapitel 4.2.5 zeigen. Gleiches gilt auch für die 6er Multiplex-PCR, in der unter anderem ebenfalls Mandel- und Sellerie-DNA parallel nachgewiesen wurden. Auch hier konnten alle Produkte auf dem AllergenChip nach einer Hybridisierung korrekt nachgewiesen werden. Ungeklärt ist allerdings die Amplifikation des unspezifischen PCR-Produkts oberhalb 500 bp. Eventuell ist dies auf die hohe $MgCl_2$ - und Polymerasen-Konzentration zurückzuführen, die bei diesen Versuchen bei 7mM $MgCl_2$ und 2U Titanium Taq/35 μ l PCR-Ansatz lagen. Die Bildung unspezifischer Amplifikate stellt allerdings kein Problem für die Hybridisierung auf dem Chip dar, da hier nur spezifische PCR-Produkte an den immobilisierten Sonden gebunden werden.

4.2.2 Singleplex-PCR am Lightcycler

Zur Überprüfung der unteren Nachweisgrenze der entwickelten PCR-Verfahren wurden im Lightcycler eine dekadische Verdünnungsreihen der DNA verschiedener Lebensmittelallergene gemessen. Für die Realtime-PCR wurde das Faststart SybrGreen Master Kit der Fa. Roche verwendet. Die Detektion erfolgt über den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen I ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 \text{ nm}$), der sich spezifisch in der großen Furche eines DNA-Doppelstranges anlagert. Nachfolgend wird exemplarisch das Ergebnis für eine dekadische Verdünnungsreihe von Mandel-DNA gezeigt.

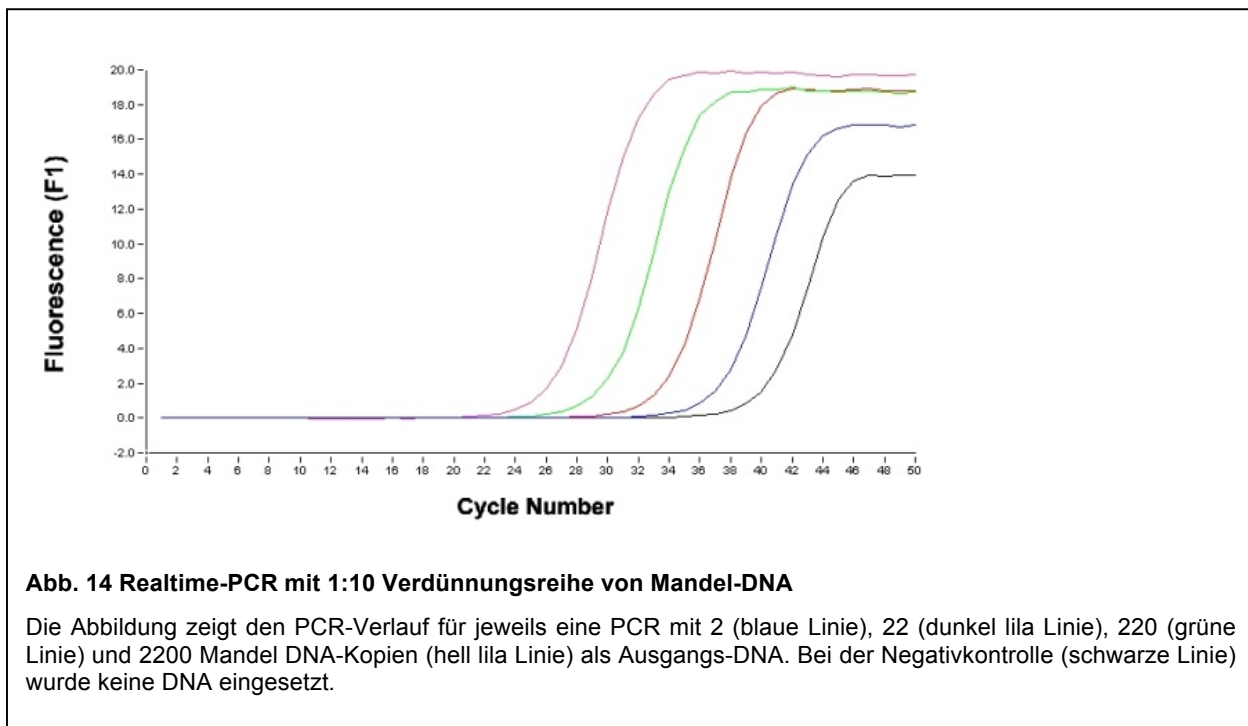
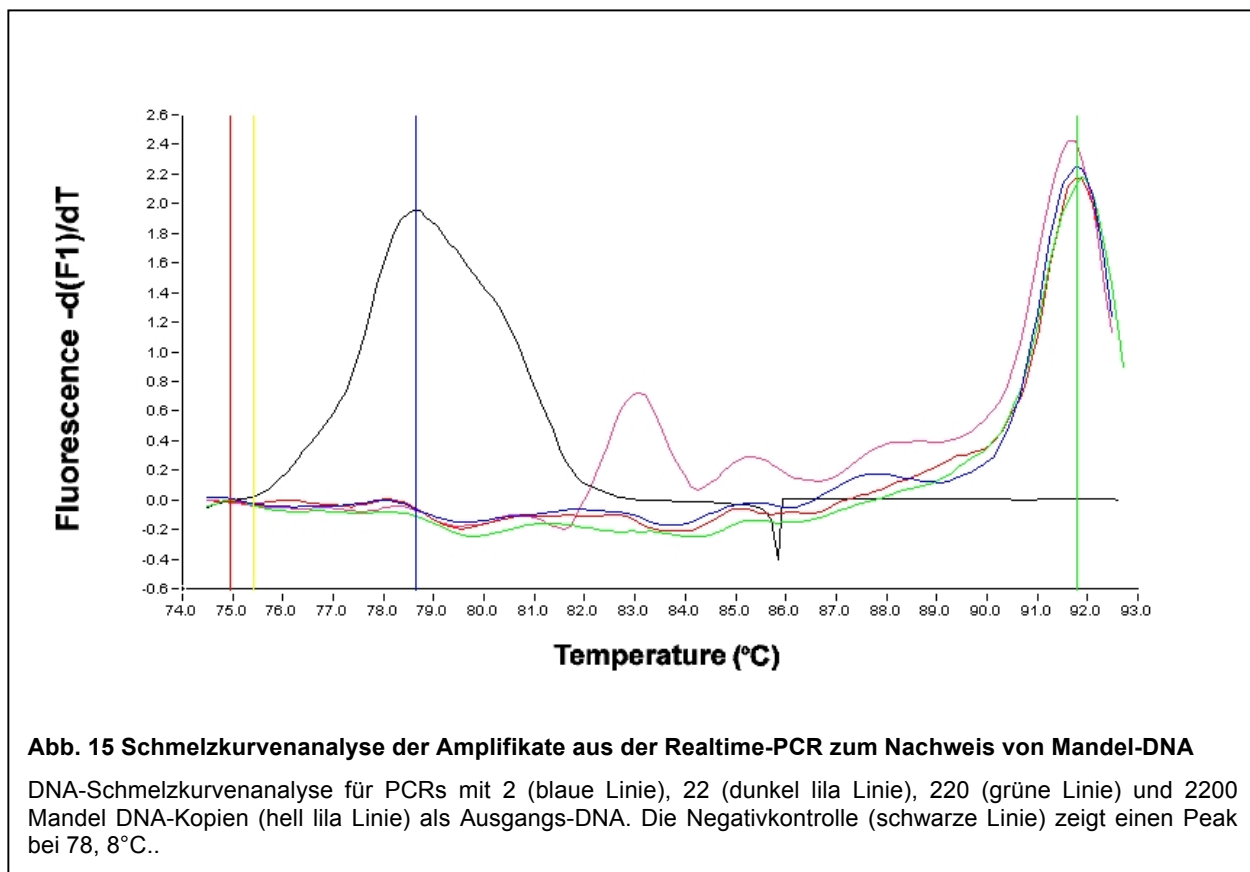


Abb. 14 verdeutlicht, wie sich die unterschiedlichen Ausgangsmengen von DNA auf den Verlauf einer PCR auswirken. Die einzelnen Verdünnungsstufen von 2 bis 2200 Kopien konnten erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei ist eine Verzögerung von ca. 3-4 Zyklen von einer Verdünnungsstufe zur nächst niedrigeren Verdünnungsstufe zu beobachten. Es konnten in der Realtime-PCR bis zu 2 Kopien der Mandel-DNA erfolgreich amplifiziert werden (blaue Linie, Ct 34).

Die Negativkontrolle verzeichnet ebenfalls ein Signal, wobei die Amplifikation mit dem 39. Zyklus erst sehr spät startet. Dafür sind zwei Erklärungen möglich, entweder wurde auf Grund einer Kontamination nur eine sehr geringe Menge Ausgangs-DNA amplifiziert oder es handelt sich um das Produkt einer unspezifischen Primer-Dimer Bildung. Für eine endgültige Aussage wurde eine Schmelzkurvenanalyse oder alternativ eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.



Das Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse in Abb.15 zeigt einen Schmelzpunkt der Negativkontrolle bei ca. 78,8°C, die Schmelzpunkte der PCR-Produkte der Mandel-DNA Verdünnungen liegen dagegen bei ca. 91,8°C. Die ermittelten Schmelzpunkte decken sich mit dem zuvor errechneten Schmelzpunkt für das Mandel-Amplifikat. Somit ist klar erkennbar, dass bei allen vier Verdünnungsansätzen spezifische Mandel-Amplifikate entstanden sind. Der Schmelzpunkt der Negativkontrolle bei 79°C lässt hingegen stark auf eine Primer-Dimer Bildung schließen.

Entsprechende Versuche wurden auch für die anderen zu untersuchenden Lebensmittelallergene durchgeführt. Auch hier konnte jeweils 2-5 Kopien Ausgangs-DNA erfolgreich nachgewiesen werden (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

4.2.3 Multiplex-PCR am Lightcycler

Ein Problem bei der Multiplex-PCR mit steigender Anzahl zu untersuchender Parameter ist die Konkurrenz zwischen den verschiedenen Amplifikationssystemen in einem Reaktionsansatz. Das bedeutet, dass Amplifikationssysteme für den Nachweis eines bestimmten Parameters effizienter arbeiten können, als die übrigen Amplifikationssysteme. Es können auch unterschiedliche Ausgangskonzentrationen an DNA-Matrizen in einem Reaktionsgemisch vorliegen, so dass ein bestimmtes Amplifikationssystem früher den Threshold Cycle (Ct-Wert) erreicht. Durch Veränderung der Primer- und der MgCl₂-Konzentration, sowie der Variierung der eingesetzten Menge an DNA-Polymerase kann die Effizienz der einzelnen Amplifikationssysteme in der Multiplex-PCR optimiert werden [2, 127]. Da in der Realtime-PCR die Zunahme an Amplifikaten mit einem Anstieg der Fluoreszenz korreliert, kann dies genutzt werden, um Rückschlüsse über die Effizienz eines Amplifikationssystems zu ziehen [128]. Für die Unterscheidung verschiedener Amplifikate in einer Realtime-Multiplex-PCR kann auch mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet werden. Dabei erhält jede Zielsequenz eine spezifische Fluoreszenzmarkierung, z.B. über den Einbau eines entsprechend markierten Primers. Allerdings werden für die Detektion auch dezidierte Detektionskanäle benötigt, um eine fehlerfreie Erkennung der Amplifikate zu gewährleisten. Bisher sind solche Realtime-Thermocycler nur mit einer beschränkten Anzahl an Detektionskanälen verfügbar, z.B. der Lightcycler 2.0 mit sechs Detektionskanälen. Durch die Beschränkung bei der Anzahl der Detektionskanäle ist gleichzeitig eine Limitierung der gleichzeitig nachweisbaren Zielsequenzen gegeben. Ein weiteres Problem stellen die partiell überlappenden Emissionsspektren der verwendeten Fluorophore dar. So ist die gemessene Signalintensität nicht ausschließlich durch die Fluoreszenz desjenigen Fluorophors bedingt, dessen Emissionsmaximum im Detektionsbereich des Kanals liegt, sondern möglicherweise auch durch die Emissionen anderer Fluorophore. Die Messung der Fluoreszenz eines Fluorophors in einem Kanal, dessen Detektionsbereich nicht das Emissionsmaximum des Fluorophors einschließt, wird als Übersprechen oder „*crosstalk*“ bezeichnet. Diesem Problem wird mit einer softwaregestützten Farbkompensation begegnet. Je mehr verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe dabei berücksichtigt werden müssen, desto aufwendiger und schwieriger gestaltet sich die Farbkompensation für den Realtime-Thermocycler.

Eine einfache Möglichkeit, eine Multiplex-PCR für den Nachweis von wenigen Zielsequenzen mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff durchzuführen, wird über die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht. Anhand der unterschiedlichen Schmelzpunkte können die einzelnen Amplifikate in dem Multiplex-Ansatz analysiert werden. Je nach Anzahl der nachzuweisenden

Zielsequenzen sind entsprechende Peaks in der Schmelzkurvenanalyse zu detektieren. Über die Peakhöhe, die den Abfall der Fluoreszenzintensität beim Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges angibt, kann auf die ursprüngliche Ausgangsfluoreszenz für das jeweilige Amplifikat geschlossen werden. Da das Fluoreszenzsignal mit der Amplifikatmenge korreliert, ist anhand der Peakhöhe zu erkennen, wie effizient eine bestimmte Ausgangs-DNA in der Multiplex-PCR amplifiziert wurde [128]. Zu beachten ist hierbei, dass sich die Schmelztemperaturen der zu analysierenden Amplifikate nicht überlagern dürfen, da sie andernfalls nicht bei der Analyse unterschieden werden können. Dieses Problem wird umso bedeutender, wenn in einer Multiplex-PCR vielen verschiedenen Zielsequenzen zu optimieren sind.

Nachfolgend werden einige der Ergebnisse gezeigt, die bei der Optimierung der Multiplex-PCR für die Bestimmung von bis zu vier verschiedenen Lebensmittelallergenen am Lightcycler erzielt wurden und die das zuvor beschriebene Vorgehen verdeutlichen.

Für die Optimierung der Multiplex-PCR am Lightcycler wurde mit dem FastStart-SybrGreen Kit von Roche gearbeitet. Zunächst wurden verschiedene Multiplex-Ansätze, also Duplex-, Triplex- und 4er Multiplex-Ansätze nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Sie dienen als Ausgangspunkt für die nachfolgenden Optimierungen.

In den Versuchen wurden Singleplex-Reaktion als Referenz mitgeführt, um die spezifischen Schmelztemperaturpeaks der jeweiligen Amplikons zu ermitteln. Zu den Singleplex-Ansätzen wurden zunächst exemplarisch ein Duplex- (Mandel/Erdnuss-DNA), ein Triplex- (Haselnuss/Mandel/Soja-DNA)- und ein 4er Multiplex-Ansatz (Haselnuss/Erdnuss/Mandel/Soja-DNA) amplifiziert. Für alle PCRs wurden 500 Kopien eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Ausgangs-DNA verwendet

In der nachfolgend durchgeführten Schmelzkurvenanalyse (s. Abb. 16) zeigte die Negativkontrolle einen spezifischen Peak bei ca. 78°C, das Amplifikat ist daher als Primer-Dimer zu identifizieren. Kontaminationen sind weitestgehend auszuschließen, da unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde. Bei der Erdnussprobe ist ebenfalls ein Peak bei ca. 84°C sichtbar, allerdings kann hier keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob der Peak spezifisch ist, da der quantitative Verlauf auf eine fehlerhafte PCR schließen lässt. Eindeutig lässt sich hingegen der spezifische Peak für die Mandel-Amplifikate identifizieren. Er deckt sich bei allen Ansätzen, in denen Mandel-DNA zu detektieren war, bei 91-92 °C. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Anzahl der zu detektierenden Allergene in dem PCR-Ansatz, die Effizienz, eine spezifische Zielsequenz zu amplifizieren, abnimmt. Betrachtet man die verschiedenen Multiplex-Ansätze, so lassen sich auch die Unterschiede in der Amplifikationseffizienz der verschiedenen Matrizen innerhalb eines Ansatzes erkennen. Dies

macht deutlich, dass bei einer Multiplex-PCR offensichtlich einzelne PCR-Systeme bevorzugt in der Reaktion ablaufen.

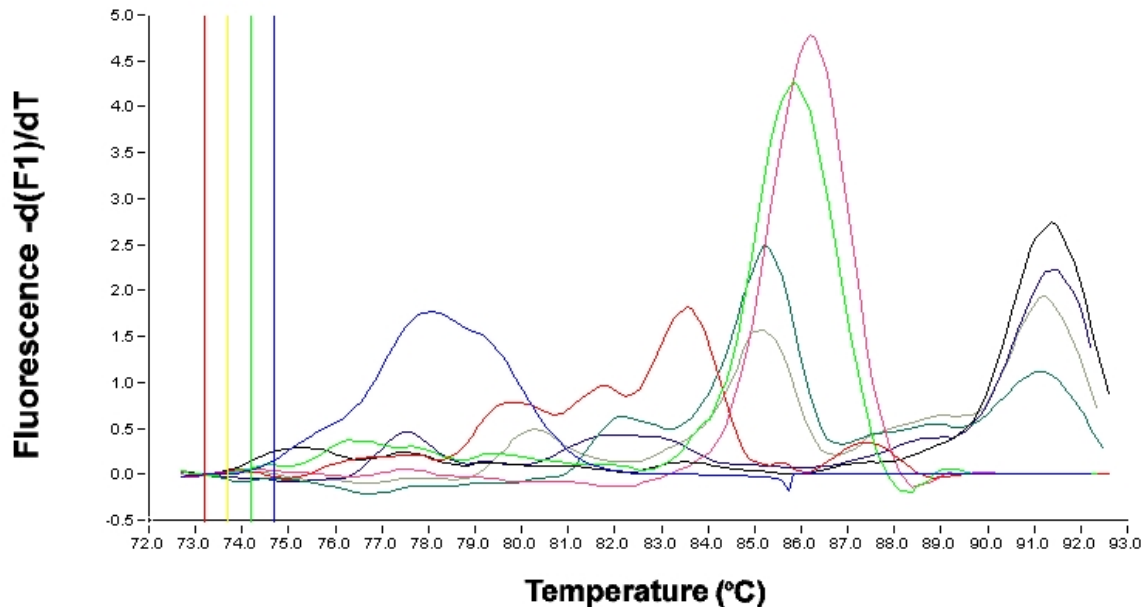


Abb. 16 Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte aus Einzel- und Multiplex-PCRs

Dargestellt ist die Schmelzkurvenanalyse für Negativkontrolle (blau) Haselnuss (grün), Erdnuss (braun), Mandel (schwarz) und Soja (lila) Amplifikate, sowie für eine Duplex-PCR (dunkelblau), eine Triplex-PCR (grau) und eine 4er Multiplex PCR (türkis).

Für Haselnuss- und Soja-Amplifikate unterscheiden sich die berechneten Schmelztemperaturen nur um 0,5 °C. Dieser geringe Unterschied in der Schmelztemperatur lässt somit keine Unterscheidung zwischen den beiden Allergenen in einem Multiplex Ansatz zu. In den nachfolgenden Versuchen wurden diese beiden Allergene daher nicht zusammen eingesetzt.

4.2.4 Optimierung bei Duplex- und Triplex-PCR-Ansätzen

In der Multiplex-PCR werden in einem Reaktionsansatz mehrere Zielsequenzen parallel amplifiziert. Da die verschiedenen PCR-Systeme in einem Multiplex-Ansatz zueinander in Konkurrenz stehen, ist es von Vorteil die jeweiligen Primerverhältnisse zu optimieren. Dominante PCR-Systeme können durch Einstellen einer geringeren Primerkonzentration in ihrer Effizienz vermindert und im umgekehrten Fall die Effizienz unterdrückter PCR-Systeme gesteigert werden. Für die Optimierung der Primerverhältnisse wurde zuerst mit Duplex-Ansätzen gearbeitet, um die Auswirkungen anhand eines weniger komplexen Systems zu beobachten. Danach wurden diese Ergebnisse verwendet, um auch Triplex-PCR Ansätze zu optimieren.

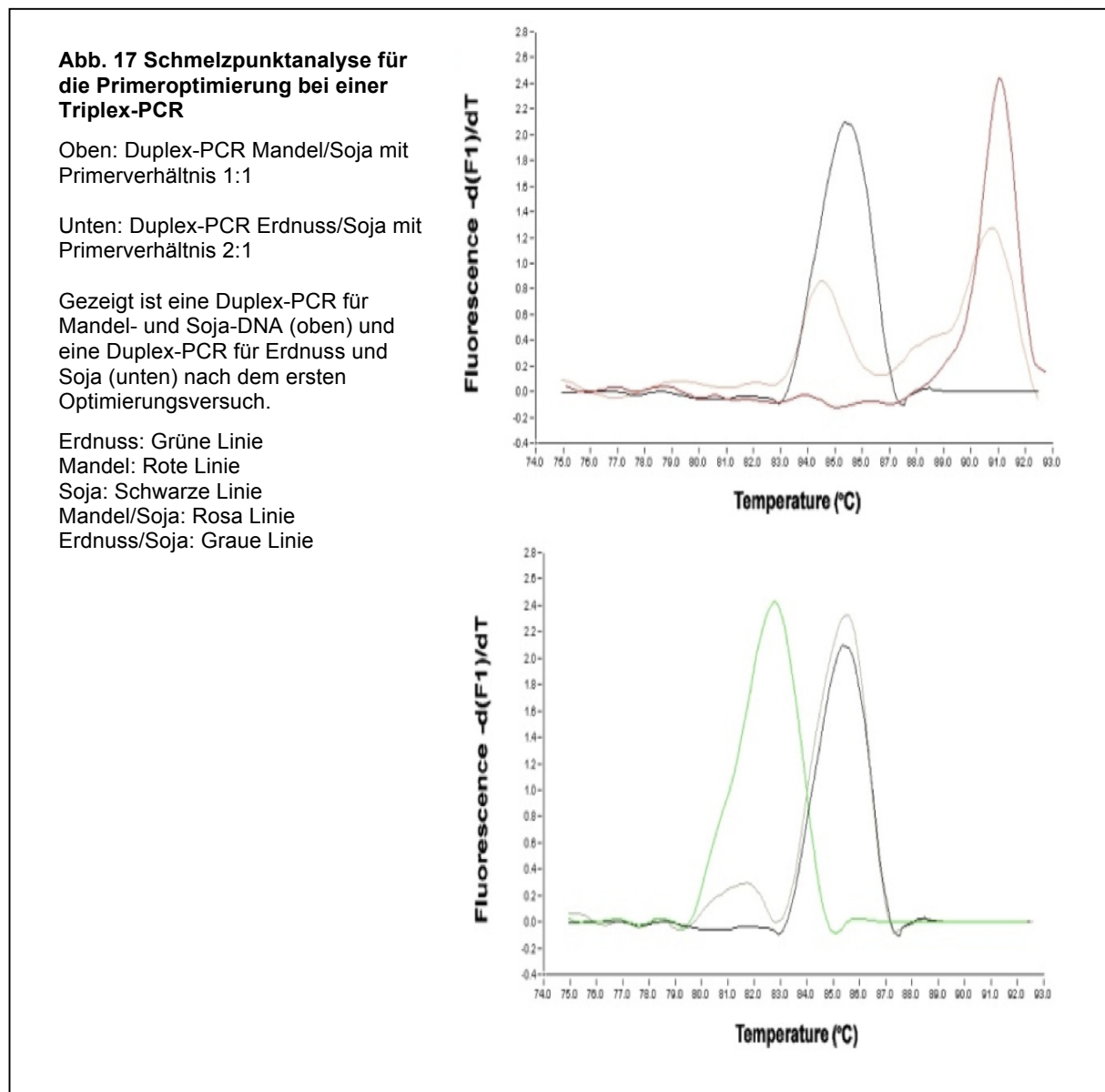


Abb. 17 zeigt exemplarisch die Herangehensweise für die Primeroptimierung der Multiplex-PCR. Zunächst wurden Duplex-PCRs in verschiedenen Allergen-Kombinationen durchgeführt. Anschließend wurden die Peakhöhen der spezifischen Schmelzkurven miteinander verglichen und entsprechend eine Annäherung der Primerverhältnisse durchgeführt. Von diesen Ergebnissen wurden die optimierten Primerverhältnisse für eine Triplex-PCR abgeleitet.

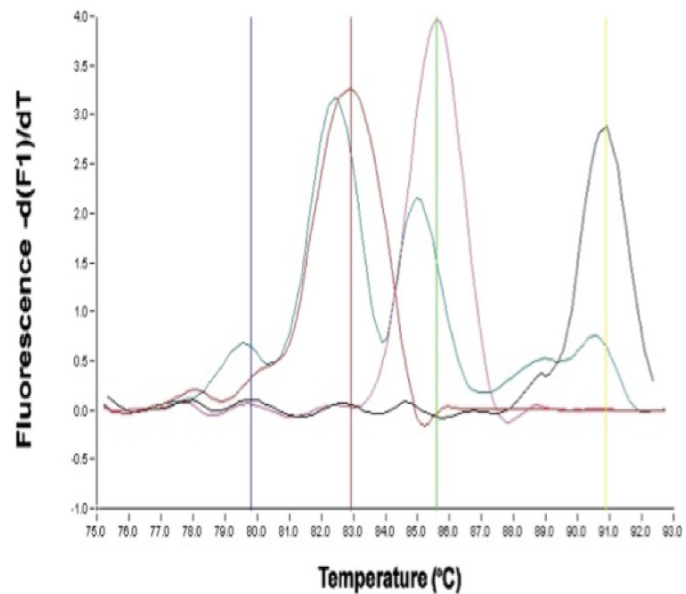
In der Duplex-PCR zum Nachweis von Mandel- und Soja-DNA wurden die Primersysteme im Verhältnis 1:1 eingesetzt (s. Abb. 17 oben). Die Schmelzkurvenanalyse zeigt, dass die spezifischen Peaks für Mandel- und Soja-Amplifikate annähernd auf gleicher Höhe liegen. Bei der Duplex-PCR zum Nachweis von Erdnuss- und Soja-DNA (s. Abb. 17 unten) wurden

die Primersysteme im Verhältnis 2:1 eingesetzt. In der Analyse ist der Peak für Soja-Amplifikate ca. 6-fach höher als für Erdnuss-Amplifikate. Dieses Ergebnis zeigt eine klare Dominanz des Soja-PCR-Systems gegenüber dem Erdnuss-PCR-System. Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen wurde für die Triplex-PCR als erster Optimierungsversuch eine Primerzusammensetzung von Erdnuss zu Mandel zu Soja von 6:1:1 gewählt.

**Abb. 18 Triplex PCR Erdnuss/Mandel/Soja
Primerverhältnis 6:1:1**

Gezeigt ist die final resultierende Triplex-PCR zum Nachweis von Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA mit dem Primerverhältnis 6:1:1.

Erdnuss:	Lila Linie
Mandel:	Schwarze Linie
Soja:	Rosa Linie
Erdnuss/Mandel/Soja:	Grüne Linie



Die Schmelzkurvenanalyse (s.Abb. 18) nach der Triplex-PCR zeigt, dass die zuvor dominanten PCR-Systeme für Mandel- und Soja-DNA (grüne Linie) in ihrer Effizienz gemindert und das PCR-System für Erdnuss-DNA verbessert werden konnten. Allerdings zeigte das PCR-System zur Amplifikation von Mandel-DNA im Vergleich zur Einzel-PCR eine starke Inhibition. Das für diesen Versuch gewählte Primerverhältnis von 6:1:1 ist somit nicht für eine gleich effiziente Amplifikation aller drei Zielsequenzen in einer Triplex-PCR geeignet. Weitere Optimierungen wurden daher nach dem oben beschriebenen Prinzip durchgeführt.

Nachfolgend werden die Versuche für den Einsatz der Primer in einer Multiplex-PCR gezeigt, die mit optimierten Primerverhältnissen durchgeführt wurde. Es wird aus Gründen der Übersicht nur ein Beispiel anhand dreier optimierter Duplex-PCRs und einer Triplex-PCR zum Nachweis von Haselnuss-, Erdnuss- und Mandel-DNA gezeigt (s. Abb. 19). Die Agarosegelanalyse des Multiplex-Versuches ist in Abb. 20 dargestellt.

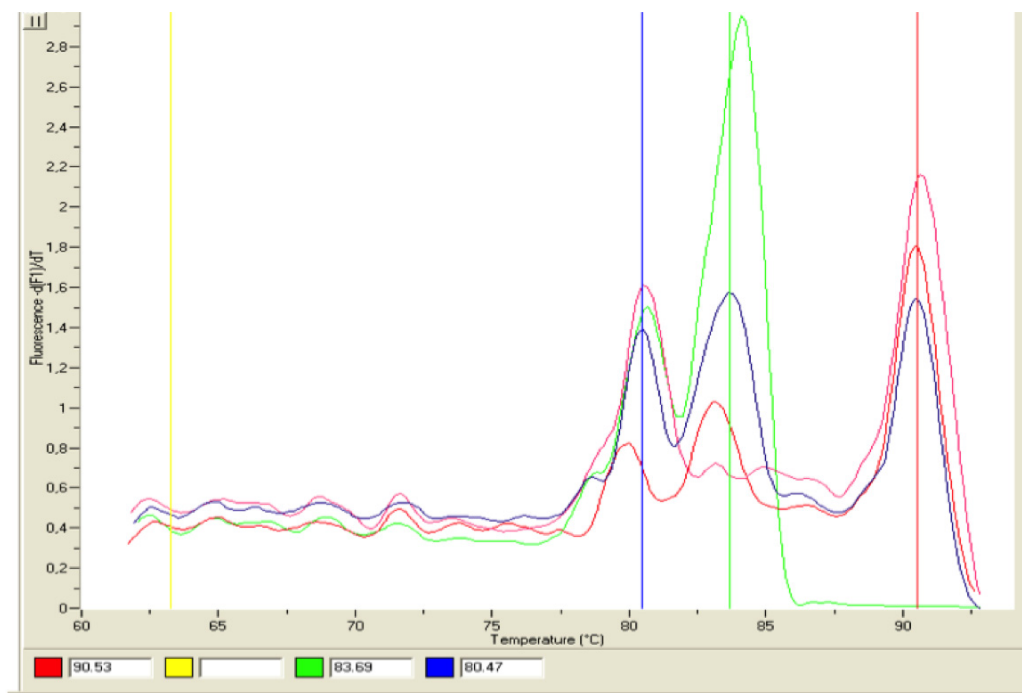


Abb. 19 Optimierte Duplex- und Triplex-PCRs mit Haselnuss-, Erdnuss- und Mandel-DNA

Grüne Linie: Duplex-PCR für Haselnuss- und Erdnuss-DNA
Primerverhältnis: 1:2

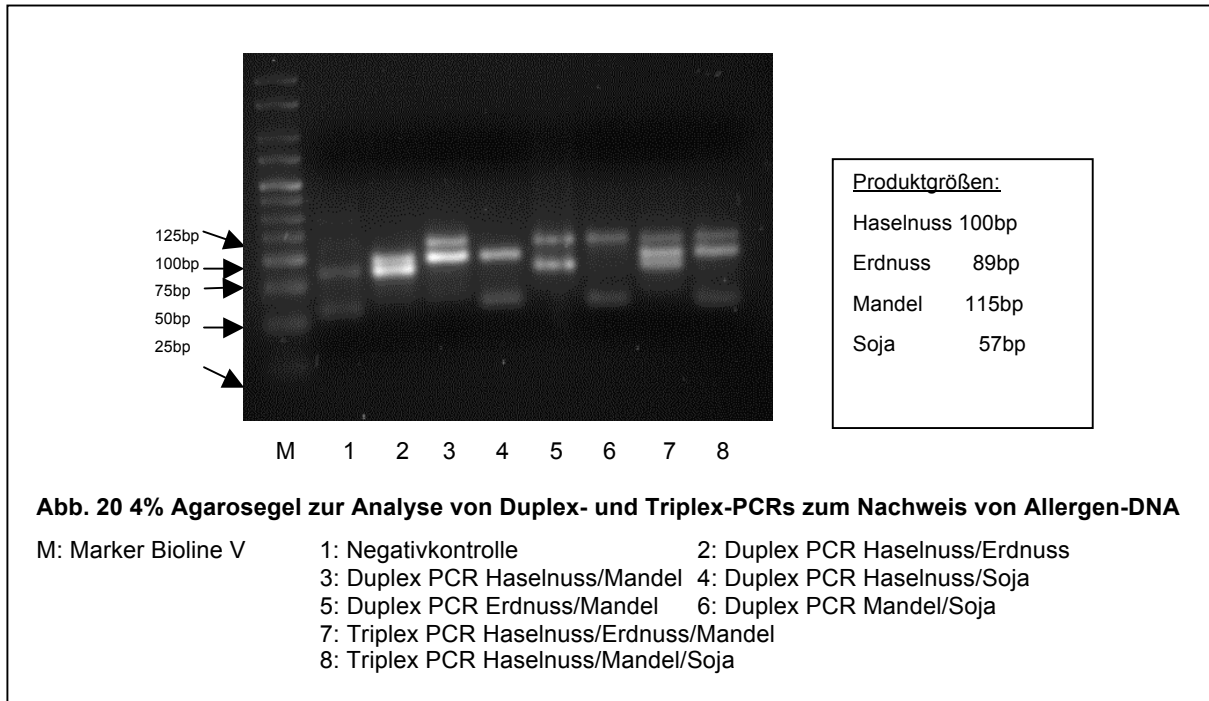
Rote Linie: Duplex-PCR für Haselnuss- u.
Mandel-DNA Primerverhältnis: 2:1

Rosa Linie: Duplex-PCR für Erdnuss- und Mandel-DNA
Primerverhältnis: 2:1

Blaue Linie: Triplex-PCR für Haselnuss-, Erdnuss-
u. Mandel-DNA Primerverhältnis: 2:2:1

Bei der in Abb. 19 dargestellten Schmelzkurvenanalyse ist eine Duplex-PCR für den Nachweis von Haselnuss- und Erdnuss-DNA (grün), eine Duplex-PCR für Haselnuss- und Mandel-DNA (Rot), eine Duplex-PCR für Erdnuss- und Mandel-DNA (Rosa) sowie eine Triplex-PCR für Haselnuss-, Erdnuss- und Mandel-DNA (Blau) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass in allen Ansätzen die zu detektierenden DNAs innerhalb ihrer T_m Bereiche einen scharfen Peak ausbilden, d.h. im Detail, Haselnuss bei 83-84°C, Erdnuss bei 80-81°C und Mandel bei 91°C. Bei genauerer Betrachtung der Schmelzkurve für die Triplex-PCR ist zu erkennen, dass mit den gewählten Primerverhältnissen für alle drei PCR-Systeme eine annähernd gleich effiziente Amplifikation erzielt werden konnten.

Abschließend zu dem in Abb. 19 gezeigten Versuch wurden die PCR-Ansätze nach der Schmelzkurvenanalyse mit einer Agarosegelanalyse auf einem 4%igen Agarosegel validiert (Abb. 20).



Die Analyse auf dem Agarosegel bestätigt die Ergebnisse aus der Lightcycler PCR. Die Amplifikate zeigten sowohl in Duplex- als auch in Triplex-PCR-Ansätzen die erwarteten Produktgrößen. In der Negativkontrolle liegt eine schwache Kontamination mit Erdnuss- und Soja-DNA vor (Bande 1). In allen Duplex-Ansätzen sind klare Banden für die nachzuweisenden lebensmittelallergenen DNAs zu sehen (Banden 2-6). Auch bei den Triplex-PCR-Ansätzen (Bande 7 und 8) sind alle drei PCR-Produkte klar voneinander zu differenzieren. Dies belegt, dass die Primersysteme für Multiplex-Versuche geeignet sind. Für die nachfolgenden Multiplex-Versuche zum Nachweis der Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA wurden folgende optimierte Primerverhältnisse verwendet:

Haselnuss/Erdnuss/Mandel 2:2:1

Haselnuss/Mandel/Soja 2:1:2

4.2.5 Abschließende Bewertung der PCR-Verfahren

Einzel- und Multiplex-PCR-Verfahren konnten erfolgreich für die Detektion von DNA potentiell allergen wirkender Spezies entwickelt und etabliert werden. Für Duplex- und Triplex-PCRs wurden am Lightcycler Optimierungen der Primerverhältnisse durchgeführt, die eine effiziente Amplifikation aller gesuchten Zielsequenzen ermöglichte. Multiplex-Systeme, die gegen Ende der Arbeit mit fünf oder mehr verschiedenen Zielsequenzen, durchgeführt wurden, konnten nicht mehr auf dem Lightcycler optimiert werden, da es vermehrt Überschneidungen der Schmelztemperaturen der jeweiligen Amplifikate gab. Die aus den Lightcycler Versuchen gewonnenen Erkenntnisse können allerdings für zukünftige Experimente genutzt werden, um durch entsprechende bioinformatische Ansätze beim Primerdesign z.B. Faktoren wie Schmelztemperatur und Amplikongrößen zu berücksichtigen. Dadurch kann eine vergleichbare Amplifikationseffizienz mit den Primersystemen in der PCR erzielt und eine Differenzierung im Lightcycler mit den beschriebenen Methoden ermöglicht werden.

Für die Durchführung der ersten Versuche zum Nachweis allergener Lebensmittelinhaltsstoffe waren die Versuche am Lightcycler vorteilhaft, da sie eine kostengünstige Alternative zu teuren Realtime-Multiplex-PCR Thermocyclern darstellten. Die Möglichkeit, eine Multiplex-Realtime-PCR mit SybrGreen durchzuführen und die Amplifikate über eine Schmelzkurvenanalyse zu differenzieren, wurde ungefähr zeitgleich zu den hier vorgestellten Arbeiten von zwei weiteren Arbeitsgruppen publiziert. Die verwendeten Systeme waren allerdings nur für Duplex-PCR-Systeme beschrieben worden [128, 129].

4.2.6 Detektion von allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen mit dem AllergenChip

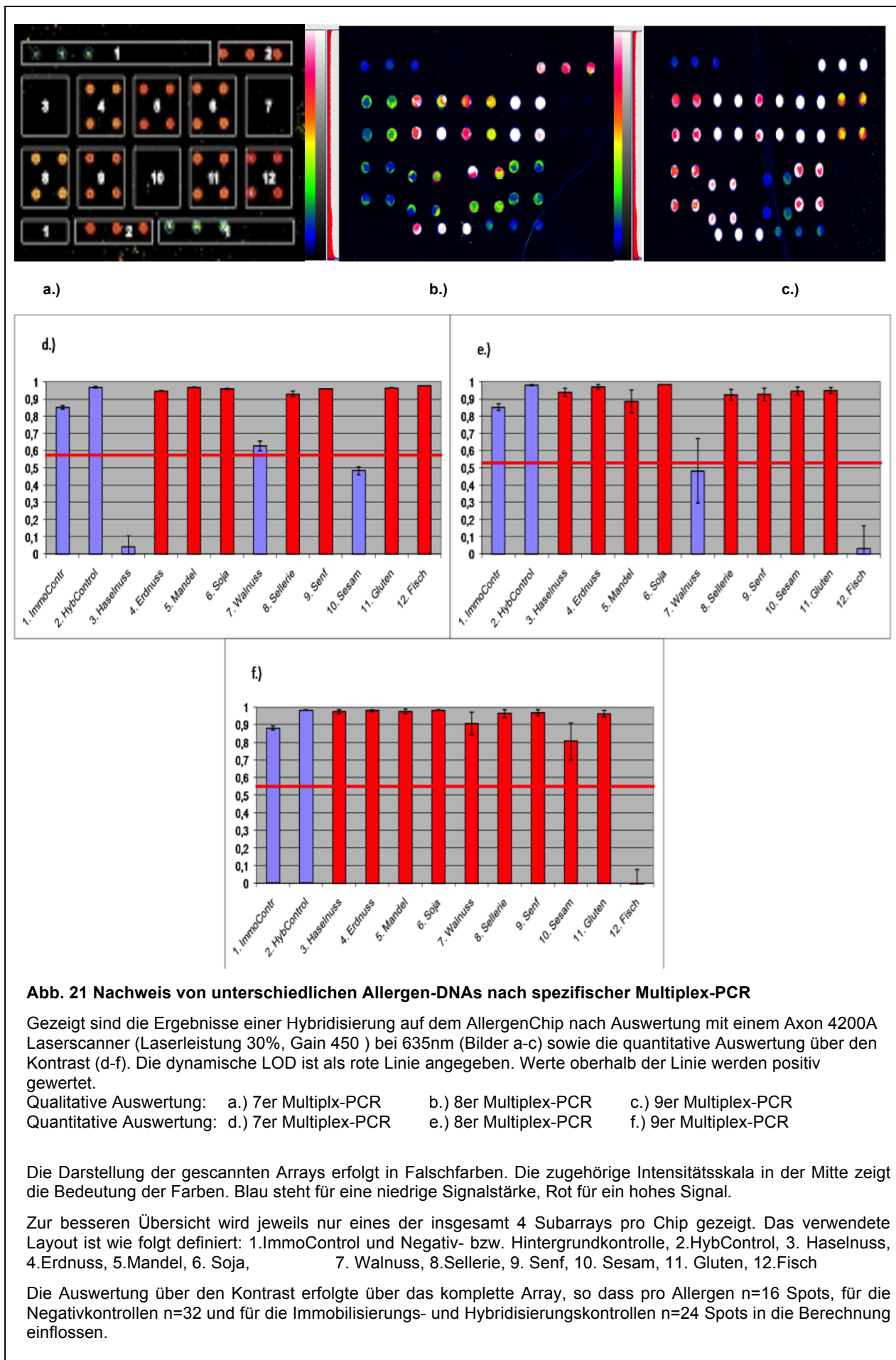
Die Multiplexmöglichkeiten in der Realtime-PCR sind auf Grund der mehrfach genannten Probleme nur eingeschränkt für eine größere Anzahl zu detektierender Proben einsetzbar (s. 4.2.2). Für den Nachweis von maximal drei verschiedenen Lebensmittelallergenen war der Nachweis über die Realtime-PCR zwar möglich, aber für den Nachweis aller relevanten Lebensmittelallergene bzw. den Nachweis von mehr als drei verschiedenen Zielsequenzen, benötigt man eine Technologie mit höherem Parallelisierungspotential. Daher wurde ein Microarray entwickelt, der in der Lage ist, mit spezifischen Sonden die 10 wichtigsten Lebensmittelallergene nachzuweisen. Im Zuge einer weiteren Zeit- und Kostenersparnis wurde zudem eine Multiplex-PCR entwickelt, mit der man bis zu 10 verschiedene allergen wirkende Spezies in einem Reaktionsansatz detektiert. Multiplex-PCRs wurde für die folgenden 10 allergenen Spezies entwickelt: Haselnuss, Erdnuss, Mandel, Soja, Walnuss, Sellerie, Senf, Sesam, Gluten und Fisch.

4.2.6.1 Überprüfung der Leistungsfähigkeit von Multiplex-PCR und AllergenChip mit Referenz-DNA

Nach der Etablierung und Optimierung der neu entwickelten Multiplex-PCR Verfahren galt es die Leistungsfähigkeit des Verfahrens zu überprüfen. Dazu war eine möglichst hohe Anzahl der 10 Allergie-auslösenden Spezies in einem Analyseschritt parallel nachzuweisen. Die Überprüfung der PCR-Produkte fand über die Hybridisierung auf dem AllergenChip statt. Die PCR-Produkte aus den jeweiligen Multiplex-PCRs wurden vor der Hybridisierung mit einem λ -Exonuklease-Verdau in einzelsträngige DNA konvertiert, um eine optimale Hybridisierung zu gewährleisten.

Für die Hybridisierung wurden auf epoxysilanisierten Glassubstraten neben Immobilisierungs-, Hybridisierungs- und Negativkontrollen spezifische Sonden für jedes nachzuweisende Allergen in Quadruplikaten in einer Konzentration von 15 μ M immobilisiert. Die Arrays wurden mit dem SciFlex-Arrayer auf die Glassubstrate dispensiert. Jedes Array besteht dabei aus 4 identischen Subarrays mit je 60 Spots, so dass ein Array insgesamt aus 240 Spots besteht, die für die Auswertung betrachtet werden. Für die Blockierung freier Epoxysilane wurden die Glaschips mit gamma-Aminobuttersäure inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, um unspezifische Bindungen an der Chipoberfläche zu minimieren und somit das Hintergrundsignal möglichst niedrig zu halten.

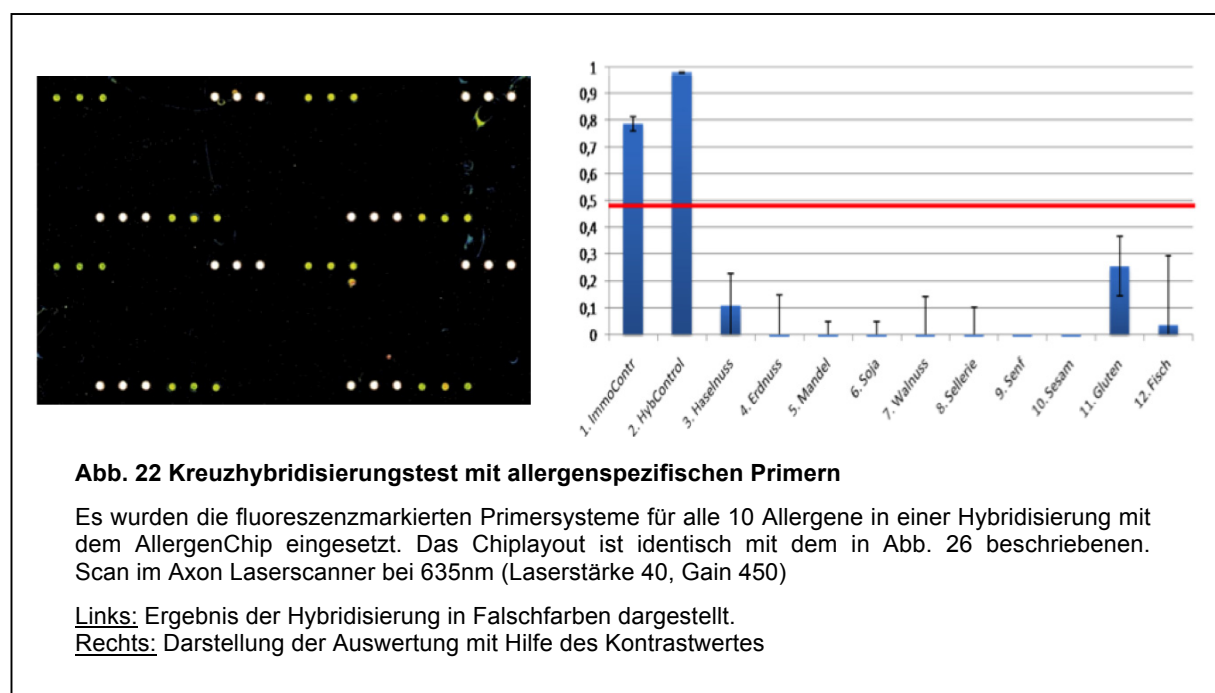
Nachfolgend werden die Ergebnisse von Multiplex-PCRs zum Nachweis von sieben, acht und neun verschiedenen lebensmittelallergenen Spezies nach Auswertung mit dem AllergenChip gezeigt (s. Abb. 21). Die Multiplex-PCR wurde mit Titanium Taq und erhöhten Konzentrationen an $MgCl_2$, Primern und dNTPs durchgeführt (s. 3.5.2). Die Erhöhung der dNTP- Konzentration erfolgte, um ein optimales $MgCl_2$ zu dNTP-Verhältnis herzustellen, um einer unspezifischen Synthese von PCR-Produkten vorzubeugen [127]. Für die gezeigten Multiplex-PCR-Versuche mit anschließender Hybridisierung wurden DNA-Isolationen verschiedene Lebensmittelmatrizes mit Verunreinigungen von >10 bis 100ppm der nachzuweisenden Allergen-Spezies als Startmaterial eingesetzt. Da kein Probenmaterial vorhanden war, welches mit mehr als drei verschiedenen Spezies kontaminiert war, war es nötig die verschiedenen Matrizes zu mischen, um eine möglichst hohe Anzahl verschiedener allergener Spezies parallel testen zu können.



Anhand der gezeigten Ergebnisse in Abb. 21 (a-f) konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der entwickelten Multiplex-PCR bis zu neun verschiedene allergene Spezies parallel amplifiziert und nachfolgend mit Hilfe des AllergenChips spezifisch detektiert und analysiert werden können. Die quantitative Auswertung (d-f) konnte die qualitativen Ergebnisse (a-c) bestätigen, alle Signale ließen sich eindeutig von dem Hintergrundsignal abgrenzen und lagen über dem berechneten Schwellenwert. Eine Ausnahme ist in Abb. 26d zu sehen. Hier ist der Kontrastwert für die spezifischen Sonden zum Nachweis von Walnuss-DNA als falsch-positiv zu werten. Die Betrachtung von Abb. 21a zeigt keine auffälligen Signale an der Position der Walnuss-Sonden. Dies war auch für die übrigen Subarrays der Fall (hier nicht dargestellt). Es ist davon auszugehen, dass das unspezifische Signal durch Eigenfluoreszenz verursacht wurde. Dies kann z.B. durch Salzablagerungen hervorgerufen werden. Eine weitere Möglichkeit ist die unspezifische Anlagerung von DNA aus dem eingesetzten DNA-Gemisch. Da verschiedene Hintergrund-DNA aus Lebensmittelmatrizes vorliegt, kann es ggf. zu unerwünschten Kreuzreaktionen gekommen sein. Insgesamt zeigten die Multiplex-Verfahren und die Hybridisierung auf dem AllergenChip eine zufriedenstellende Spezifität. Dies zeigten auch die Ergebnisse der nachfolgende Versuche.

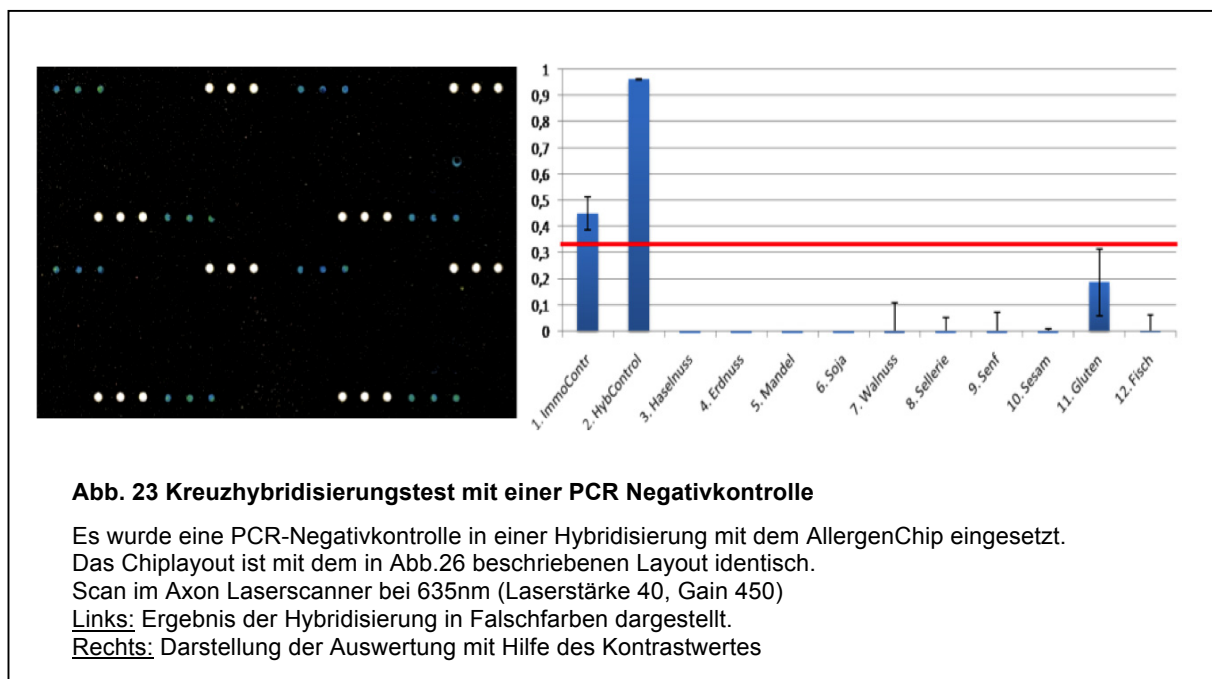
4.2.6.2 Überprüfung der Spezifität des AllergenChips

Um die Spezifität der eingesetzten Sonden auf dem AllergenChip zu überprüfen, wurden verschiedene Kreuzhybridisierungstests durchgeführt.



In einem ersten Versuchsansatz wurden die fluoreszenzmarkierten Primer aller verwendeten PCR-Systeme unter den üblichen Versuchsbedingungen auf dem AllergenChip hybridisiert, um diese auf Kreuzhybridisierung mit den auf dem Chip immobilisierten Sonden zu testen (s. Abb. 22). Die Hybridisierung mit den in der PCR verwendeten Primersystemen zeigte keine unspezifischen Signale, die auf eine Kreuzhybridisierung der fluoreszenzmarkierten Primer schließen lassen. Signale wurden erwartungsgemäß nur bei der Immobilisierungs- und der Hybridisierungskontrolle zu detektiert.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde eine PCR-Negativkontrolle für die Hybridisierung eingesetzt (Abb. 23). Hintergrund für diesen Versuch war die Überprüfung, ob eventuelle falsch-positive bzw. unspezifische PCR Amplifikate, Primer-Dimere, etc. ein Signal in der Hybridisierung erzeugen können.

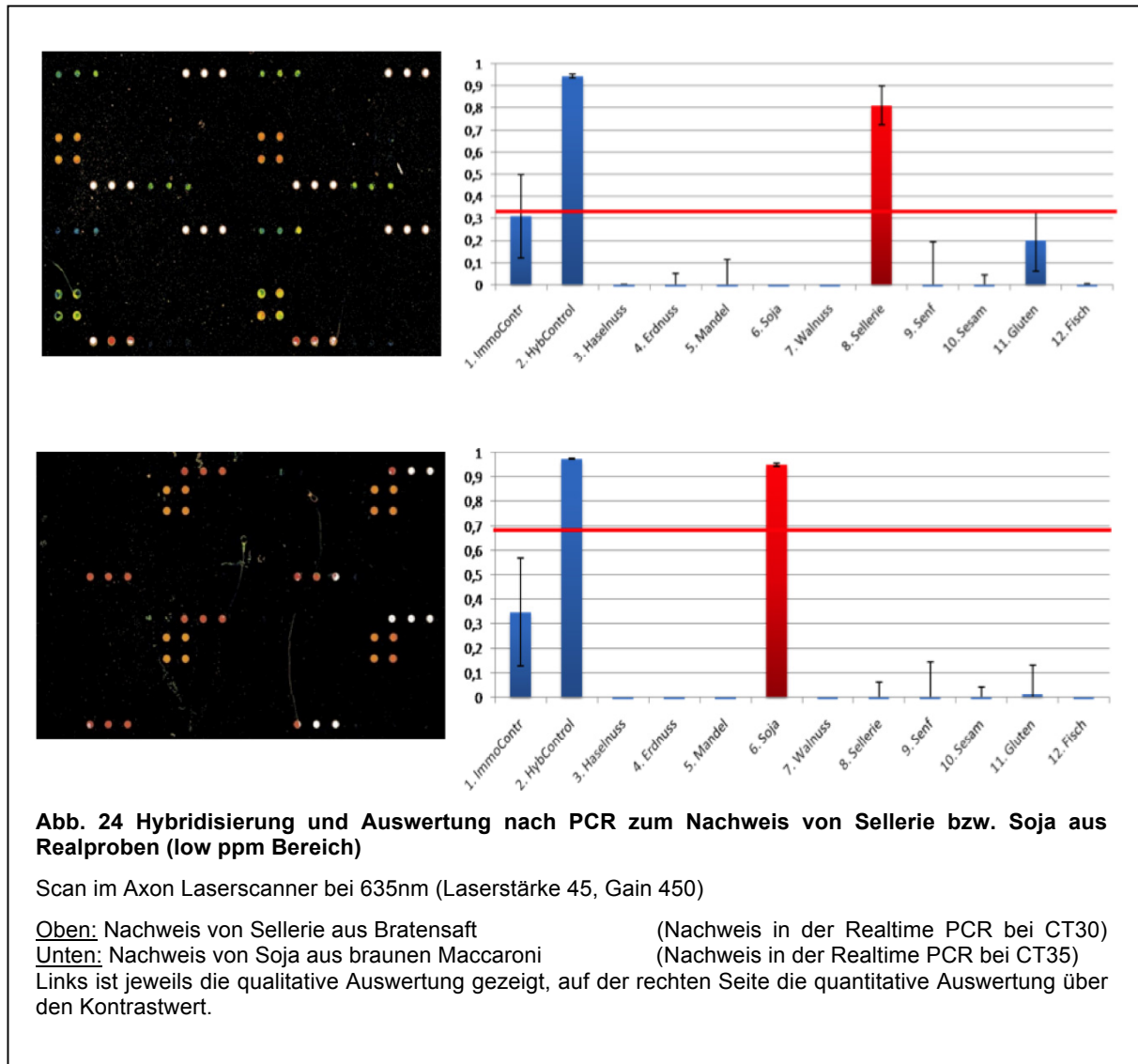


Auch in diesem Versuch wurden lediglich Signale für die Kontrollen detektiert. Es gab keine unspezifischen Signale, die oberhalb der berechneten Nachweisgrenze lagen.

Die durchgeführten Versuche konnten die Spezifität der verwendeten Sonden belegen. Es wurden keine Kreuzhybridisierungen durch freie fluoreszenzmarkierte Primer detektiert werden, womit eine Bildung von Primer-Dimer ausgeschlossen werden kann. Auch die Hybridisierung mit einer PCR-Negativkontrolle blieb ohne Signal, so dass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass ggf. falsch-positive oder unspezifische Bindung die Spezifität der verwendeten Sonden auf dem Allergenchip nicht beeinflusst.

4.2.6.3 Nachweis von Lebensmittelallergenen aus Realproben mittels Hybridisierung

Nachdem zuvor mit unterschiedlichen DNA-Gemischen gearbeitet wurde, um die Multiplexkapazität des AllergenChips zu testen, sollten Realproben auf Verunreinigungen mit allergenen Inhaltstoffen untersucht werden. Hierzu wurde DNA aus unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes isoliert und anschließend in dem entwickelten Multiplex-System eingesetzt. Nachfolgend sind Ergebnisse gezeigt, wo Verunreinigungen im low ppm Bereich, d.h. unterhalb von 10ppm, mit Hilfe des AllergenChips nachgewiesen werden konnten.



Bei den gezeigten Ergebnissen in Abb. 24 wurden jeweils Kontaminationen von Sellerie bzw. Soja in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes nachgewiesen. In beiden Realproben konnten die jeweils gesuchten allergenen Spezies erfolgreich nachgewiesen werden. Auf beiden AllergenChips sind eindeutige spezifische Signale erkennbar. Auch die Auswertung mit Hilfe des dynamischen Schwellenwertes zeigt ein eindeutig positives Ergebnis. Auffällig bei dieser Chipcharge war, dass es generell Probleme mit den Signalen der

Immobilisierungskontrolle gab, da sie nur schwach oder gar nicht zu detektieren waren. Da die Chips dieser Charge ansonsten positive und spezifische Signale insbesondere auch bei der Hybridisierungskontrolle zeigten, scheint es sich nicht um Probleme bei der Immobilisierung oder dem Dispensierungsprozess, sondern mit der Qualität der Fluoreszenzmarkierung bei der verwendeten Immobilisierungskontrolle zu handeln. Der Austausch durch neu markierte Immobilisierungskontrollen bestätigte die Vermutung in nachfolgenden Versuchen, wo dieses Problem nicht mehr zu beobachten war.

Eine Zusammenfassung aller getesteten Lebensmittelmatrizes sowie die Ergebnisse aus den AllergenChip- und Realtime-PCR-Versuchen ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Ergebnisse der Realtime-PCR wurden von der Fa. Congen gestellt. Die Realtime-PCR Ergebnisse wurden mit den gleichen Lebensmittelmatrizes durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit zu den Versuchen mit dem AllergenChip zu ermöglichen.

Tabelle 5 Zusammenfassung: Tests von Realproben mit dem AllergenChip

Probenmatrix	Allergen	Gehalt	Ct in Realtime-PCR (falls bekannt)	Nachweis über AllergenChip
Wiener Würstchen	Senf/Sellerie	Low ppm	Senf 32, Sellerie 34	+++
Gewürzmischung	Mandel/Walnuss	Low ppm	Mandel 38, Walnuss 39	+++
Weizen Crisp	Haselnuss/Mandel	Low ppm	Haselnuss 37, Mandel 39	+++
Kürbiscrème Suppe	Gluten/Sellerie	High and Low ppm	Gluten 23, Sellerie 33	+++
Sonnenblumenkernöl	Sesam	Medium ppm	Sesam 27	+++
Reis	Fisch	Low ppm	Fisch 33	+++
Schokolade	Erdnuss	Low ppm	Erdnuss 34	+++
Kekse	Sesam	Low ppm	Sesam 37	+++
Ferrero Kinder Bueno	Haselnuss/Gluten	High ppm	Haselnuss 26, Gluten 23	+++
Haselnusspastete	Soja	Low ppm	Soja 36	+++
Backmischung*	Fisch, Gluten, Senf	50 ppm (Referenzproben)	Keine Angaben	+++
Nutella *	Fisch, Gluten, Senf	100ppm (Referenzproben)	Keine Angaben	++(+) Haselnuss wurde auf Grund der Probenmatrix ebenfalls detektiert
Schmelzkäse A	Walnuss	High ppm	Walnuss 28	+++
Schmelzkäse B	Walnuss	Low ppm	Walnuss 37	+++
Luftgetrocknete Salami (10% Walnuss)	Walnuss	High ppm	Walnuss 25	+++
Brühwurst	Sellerie	50 ppm	Keine Angabe	+++

		(Referenzprobe)		
Spargelcremesuppe	Sellerie	High ppm	Sellerie 35	+++
Selleriesalz	Sellerie	High ppm	Sellerie 24	+++
Brühwurst	Senf	50ppm	Keine Angaben	+++
Bautzener Senf	Senf	Low ppm	Senf 33	+++
Maismehl	Gluten	>80ppm	Keine Angaben	+++
Backmischung	Gluten	16ppm	Keine Angaben	+++
Apfelkompott	Gluten	4ppm	Keine Angaben	+++
Karpfen	Fisch	High ppm	Fisch 17	+++
Schellfisch	Fisch	High ppm	Fisch 25	+++
Sesamstange	Sesam	High ppm	Sesam 21	+++
Sesam	Sesam	High ppm	Sesam 20	+++
Feinherbschokolade*	Haselnuss	je10, 20, 2ppm in Einzelansätzen	Keine Angaben	+++,,+,++
Schokolade	Haselnuss	2 ppm	Keine Angaben	++
Getreidemehl	Erdnuss	10ppm	Keine Angaben	+++
Braune Maccaroni	Soja	Low ppm	Keine Angaben	+++

Die Beurteilung der AllergenChip Ergebnisse erfolgt auf Grundlage der Spezifität und Korrelation mit den aus der Realtime-PCR bekannten Ergebnissen, bzw. den ppm Angaben der Referenzproben.

*= Probe wurde nachträglich mit dem angegebenen Referenzmaterial gemischt (gespiked)

+++= sehr gute Übereinstimmung (alle gesuchten allergenen Spezies detektiert);

++= gute Übereinstimmung (geringe Abweichungen vom erwarteten Ergebnis oder zu geringe Sensitivität)

+= geringe Übereinstimmung (mehrere Falschpositive oder nicht erkannte allergene Spezies)

4.2.7 Abschließende Bewertung der Hybridisierungsergebnisse

Bei der Entwicklung des Diagnostikarrays wurden im Verlauf der Arbeit verschiedene technologische Anpassungen sowohl bei der Kopplungschemie als auch beim Chipdesign selbst vorgenommen.

Das Chiplayout wurde zu Beginn der Arbeiten auf zunächst vier Allergene ausgerichtet und im späteren Verlauf für die Detektion von bis zu 10 verschiedenen allergenen Spezies erweitert. In das Chiplayout wurden verschiedene Kontrollen eingebaut. Diese Kontrollen beinhalteten eine Immobilisierungskontrolle, eine Hybridisierungskontrolle, sowie Negativkontrollen. Die spezifischen Sonden wurden in Quadruplikatmessung, die Hybridisierungs- und Immobilisierungskontrollen in 6-fach und die Spezifitäts- bzw. Negativkontrollen in 12-fach Messung bestimmt. Als Immobilisierungskontrollen wurden Oligonukleotide verwendet, die am 3'-Ende eine Kopplungsgruppe (Phosphorylierung oder Aminolinker) und am 5'-Ende eine Cy5-Fluoreszenzmarkierung tragen. Durch diese Kontrolle

wird überprüft, ob geringe oder ausbleibende Signale auf dem Chip auf eine unzureichende Immobilisierung der Sonden zurückzuführen sind. Die Hybridisierungskontrolle ist ein 20nt-Oligonukleotid mit einer 5'-Cy5 Fluoreszenzmarkierung, welches dem Ansatz zugegeben wird, um die Hybridisierungseffizienz zu überprüfen. Die Sequenz der Kontrollsonde wurde so ausgewählt, dass keine unspezifischen Kreuzhybridisierungen mit den übrigen immobilisierten Sonden stattfinden. Als Negativkontrolle und gleichzeitige Hintergrundkontrolle wurde der Spottingpuffer ohne DNA eingesetzt. Damit wird eine ggf. durch den Spottingpuffer verursachte Eigenfluoreszenz überprüft und in die Hintergrundberechnung einbezogen.

Auf jedem Chip wurden zwei Reaktionskompartimente mit Hilfe von selbstklebenden Hybridisierungskammern (Hybriwell, 35µl Volumen) gebildet. Pro Kompartiment wurde ein Array bestehend aus identischen Subarrays getropft, so dass die Sonden insgesamt 16-fach vorliegen. Durch die Anordnung in vier Arrays wird gewährleistet, dass die Sonden innerhalb eines Kompartiments über die gesamte Reaktionsfläche verteilt sind. Die Auswertung der Ergebnisse wird somit nicht durch ggf. auftretende Inhomogenitäten der funktionalisierten Oberflächen oder durch eine inhomogene Verteilung des Reaktionsansatzes beeinflusst. Die damit verbundenen Signalausfällen bzw. -einschränkungen können so minimiert werden.

Zu Beginn der Arbeiten waren nur aminosilansierte Glassubstrate kommerziell erhältlich. Hier wurden vor allem Substrate der Fa. Genetix eingesetzt, da diese sehr gute Spotmorphologien bei gleichzeitig niedrigen Hintergrundsignalen boten. Nach anfänglich guten Ergebnissen kam es zu Qualitätsschwankungen der Genetix Substrate und es wurden Versuche auf kommerziellen Substraten anderer Hersteller durchgeführt, die allerdings mit ähnlichen Qualitätsschwankungen behaftet waren, wie die Qualitätseingangskontrolle mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen zeigte. Mit der Einführung epoxysilansierter Glassubstrate wurde eine neue Oberflächenfunktionalisierung angeboten, die mit gleichbleibend hoher Qualität für Protein-, als auch für DNA-Microarrays geeignet waren. Ein Vergleich zweier verschiedener epoxysilansierter Glassubstrate der Hersteller Schott und Corning wird unter 4.3.1 gezeigt.

Für die Anwendung von Microarrays in der Multiparameteranalytik ist es entscheidend, dass Ergebnisse mit hoher Spezifität und Sensitivität erzielt werden können. Ein wichtiges Kriterium dafür sind möglichst wenige unspezifische Signale. Hintergrundsignale entstehen in erster Linie durch unspezifische Bindung von DNA-Sequenzen oder anderen Komponenten aus dem zu analysierenden Reaktionsansatz. Um unspezifische Bindungen auf der Chipoberfläche zu minimieren, werden nach dem Dispensieren des Microarrays die freien reaktiven Oberflächengruppen geblockt. Je nach Oberflächenfunktionalisierung werden unterschiedliche Blockingmethoden Glassubstrate eingesetzt.

Für aminosilansierte Glassubstrate wurden verschiedene Blockingmethoden getestet. Ein Standardprotokoll ist für aminosilansierte Glasoberflächen ist von Schena et al. [130] und Eisen et al. [131] beschrieben worden. Bernsteinsäureanhydrid wurde in Methylpyrrolidinon mit Borsäure gelöst und für die Acylierung der freien Aminogruppen eingesetzt. Durch die Acylierung wird eine negative Oberflächenladung erzeugt. Durch die negative Ladung der Carboxylgruppe des Bernsteinsäureanhydrids wird die ebenfalls negativ geladene DNA von der Oberfläche abgestossen und so eine unspezifische Bindung an der Substratoberfläche vermieden. Eine Verbesserung dieses Verfahrens konnte 2001 von Diehl et al. gezeigt werden, indem Bernsteinsäureanhydrid in unpolarem Dichlorethan gelöst wurde und damit eine weitere Reduktion des Hintergrundsignals gegenüber den Standardprotokollen von Schena und Eisen erzielt werden konnte [119].

Für epoxysilansierte Glassubstrate wird seitens der Hersteller Ethanolamin für die Blockierung der freien Epoxidgruppen an der Glasoberfläche empfohlen. Das Ethanolamin reagiert dabei mit der Epoxidgruppe und führt so eine Hydroxygruppe an der Oberfläche ein, dies soll ebenfalls eine unspezifische Bindung von DNA an der Epoxysilan-Oberfläche verhindern. In Kapitel 4.3.1 wird eine weitere Möglichkeit der Blockierung freier Epoxidgruppen mit Hilfe von gamma-Aminobuttersäure (GABA) vorgestellt und im Vergleich zu der Ethanolamin-Methode betrachtet und diskutiert.

Die Hybridisierung auf dem Microarray konnte erfolgreich für alle allergenen Spezies gezeigt werden, die zu über 90% Auslöser lebensmittelallergischer Reaktionen sind. Der Nachweis konnte sowohl für einzelne Allergene als auch für Kombinationen von bis zu neun verschiedenen Allergenen durchgeführt werden. Dabei ist anzumerken, dass in einer Lebensmittelmatrix selten mehr als 3-5 Kontaminanten parallel in einer Lebensmittelmatrix auftreten. Daher handelt es sich bei den Multiplexversuchen vielmehr um eine Überprüfung der Leistungsfähigkeit der entwickelten Multiplex-PCR und der Diskriminierungseffizienz des Microarrays. Dazu wurden DNA-Referenzen der jeweiligen allergenen Spezies in Konzentrationen von 10 bis zu mehreren hundert ppm eingesetzt und in verschiedenen Kombinationen zu einem Gemisch vereint. Diese Gemische wurden zunächst in einer Multiplex-PCR amplifiziert und anschließend mit Hilfe der λ -Exonuklease zu ssDNA verdaut. Die ssDNA wurde nachfolgend auf dem Microarray hybridisiert und ausgewertet. Positive Ergebnisse in der Multiplex-PCR konnten bis zu einer Konzentration von 100ppm erzielt werden. Dies liegt derzeit um einen Faktor 10 über der derzeit akzeptierten Detektionsgrenze von 10ppm. Allerdings muss man hier differenzieren. Da es derzeit keine gesetzlich festgelegten Schwellenwerte gibt (s. Kapitel 2.2.2.2), ist eine eindeutige Aussage, ob die 100ppm als nicht ausreichend anzusehen sind, noch nicht endgültig geklärt. Als

Beispiel sei hier Gluten genannt, für das gemäß dem Codex Alimentarius ein Schwellenwert von 200ppm gilt.

Bei dem Nachweis allergener Spezies aus Realproben konnten im Einzelnachweis positive Ergebnisse bis in einen Bereich unterhalb 10ppm, gezeigt werden. Die erzielten Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen aus Realtime-PCR Versuchen, die bei der Fa. Congen mit den gleichen Lebensmittelmatrizes durchgeführt wurden. Die Ergebnisse zeigen auch, dass der entwickelte AllergenChip keinen limitierenden Einfluss auf die Sensitivität oder Spezifität hatte. Der bestimmende Schritt hierfür ist die PCR selbst.

Multiplexnachweise konnten mit verschiedenen Lebensmittelmatrizen, sowie Lebensmittelproben, denen entsprechende Referenz-DNAs zugesetzt wurden durchgeführt. Hier konnten bis zu 50ppm verschiedener allergener Verunreinigungen nachgewiesen werden.

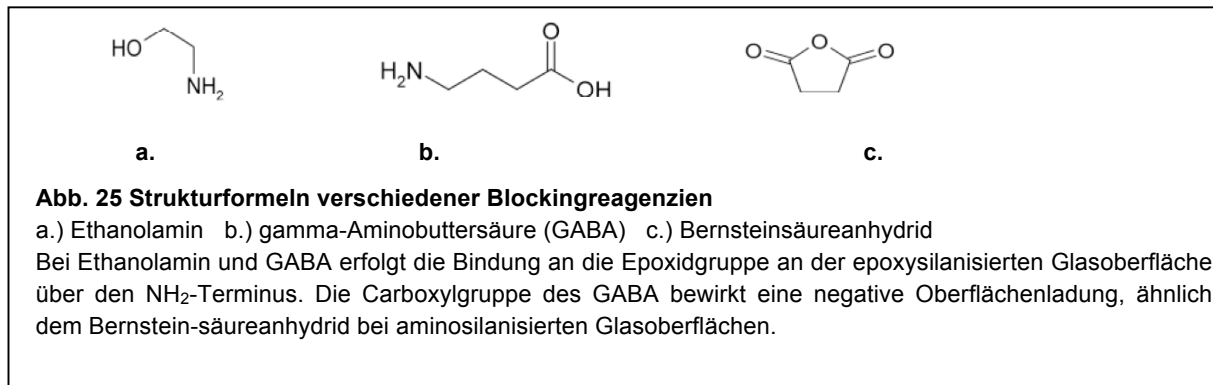
4.3 OnChip-Amplifikation

Die OnChip-Amplifikation stellt einen weiteren Integrationsschritt im analytischen Ablauf dar. Der klassische Ablauf, wie er bisher durchgeführt wurde, besteht aus drei getrennten experimentellen Teilschritten, einer PCR oder Multiplex-PCR, der Einzelstrang-Generierung für optimale Hybridisierungsergebnisse und der Hybridisierung auf dem Microarray. Addiert man die benötigte Zeit aller einzelnen Arbeitsschritte, so ergibt sich ein Zeitaufwand von ca. sechs Stunden. Mit Hilfe der OnChip-PCR kann dieser Zeitaufwand weiter minimiert werden. Da Einzelstrang-Generierung und Hybridisierung entfallen, reduziert sich der gesamte experimentelle Aufwand auf drei bis vier Stunden.

Im folgenden Abschnitt wird auf verschiedene Aspekte eingegangen, die die Entwicklung einer OnChip-PCR beeinflussen. Basierend auf den Erfahrungen aus den vorangegangenen Experimenten wurden verschiedene epoxysilanzierte Glassubstrate, Immobilisierungskonzentrationen für Primer, Blockingmethoden, sowie verschiedene Polymerasen getestet und Versuche zur Signalverstärkung durchgeführt. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden genutzt, um optimierte OnChip-Amplifikationsverfahren zum Nachweis von allergenen Inhaltsstoffen aus Lebensmitteln in Singleplex- und Multiplex-Ansätzen zu entwickeln.

4.3.1 Immobilisierungsversuche auf Glas mit Epoxysilan-Beschichtung

Nachdem es im Verlauf der Arbeit zu Qualitätsschwankungen der kommerziell erhältlichen aminosilanisierten Chips kam, wurden diese im späteren Verlauf dieser Arbeit durch qualitativ hochwertigere epoxysilanisierte Glassubstrate ersetzt. Substrate der Firmen Schott und Corning wurden auf ihre Eignung als Microarray-Substrate getestet. Dabei war es Ziel, die Bindungs- und Hybridisierungseffizienz sowie eine optimale Konzentration für Hybridisierungssonden bzw. Primer auf den Epoxysilan-Glasobjektträgern zu ermitteln. Neben dem für epoxysilanisierte Glassubstrate empfohlenen Blockingreagenz Ethanolamin wurde zusätzlich ein Vergleich zu gamma-Aminobuttersäure (GABA) als Blockingagenz durchgeführt. Motivation für den Einsatz von GABA war es, ein dem Bernsteinsäureanhydrid ähnliches Blockingreagenz zu finden. Die dabei zu erfüllenden Kriterien waren, das Vorhandensein eines Aminoterminus zur Kopplung an die Epoxidgruppe und einer Carboxylgruppe, um eine negative Oberflächenladung zu gewährleisten. GABA erfüllt die geforderten Kriterien und wurde daher in einem Vergleich zu Ethanolamin auf seine Eignung als Blockingreagenz getestet.



Auf die epoxysilanzierter Chips wurden M13-spezifische Sonden mit einem C6-Aminolinker in einer Konzentration von 1, 3, 6, 15, 25 und 50µM mit dem SciFlex-Arrayer dispensiert. Alle Proben und Kontrollen wurden in 3xSSC Puffer mit dem Scienion SciFlex-Arrayer gespottet. Das Arraylayout ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

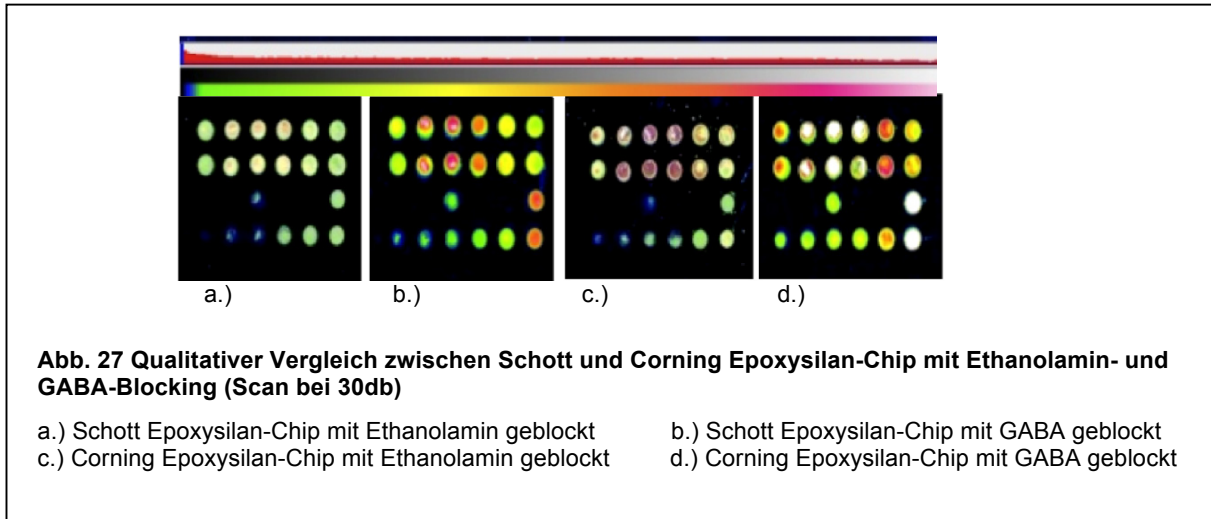
1µM	3µM	6µM	15µM	25µM	50µM
M13-Sonde	M13-Sonde	M13-Sonde	M13-Sonde	M13-Sonde	M13-Sonde
1µM	3µM	6µM	15µM	25µM	50µM
M13-Sonde	M13-Sonde	M13-Sonde	M13-Sonde	M13-Sonde	M13-Sonde
3xSSC	3xSSC	6µM	3xSSC	3xSSC	50µM
Negativkontrolle	Negativkontrolle	ImmoControl	Negativkontrolle	Negativkontrolle	ImmoControl
1µM	3µM	6µM	15µM	25µM	50µM
ImmoControl	ImmoControl	ImmoControl	ImmoControl	ImmoControl	ImmoControl

Abb. 26 Arraylayout

Das Arraylayout wurde insgesamt acht Mal pro Slide gespottet. Pro Slide wurden zwei getrennte Hybridisierungskammern mit HybriWells gebildet (pro Kompartiment 4 Arrays).

Als Negativkontrolle diente 3xSSC Spottingpuffer, um eventuelle Hintergrundsignale auf Grund von Salzen im Spottingpuffer von dem eigentlichen Signal zu diskriminieren. Als Immobilisierungskontrolle wurde ein doppelt markiertes Oligonukleotid mit C6-Aminolinker und Cy5-Fluoreszenzfarbstoff verwendet.

Die Chips wurden bei gleichen Einstellungen mit dem Affymetrix GSM 428 Scanner ausgewertet. Die Analyse wurde sowohl qualitativ (s. Abb. 27) als auch quantitativ (s. Abb. 28) durchgeführt.



Anhand der qualitativen Auswertung ist erkennbar, dass die epoxysilanierten Glassubstrate, die mit GABA (Abb. 27b und d) geblockt wurden, unabhängig von dem Hersteller, stärkere Signale liefern, als Substrate mit Ethanolamin-Blocking. Ferner konnten stärkere Signale auf Corning Substraten (27c und d) gegenüber Schott Substraten (27a und b) detektiert werden. Dies wird vor allem in Kombination mit dem GABA Blocking deutlich. Chips, die mit GABA inkubiert wurden zeigten nach qualitativer Beurteilung über den Kontrastwert generell höhere Signalintensitäten als Chips, die mit Ethanolamin behandelt wurden (s. Abb. 28)

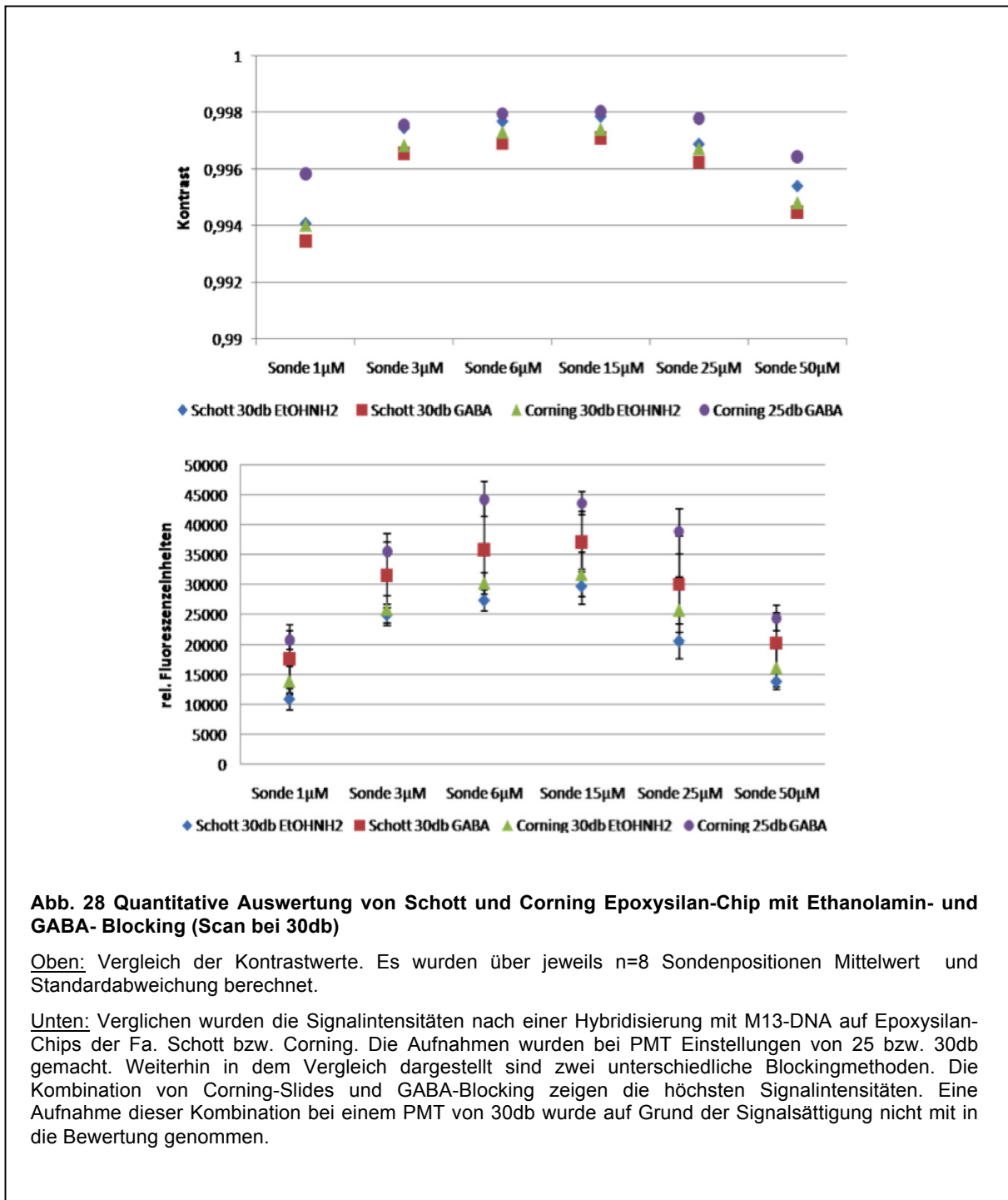


Abb. 28 Quantitative Auswertung von Schott und Corning Epoxysilan-Chip mit Ethanolamin- und GABA- Blocking (Scan bei 30db)

Oben: Vergleich der Kontrastwerte. Es wurden über jeweils n=8 Sondenpositionen Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Unten: Verglichen wurden die Signalintensitäten nach einer Hybridisierung mit M13-DNA auf Epoxysilan-Chips der Fa. Schott bzw. Corning. Die Aufnahmen wurden bei PMT Einstellungen von 25 bzw. 30db gemacht. Weiterhin in dem Vergleich dargestellt sind zwei unterschiedliche Blockingmethoden. Die Kombination von Corning-Slides und GABA-Blocking zeigen die höchsten Signalintensitäten. Eine Aufnahme dieser Kombination bei einem PMT von 30db wurde auf Grund der Signalsättigung nicht in die Bewertung genommen.

Die quantitative Auswertung erfolgte sowohl über den Kontrastwert, als auch über die Signalintensität. Die Auswertung über den Kontrast läßt keine eindeutig differenzierte Aussage darüber zu, welche Kombination aus Glassubstrat, Blocking und Immobilisierungskonzentration der Sonden die besten Bedingungen für eine Hybridisierung bieten. Alle getesteten Kombinationen zeigten nahezu 100% Kontrast (Kontrastwert = 1). Marginale Unterschiede zeigen sich erst, wenn man den Kontrastbereich zwischen 0,99 und 1 betrachtet. Hier sieht man, dass die Kombination aus Corning Epoxysilan-Chips und GABA-Blocking bessere Kontrastwerte liefert, als die übrigen getesteten Varianten. Die

optimale Immobilisierungskonzentration für alle Chips lag in dem Bereich zwischen 6 und 15µM.

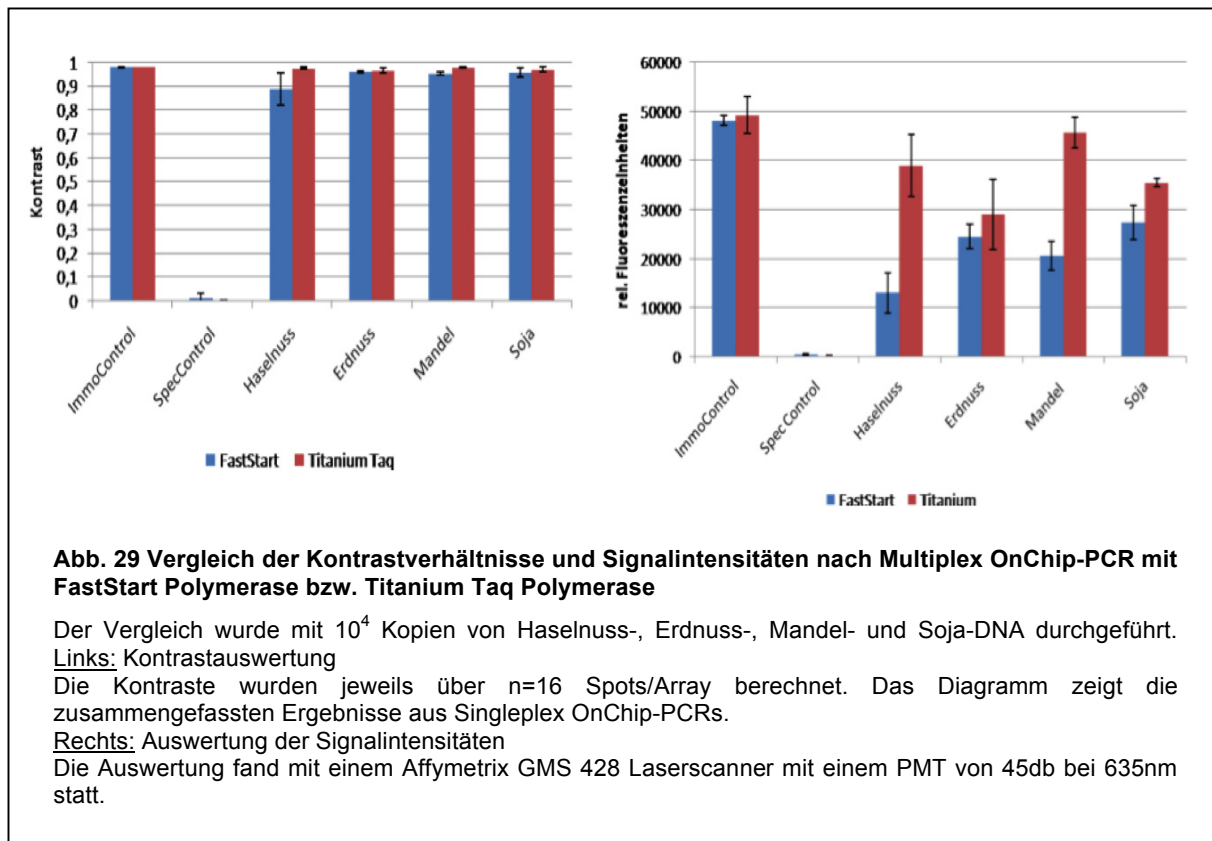
Anhand der Auswertung der Signalintensitäten kann ein eindeutigeres Bild festgestellt werden. Hier sind die Signalintensitäten der mit GABA geblockten Chips unabhängig vom Hersteller fast doppelt so hoch wie die der mit Ethanolamin geblockten Glassubstrate. Zudem zeigen die Chips der Fa. Corning höhere Signale, als die Chips der Fa. Schott. Die höchsten Signale konnten bei allen getesteten Substraten bei einer Immobilisierungskonzentration zwischen 6 und 15µM erzielt werden. Die in der qualitativen Analyse festgestellten Ergebnisse konnten demnach bestätigt werden

Zusammengefasst bedeutet dies, dass Epoxysilan-Chips der Fa. Corning in Kombination mit dem gamma-Aminobuttersäure-Blocking (GABA) bei einer Immobilisierungskonzentration zwischen 6 und 15µM die höchsten Signalintensitäten lieferten. Nachfolgende Chipversuche wurden daher auf Epoxysilan-Chips der Fa. Corning durchgeführt. Als Immobilisierungskonzentration für Primer und Sonden wurde eine Konzentration von 15µM festgelegt, und GABA-Blocking wurde als Blockingmethode verwendet.

4.3.2 Vergleich zweier DNA-Polymerasen hinsichtlich OnChip-PCR Eignung

Wie bereits für die Entwicklung der Multiplex-PCR Verfahren unter 4.1.4 beschrieben, wurden verschiedene Polymerasen getestet. Eine weitere Polymerase, die für die Optimierung der Multiplex-PCR zum Nachweis von verschiedenen lebensmittelallergenen Spezies in der Realtime-PCR eingesetzt wurde, war die FastStart Polymerase. Diese Polymerase wurde von der Fa. Roche speziell für Realtime-PCR mit dem Lightcycler entwickelt. Im Gegensatz zu Realtime-PCR Thermocyclern anderer Hersteller werden im Lightcycler keine Mikrotiterplattenformate, sondern Glaskapillaren verwendet. Da hier ähnlich der OnChip-PCR die Taq-Polymerase, PCR-Reaktionskomponenten und Nukleinsäuren in Gegenwart einer Glasoberfläche in der Amplifikation eingesetzt werden, bestand die Überlegung, dass die FastStart Polymerase auch in der OnChip-PCR bessere Ergebnisse als eine herkömmliche Taq-Polymerase, wie z.B. die Titanium Taq Polymerase liefern könnte.

Für die Versuche wurden daher das FastStart Hybridization Probe Kit, welches ohne den Interkalator SybrGreen angeboten wird sowie die Titanium Taq-Polymerase in OnChip-PCRs zum Einzelnachweis von je 10⁴ Kopien Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA miteinander verglichen. Die Ergebnisse wurden zunächst über die Berechnung der Kontrastwerte und später über die Signalintensitäten bewertet (s. Abb. 29)



Anhand der Auswertung über die Kontrastwerte sind kaum Unterschiede zwischen den Amplifikationsergebnissen der beiden Polymerasen zu erkennen. Lediglich bei der Amplifikation von Haselnuss-DNA konnten mit der Titanium Taq Polymerase etwas bessere Ergebnisse erzielt werden. Insgesamt konnten aber mit beiden Polymerasen alle gesuchten Spezies zuverlässig detektiert werden. Die berechneten Schwellenwerte für die einzelnen Chips lagen zwischen 0,1 und 0,45. Die Spezifitätskontrollen zeigten keine Signale, so dass es keine Probleme mit unspezifischen Amplifikationsprodukten oder Primer-Dimeren gab.

Anhand der reinen Betrachtung der Kontrastwerte war keine klare Aussage bezüglich der Eignung für die OnChip-PCR möglich. Sowohl die Titanium Taq Polymerase als auch die FastStart Polymerase zeigten hier sehr gute Ergebnisse. Deshalb wurden zusätzlich die Signalintensitäten betrachtet. Hierbei ist dann eindeutig ein Vorteil bei der Titanium Taq Polymerase zu sehen. Bei allen Amplifikationen mit der Titanium Taq konnte ein deutlich höheres Signal detektiert werden. Dies gab den Ausschlag für die Verwendung der Titanium Taq in den nachfolgenden OnChip-PCR Versuchen.

4.3.3 OnChip-PCR mit fluoreszenzmarkierten dUTP

Die PCR ist eine sehr sensitive Methode, die in der Lage ist, geringste Mengen an Ausgangs-DNA zu amplifizieren. Bei der OnChip-PCR wird die Amplifikation an immobilisierten Primern durchgeführt. Neben der Effizienz mit der die Amplifikation an der Chipoberfläche abläuft, ist auch die Vorbereitung der Glasoberfläche durch geeignete Blockingverfahren, um unspezifische Hintergrundsignale zu minimieren (Kapitel 4.3.1), entscheidend. Dies ist nötig, um eine möglichst hohe Sensitivität bei der OnChip-PCR zu erzielen. Eine weitere Möglichkeit die Sensitivität der OnChip-PCR zu steigern, ist die Verstärkung der Signalintensität der synthetisierten PCR-Amplifikate. Gebräuchlich ist hier neben der Fluoreszenzmarkierung über Primer auch der Einbau fluoreszenzmarkierter dUTPs.

Erste Versuche zur Überprüfung des Einbaus von fluoreszenzmarkierten dUTP wurden während Einzel- und Multiplex-PCR durchgeführt. Die in diesen Versuchen gewonnenen Amplifikate wurden nachfolgend nach den etablierten Protokollen in einer Hybridisierung auf dem AllergenChip eingesetzt und anschließend ausgewertet. Anhand der Signalintensitäten wurden verschiedene Kombinationen mit fluoreszenzmarkierten Primern bzw. dUTP verglichen. Zum Einsatz kamen neben den standardmäßig verwendeten Cy5-markierten Primern auch Cy5- und Cy3- markierte dUTP. Die Markierungsmethode mit der höchsten Signalintensität wird nachfolgend in der OnChip PCR bzw. OnChip Multiplex PCR eingesetzt.

4.3.3.1 *Vergleich zwischen Cy3-dUTP- und Cy5-Primer-Signalintensitäten nach Multiplex-PCR und Hybridisierung auf dem AllergenChip*

In einem ersten Versuchsansatz wurde die Signalintensität von Cy3-dUTP im Vergleich zu Cy5-Primern getestet. Exemplarisch wird nachfolgend das Ergebnis einer Duplex-PCR zum Nachweis von 10^4 -Kopien Erdnuss- und Soja-DNA gezeigt. Nach der PCR wurden die Produkte nach den etablierten Protokollen für die Hybridisierung eingesetzt und anschließend die Signalintensitäten mit einem Laserscanner bei 535nm (Cy3) und 635nm (Cy5) detektiert.

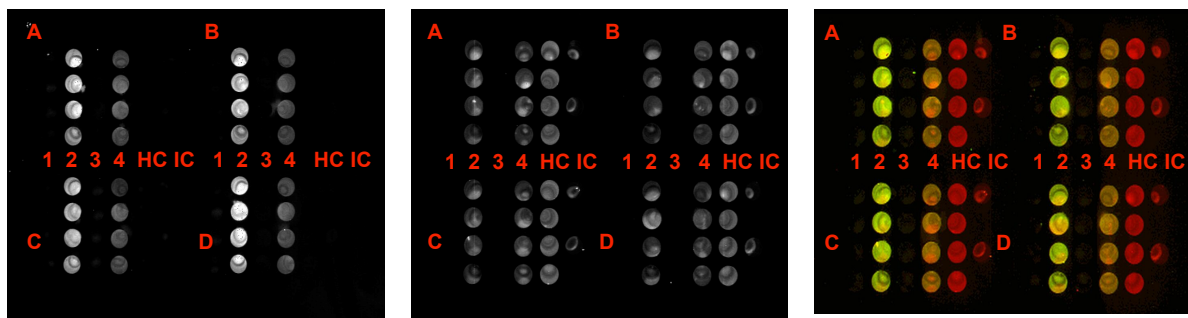
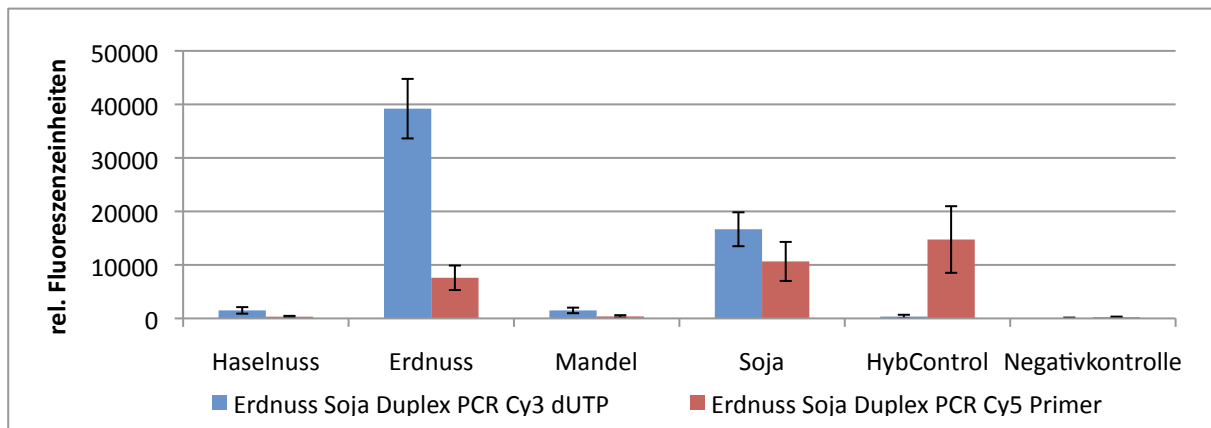


Abb. 30 Hybridisierung mit Erdnuss- und Soja-Amplifikaten nach Duplex-PCR mit Cy3-dUTP und Cy5-Primer

Das Arraylayout ist nur für den Nachweis von Haselnuss (1), Erdnuss (2), Mandel (3) und Soja (4) ausgelegt. Ferner sind Immobilisierungskontrollen (IC) und Hybridisierungskontrollen (HC) in das Array integriert. Alle Sonden und Hybridisierungskontrollen sind in Quadruplikaten, die Immobilisierungskontrollen in Duplikaten gespottet. Das Array besteht aus 4 identischen Subarrays (a-d).

Links: Aufnahme bei 40 db im Cy3-Kanal (535nm)

Mitte: Aufnahme bei 40db im Cy5-Kanal (690nm)

Rechts: Overlay beider Kanäle; Darstellung in Falschfarben: Cy3 grün, Cy5 rot

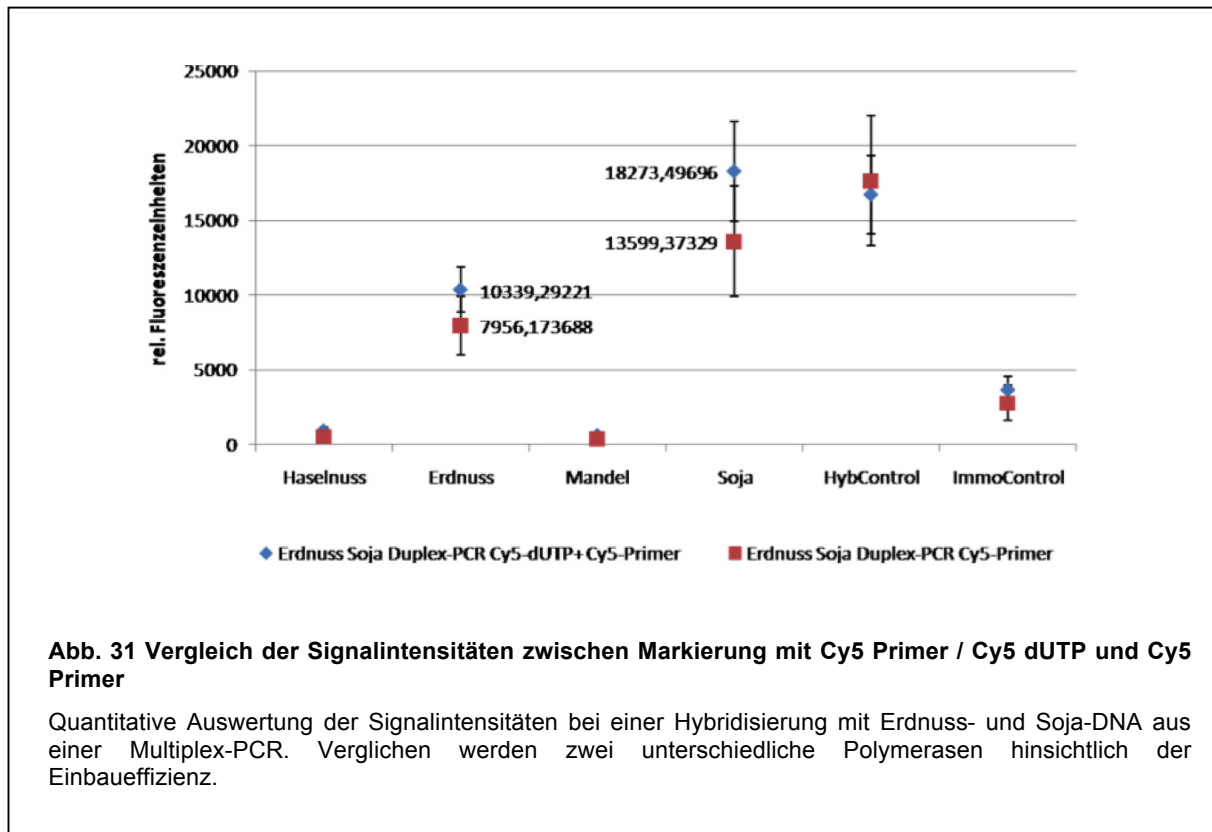
Mischfarben treten auf, wenn innerhalb eines Spots sowohl Cy5-, als auch Cy3-Signale detektiert werden konnten.

Das Ergebnis in Abb. 30 zeigt den Einbau von Cy5-markierten Primern und Cy3-markierten dUTP in einer Multiplex PCR zum Nachweis von Erdnuss- und Soja-DNA. Voraussetzung für diesen Versuch waren zuvor durchgeführte Einzel-PCRs, in denen der erfolgreiche Einbau von fluoreszenzmarkierten dUTP gezeigt werden konnte (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Die quantitative Auswertung in Abb. zeigt den Nachweis von Erdnuss- und Soja-DNA nach einer Multiplex-PCR. Cy3 gibt generell ein stärkeres Fluoreszenzsignal als Cy5, daher wurde eine Lasereinstellung ermittelt, bei der beide Kanäle nicht in der Signalsättigung liegen. In dem vorliegenden Versuch lag die Laserstärke (PMT) daher bei 40db für den Nachweis von Erdnuss- und Soja-DNA.

Fluoreszenzmarkierte dUTP werden anstelle von Thymidin während der DNA-Synthese in den DNA-Strang eingebaut. In Abhängigkeit von der Sequenzlänge und dem A/T-Gehalt wird eine entsprechende Anzahl fluoreszenzmarkierte Nukleotide in die Sequenz eingebaut. Veranschaulichen lässt sich der Einfluss der Sequenzlänge, indem das Cy3-dUTP Signal in Relation zu dem Cy5-Primer-Signal im Overlay-Bild in Abb. 30 betrachtet wird. Hier wurden die beiden Einzelaufnahmen aus dem Cy3- bzw. Cy5 Kanal übereinander gelegt. Cy3-Signale werden in grüner und Cy5-Signale in roter Falschfarbendarstellung gezeigt. Sind beide zu gleichen Teilen bzw. mit gleicher Intensität in einem Spot vertreten, ergibt sich eine gelbe Mischfarbe. Im Falle des hybridisierten Soja-Amplikons wird deutlich, dass hier die Signale im Cy3- und im Cy5-Kanal weitestgehend gleich stark sind, mit leichter Tendenz in den grünen Bereich. Begründet werden kann dies mit der geringeren Länge des das Soja-Amplikons mit nur ca. 50bp und mit einer geringen Anzahl an Thymidin. Im Falle des Erdnuss-Amplikons ist der Unterschied wesentlich markanter. Die Sequenz ist mit 150bp drei Mal so lang und enthält auch mehr Thymidin als das Soja-Amplikon. Daher kann hier eine Verschiebung in den grünen Bereich im Falschfarbenbild detektiert werden. Die Ergebnisse konnten klar zeigen, dass der Einbau von fluoreszenzmarkiertem dUTP und fluoreszenzmarkierten Primern in einer Duplex-PCR möglich ist, da für beide Zielsequenzen spezifische Signale über die Auswertung im Cy3- und Cy5-Kanal an den entsprechenden Sondenpositionen nachgewiesen werden konnten.

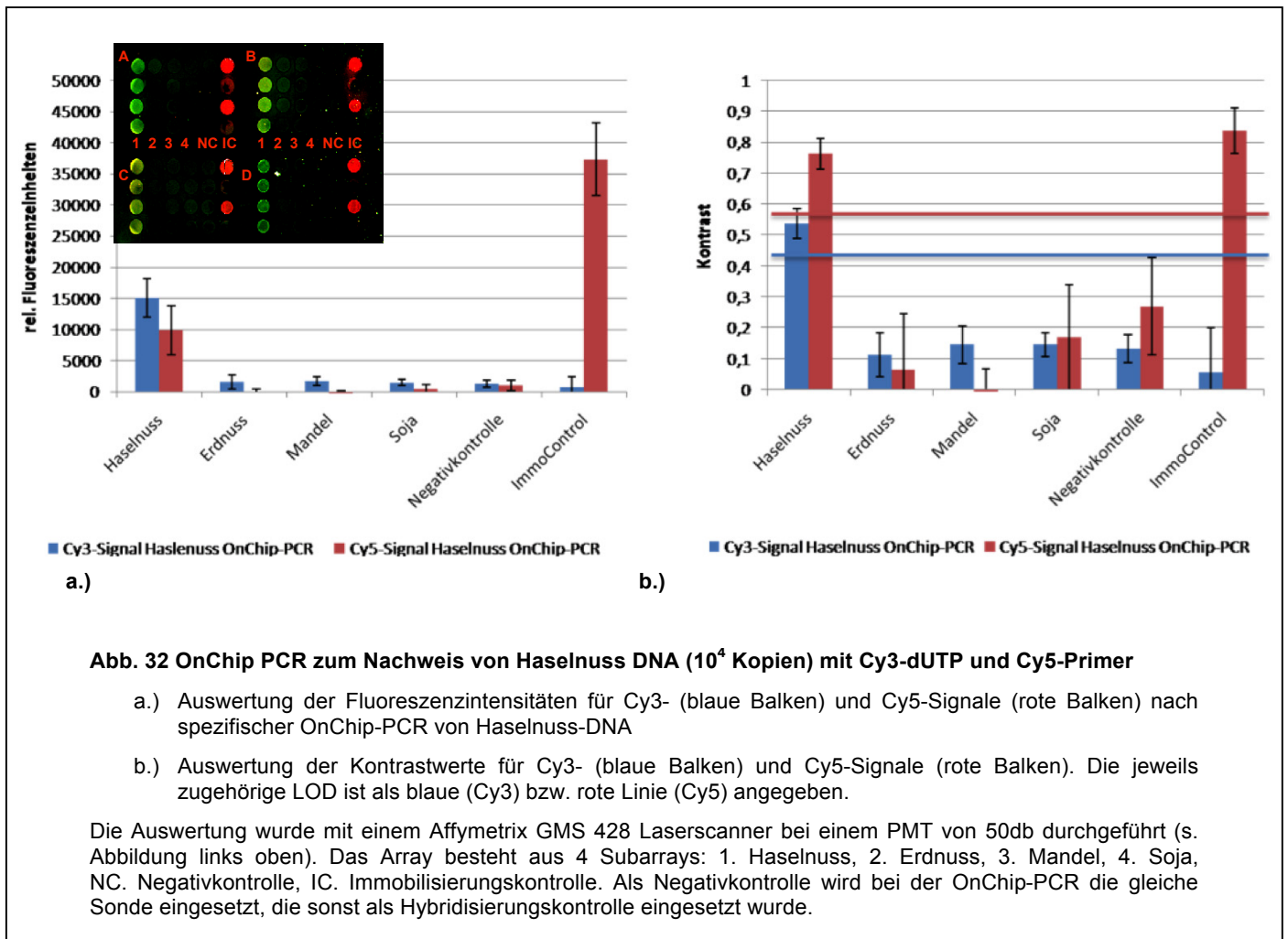
Um eine genauere Aussage über die maximal mögliche Verstärkung des Signals treffen zu können, wurde ein direkter Vergleich zwischen Cy5-markierten Primern in Kombination mit Cy5-markiertem dUTP und nur mit Cy5-markierten Primern amplifizierten PCR-Produkten durchgeführt (s. Abb. 31). Erwartet wurde eine direkte Zunahme des Signals in Abhängigkeit von der Einbaurate der Cy5-dUTPs.



Für diesen Versuch wurde die Titanium Taq in einer Duplex-PCR zum Nachweis von 10^4 Kopien Erdnuss- und Soja-DNA verwendet. An der quantitativen Auswertung der Hybridisierungsergebnisse auf dem AllergenChip (Abb. 31) kann man sehen, dass die Kombination aus Cy5-dUTP und Cy5-Primer, wie erwartet, höhere Signale zeigt als Amplifikate, die nur über den Cy5-Primer markiert wurden. Allerdings kann anhand der Signalintensitäten errechnet werden, dass mit Hilfe der zusätzlich eingebauten Cy5-dUTPs lediglich eine Signalerhöhung von 20-25% erreicht wird. Gemessen an den hohen Kosten, die eine zusätzliche Markierung mit fluoreszenzmarkierten dUTPs verursachen (ca. 5-7€/Reaktion), ist je nach Anwendungsfall zu entscheiden, ob der Zuwachs an Sensitivität benötigt wird.

4.3.3.2 OnChip-PCR mit fluoreszenzmarkierten Cy3-dUTP und Cy5-Primer

Nach den erfolgreichen Vorversuchen wurde der Einbau von fluoreszenzmarkierten dUTPs auch in OnChip- und OnChip-Multiplex-PCR untersucht. Aus den Ergebnissen der Vorversuche abgeleitet, wurden die entwickelten Protokolle auf die OnChip-PCR und nachfolgend auf Multiplex-OnChip-PCR übertragen. Zunächst wurde eine Amplifikation mit Signalverstärkung über Cy3-dUTP etabliert. Dazu wurde das bei den Hybridisierungsversuchen etablierte Protokoll auf die OnChip-PCR übertragen.

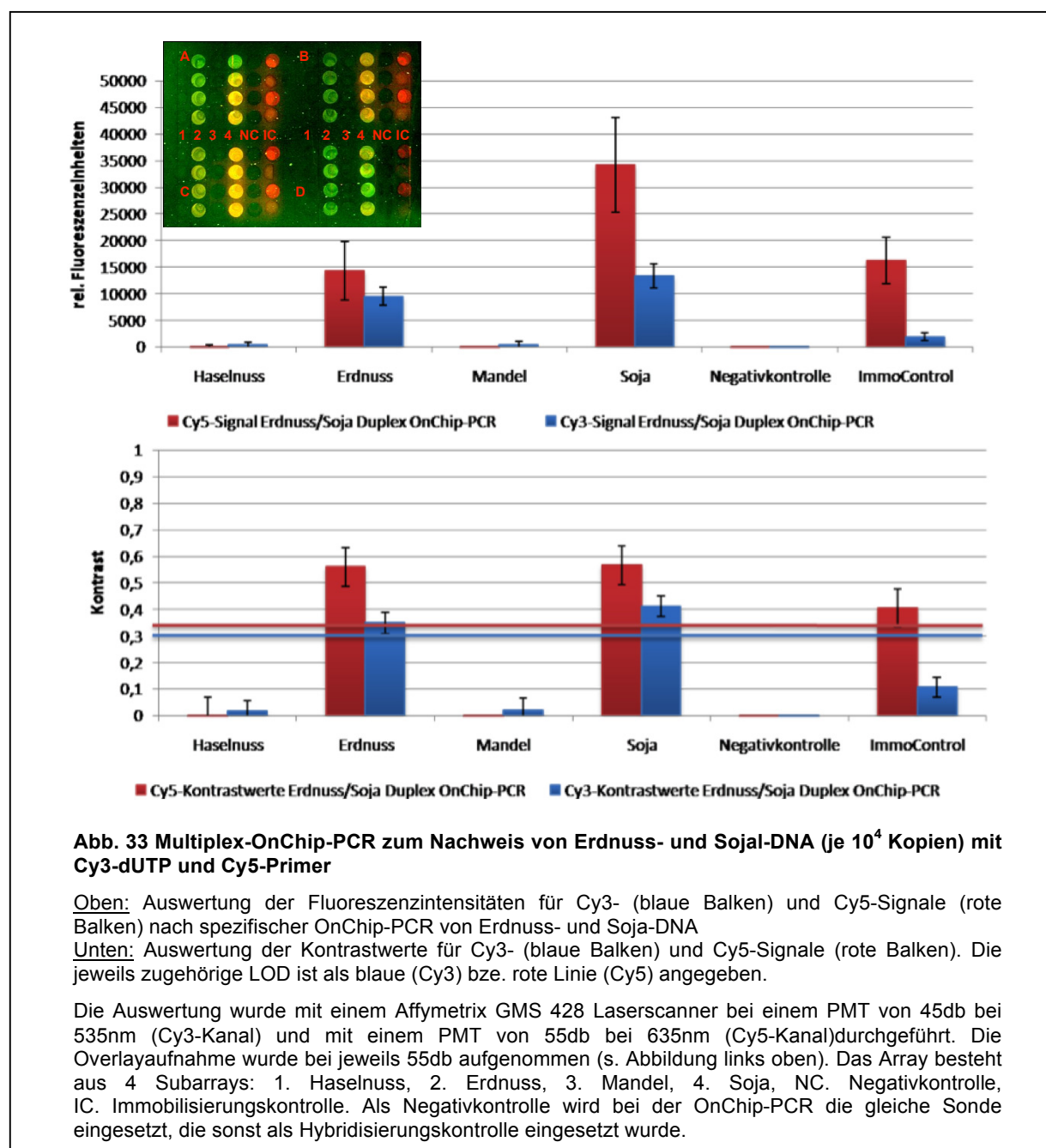


Das Ergebnis in Abb. 32 zeigt die positive OnChip-Amplifikation von Haselnuss-DNA. In dem Ergebnis konnte erfolgreich der Einbau von Cy3-dUTP und Cy5-markierten Primern gezeigt werden. Die Auswertung zeigt, dass der Cy3-Kanal ein etwas stärkeres Signal zeigt, als der Cy5 Kanal. Dies zeigt sich auch in dem Overlay-Bild, indem eine deutliche Grünfärbung darauf hindeutet, dass ein stärkeres Cy3-Signal vorliegt. Insgesamt ist der Zugewinn an Signalintensität bei Nutzung von Cy3 Fluoreszenz-dUTP im Vergleich zu Cy5-fluoreszenzmarkierten Primern relativ gering.

Die Auswertung über den Kontrast zeigt ebenfalls, dass die Kontrastwerte für Haselnuss sowohl bei der Messung im Cy3- als auch im Cy5-Kanal oberhalb der berechneten LOD liegen. Die Detektion von 10^4 Kopien Haselnuss-DNA konnte somit durch Einbau von Cy3-dUTP und Cy5-Primer erfolgreich in einer OnChip-PCR gezeigt werden. Das Ergebnis in der OnChip-PCR zeigt vergleichbar positive Ergebnisse, wie zuvor bei den Hybridisierungsversuchen.

4.3.3.3 Multiplex-OnChip-PCR mit Cy3-dUTP und Cy5-Primer

Nach dem erfolgreichen Einbau fluoreszenzmarkierter dUTP in Singleplex-OnChip-PCRs wurde der Einbau auch in Multiplex-OnChip-PCRs durchgeführt (s. Abb. 33).



Es wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der zuvor gezeigten Singleplex-OnChip-PCR eingesetzt. Die Signalintensitäten und Kontrastwerte lassen ein eindeutig positives Ergebnis für die nachzuweisenden DNA-Sequenzen von Erdnuss und Soja erkennen. Die Kontrastwerte liegen oberhalb der berechneten LODs für Cy3- oder Cy5-Signale.

Bei Betrachtung der Signalintensitäten fällt auf, dass das Signal für Cy3-dUTP geringer ausfällt als für Cy5-markierte Primer. Dies steht nicht in Übereinstimmung mit den zuvor beobachteten Ergebnissen, wo das Cy3-dUTP immer höhere Signale zeigte als der Cy5-Primer. Begründet liegt dies in der Anpassung der Laserstärke (PMT) des verwendeten Laserscanners, da das Cy3-Signal bei gleichen Einstellungen im Sättigungsbereich gelegen hätte und eine Quantifizierung nicht möglich gewesen wäre. Daher wurde der PMT für den Cy3-Kanal um 10db gesenkt, was einen relativ starken Abfall des Signals bewirkt. Die direkte Vergleichbarkeit zwischen Cy3- und Cy5-Signal ist daher nicht gegeben. Eine generelle Aussage über die Spezifität des Signals an den Positionen der Sonden für Erdnuss und Soja ist davon aber unbeeinflusst.

Die Betrachtung des Overlay-Scans (s. Abb. 33 oben links) zeigt die Aufnahme bei einem PMT von 45db für den Cy3- und 55db für den Cy5-Kanal. Die Falschfarbendarstellung stellt die Cy3-Signale grün und die Cy5-Signale rot dar. Für die Erdnuss-Sequenz ist eine klare Grünfärbung erkennbar, für die Soja-Sequenz eine Verschiebung in den Gelb-Bereich, die mit Cy5 markierten Immobilisierungskontrollen zeigen eine Rotfärbung. Wie bereits in den Hybridisierungsexperimenten unter 4.3.3.1 beschrieben, kommt es im Falle der Soja-Sequenz zu einer annähernd gleichen Signalstärke für Cy3 und Cy5, so dass sich im Falschfarbenbild die Gelbfärbung ergibt. Dies zeigt, dass an den immobilisierten Primern die spezifischen PCR-Produkte der OnChip-PCR vorliegen, da nur ein korrekt synthetisiertes Amplikon ein Cy3-Signal (über den Einbau von dUTP) und gleichzeitig ein Cy5-Signal (über den Einbau des Primers) zeigt.

Nachfolgend fasst eine Tabelle die getesteten Kombinationen von fluoreszenzmarkierten dUTP und Primern in Singleplex- und Multiplex-OnChip-PCRs zusammen.

Tabelle 6 Zusammenfassung der OnChip-PCR Versuche mit fluoreszenzmarkierten dUTP und Primern

	Singleplex-OnChip-PCR	Multiplex-OnChip-PCR	Zugewinn Signalintensität (gegenüber alleinigem Einsatz von Cy5-Primern)	Zugewinn Kontrastwerte (gegenüber alleinigem Einsatz von Cy5-Primern)
Cy3-dUTP	++(+) abhängig von der Sequenzlänge und Einbaurrate	++(+) abhängig von der Sequenzlänge und Einbaurrate	5-20%	1-5%
Cy5-dUTP+Cy5-Primer	+++	+++	20-25%	1-5%
Cy5-Primer	++	++	Basissignal	Basissignal

Zusammenfassung von insgesamt 12 erfolgreichen Experimenten zum Einbau von fluoreszenzmarkierten dUTP und Primern. Die Beurteilung erfolgte anhand der Auswertung der Signalintensitäten und der qualitativen Bewertung der Auswertung im Laserscanner.

+++ = gute Signalintensität; ++ = ausreichende Signalintensität

Generell konnten durch den Einbau von Cy3-dUTP gute Signalstärken erzielt werden, die aber je nach Sequenzlänge und Thymidin-Gehalt stark variieren. Gerade bei kurzen Sequenzen führt dies dazu, dass das Cy3-Signal kaum höher ist als das Signal, welches über den Cy5-Primer generiert wird. Es ist daher abzuwägen, ob der Einsatz von fluoreszenzmarkierten dUTP den gewünschten Effekt erzielt. Auf die Bewertung über den Kontrastwert hat der Einbau von fluoreszenzmarkierten dUTP keinen signifikanten Einfluss. Hier ist es vielmehr von Interesse, ab wann ein Signal klar von dem Hintergrund zu differenzieren ist und somit als positiv gewertet werden kann. Die Signalverstärkung bringt nur dann einen Vorteil, wenn in einem Assay nur sehr geringe Signale generiert werden, also sehr nahe an der Detektionsgrenze gearbeitet wird. In den durchgeführten Versuchen war bereits eine Detektion über Cy5-markierte Primer ausreichend sensitiv, um eine Differenzierung zwischen positiven und negativen bzw. spezifischen und unspezifischen Signalen über den Kontrastwert zu ermöglichen. Es wurde daher entschieden, die weiteren Versuche nur mit Cy5-markierten Primern durchzuführen.

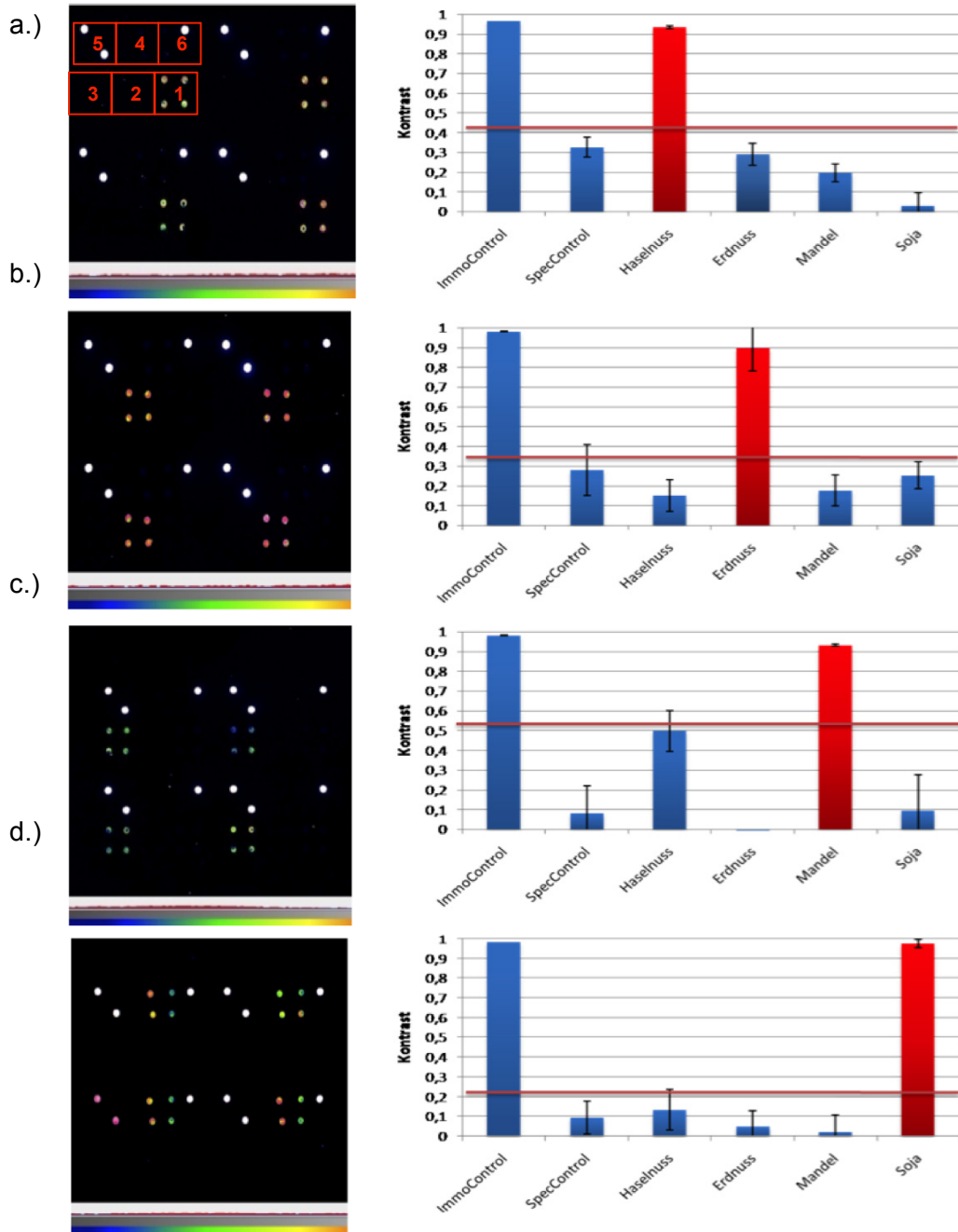
4.3.4 Nachweis von allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen mit Hilfe der OnChip-PCR

Nach den Optimierungsversuchen wurde die OnChip-PCR mit Referenz-DNAs und DNA-Isolaten aus verschiedenen Lebensmittelmatrixen in Singleplex- und Multiplex-OnChip-PCRs durchgeführt.

4.3.4.1 Nachweis über Singleplex-OnChip-PCR

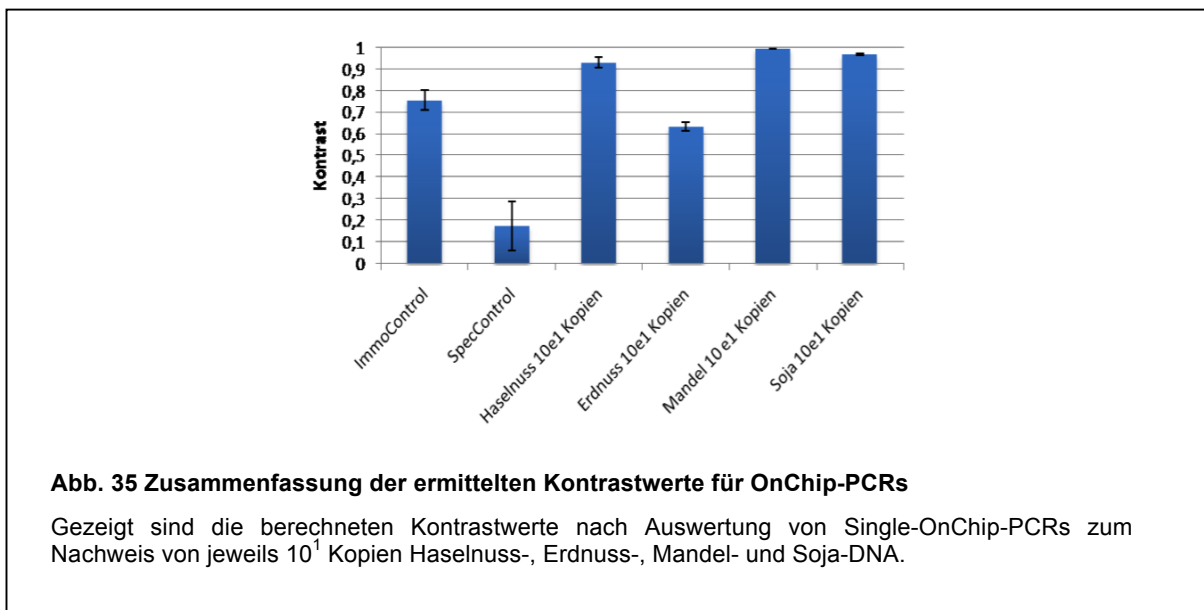
Für die ersten Versuche der Singleplex- und Multiplex-OnChip-PCR wurde mit einem Chiplayout gearbeitet, welches für die Detektion von Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA ausgelegt war. Die Auswahl wurde zunächst bewußt auf diese vier Spezies beschränkt, da hier bereits zu Beginn der Arbeiten die Bedingungen für Einzel- und Multiplex-PCR-Verfahren am Lightcycler optimiert werden konnten (s. Kapitel 4.2.1 - 4.2.4). Als Trägermaterial wurden epoxysilansierte Glassubstrate der Fa. Corning in Kombination mit Blocking durch gamma-Aminobuttersäure (GABA) verwendet. Die benötigten Primer wurden in einer Konzentration von 15µM immobilisiert. Als Kontrollen wurden Immobilisierungs- und Spezifitätskontrollen eingesetzt. Letztere entsprechen in ihrer Sequenz den Hybridisierungssonden und sollten in der OnChip-PCR kein spezifisches Signal zeigen. Für alle Versuche wurden die Titanium Taq Polymerase und Cy5-markierte Primer für die spätere Detektion der synthetisierten PCR-Produkte verwendet. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laserscanningsystem.

Als Ausgangsmatrix für die nachfolgend gezeigten Singleplex-OnChip-PCRs wurden jeweils 10^7 Kopien der Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA eingesetzt, um zunächst die Spezifität der entwickelten Verfahren zu überprüfen.



Die ersten Versuche zur Detektion von Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA über die Singleplex-OnChip-PCRs konnte erfolgreich gezeigt werden. Die Ergebnisse in Abb. 34 zeigen positive Signale an den Sondenpositionen und die Validierung über die Beurteilung der Kontrastwerte zeigt, dass die jeweils spezifischen Kontrastwerte oberhalb der

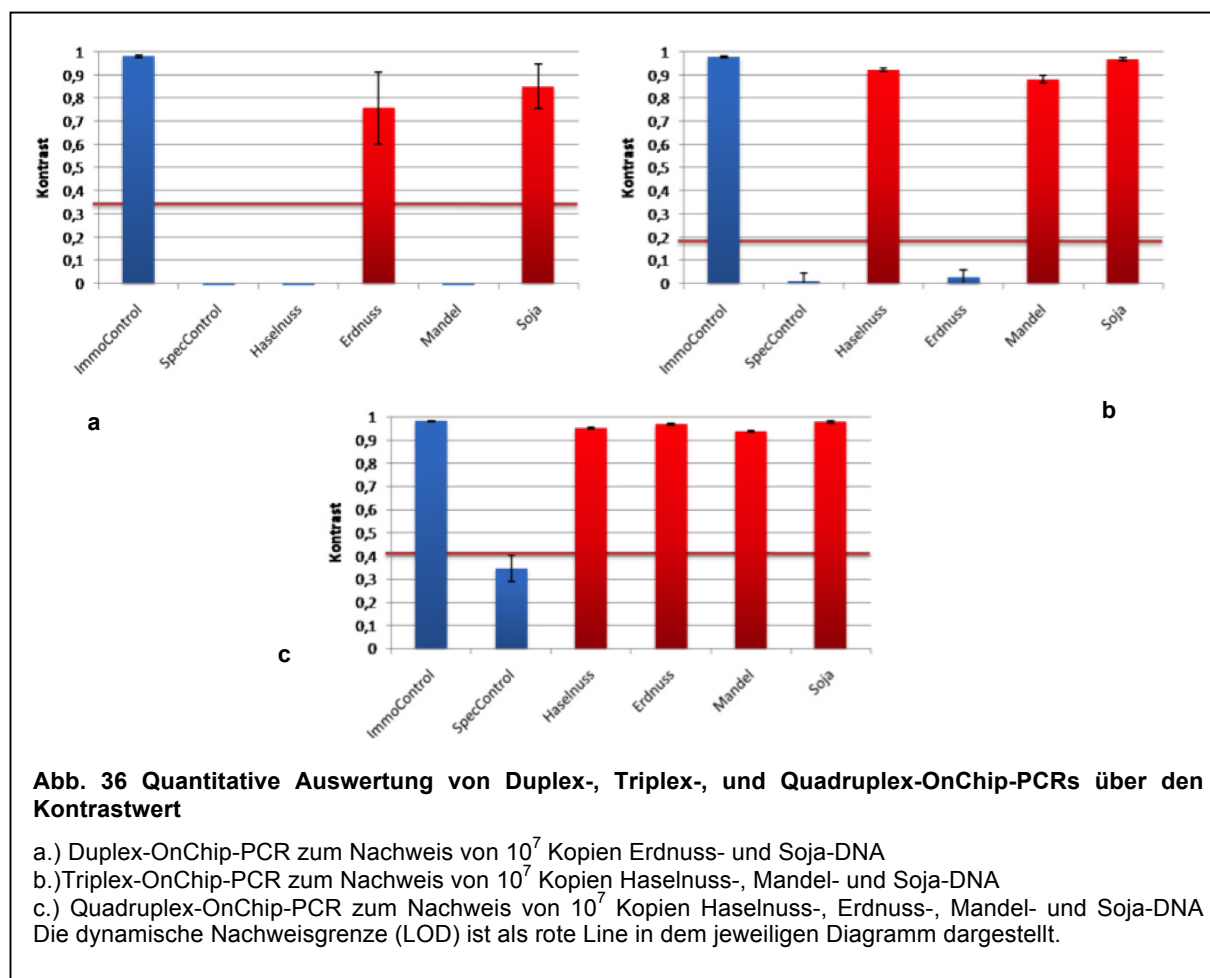
berechneten Schwellenwerte liegen. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, eine spezifische OnChip-Amplifikation der gesuchten Ausgangsmatrizen durchzuführen. Die eingesetzte Menge an Ausgang-DNA betrug jeweils 10^7 Kopien, die für eine diagnostische Anwendung benötigte Nachweisgrenze liegt zwischen $5 \cdot 10^3$ Kopien. Daher wurde eine dekadischen Verdünnungsreihe von 10^7 - 10^0 Kopien für jede der vier Referenz-DNAs hergestellt und die einzelnen Verdünnungsstufen in einer OnChip-PCR eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen blieben identisch zu den vorhergegangenen Versuchen. Die Auswertung erfolgte ebenfalls über die Berechnung der Kontrastwerte.



Das Diagramm (s. Abb. 35) zeigt die Zusammenfassung der jeweils ermittelten Kontrastwerte nach Auswertung der OnChip-PCR. Eine LOD wurde zwar für die einzelnen Arrays berechnet, da es sich hier aber um eine Zusammenfassung von mehreren Versuchen handelt, ist die Berechnung einer allgemeinen LOD nicht möglich. Die Angabe müsste für jeden einzelnen Chip erfolgen. Es konnten bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^1 Kopien noch sehr gute Kontrastwerte ermittelt werden. Versuche eine eindeutige Differenzierung bei niedrigeren Konzentrationen zu erzielen scheiterten. Allerdings liegt die Sensitivität bei den OnChip-Amplifikationsverfahren für Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA mit einer unteren Nachweisgrenze von 10^1 Kopien innerhalb des diagnostischen Grenzbereiches. Es konnte somit gezeigt werden, dass die entwickelte OnChip-PCR prinzipiell für den sensitiven Nachweis von geringen Mengen potentiell allergener Inhaltsstoffe geeignet ist.

4.3.4.2 Nachweis über Multiplex-OnChip-PCR

Nach der Durchführung von Singleplex-OnChip-PCRs wurden nachfolgend verschiedene Kombinationen von Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA in Multiplex-OnChip-PCRs eingesetzt. Hierzu wurden zunächst jeweils DNA-Mengen von 10^7 Kopien in den Multiplex-PCRs eingesetzt. Die Multiplex-PCRs wurden mit den optimierten Primerverhältnissen, die zuvor in Versuchen am Lightcycler ermittelt wurden (s. 4.2.1 – 4.2.4), durchgeführt. Die Glassubstrate für diese Versuche sind epoxysilanisiert und wurden mit GABA geblockt. Alle Sonden und Kontrollen wurden in dem unter 4.3.4.1 beschriebenen Layout mit dem TopSpot Arrayer gespottet. Die Detektion erfolgte über Cy5-markierte Primer. Die Auswertung erfolgte über die Berechnung der Kontrastwerte an den jeweiligen Sondenpositionen. Nachfolgend sind die quantitativen Ergebnisse gezeigt, die nach Duplex-, Triplex-, und Quadruplex-OnChip-PCR ermittelt wurden.



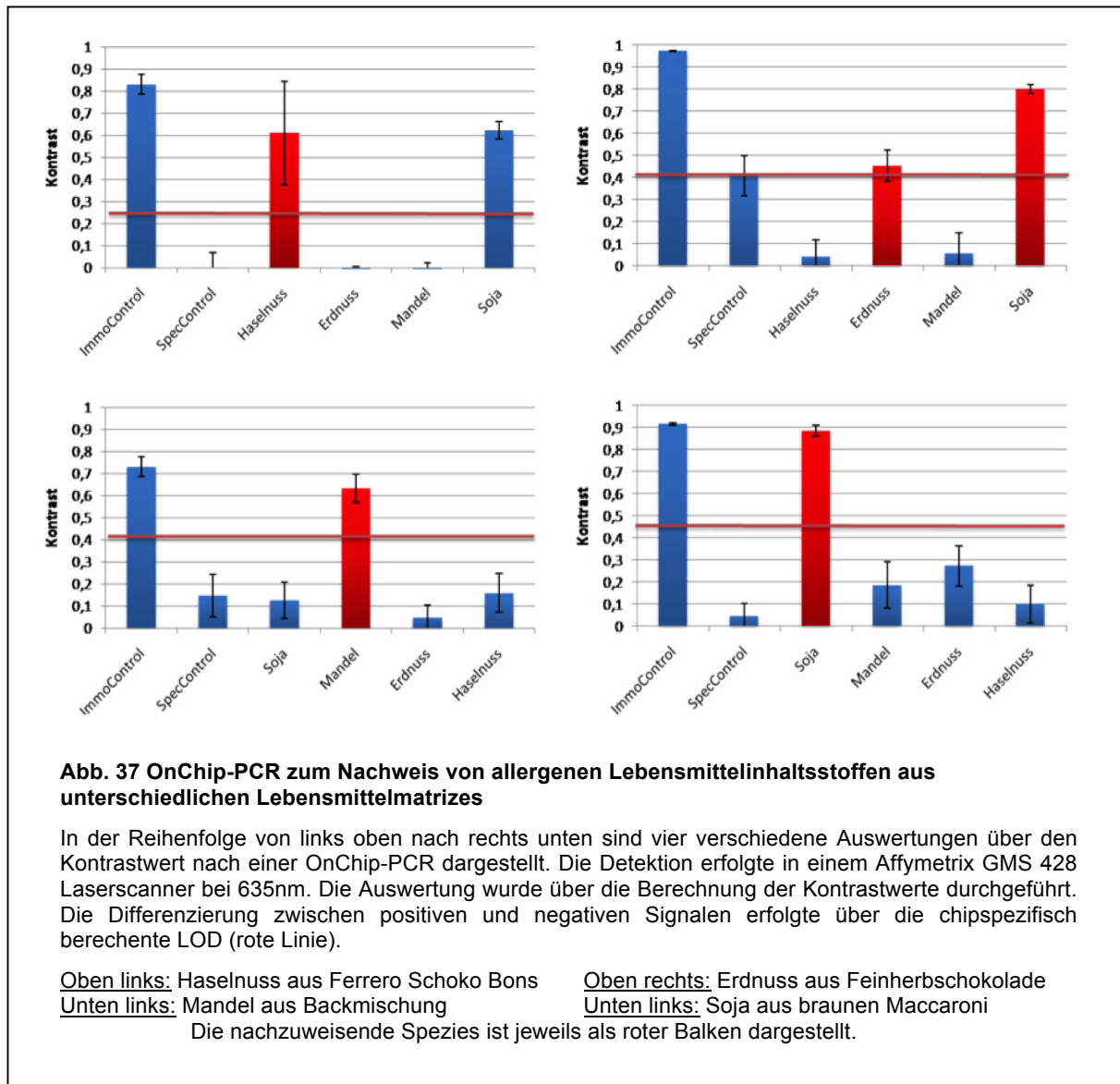
Wie in Abb. 36 gezeigt, wurden die DNAs von vier lebensmittelallergenen Spezies in verschiedenen Multiplex-Kombinationen in der OnChip-PCR eingesetzt. Die Bewertung über den Kontrastwert ermöglichte mit Hilfe des berechneten Schwellenwertes (LOD) in allen Fällen eine eindeutige Diskriminierung der spezifischen von den unspezifischen Signalen. Die Ergebnisse zeigen, dass die im Vorfeld entwickelten PCR-Verfahren geeignet sind, um sie in OnChip-PCR-Verfahren einzusetzen, ohne dass an der Zusammensetzung der PCR-Komponenten weitere Optimierungen nötig sind. Entscheidend sind bei den OnChip-PCR-Verfahren demnach vor allem die verwendeten Glassubstrate und Oberflächenmodifikationen, sowie geeignete Thermocycler.

4.3.4.3 Detektion von allergenen Lebensmitteleinhaltsstoffen aus Realproben über die OnChip-PCR

Nach Versuchen mit Referenz-DNAs, in denen die Spezifität und Sensitivität der OnChip-PCR getestet wurde, sind Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA aus verschiedenen Lebensmittelmatrizes in der OnChip-PCR eingesetzt worden. Im Gegensatz zu den Referenzproben, handelt es sich in den nachfolgenden Versuchen um isolierte Gesamt-DNA aus unterschiedlichen Lebensmittelproben bzw. einer Lebensmittelmatrix, die nachträglich mit Referenz-DNAs einer bekannten Konzentration versetzt wurde. Bei diesem DNA-Gemisch muss die Zielsequenz demnach vor einem hohen unspezifischen DNA-Hintergrund detektiert werden. Dies stellt erhöhte Anforderungen an das Testverfahren, um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden. Durch die erhöhte DNA-Konzentration in dem Reaktionsansatz ist auch eine effiziente Blockierung der reaktiven Gruppen an der Glasoberfläche entscheidend, um unspezifische Bindungen der DNA an der Glasoberfläche und einen damit verbundenen Anstieg des Hintergrundsignals zu minimieren.

Nachfolgend werden exemplarisch Ergebnisse zum Nachweis von Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-Verunreinigungen mit Hilfe einer Singleplex-OnChip-PCR nach Auswertung über den Kontrastwert gezeigt (s. Abb. 37). Die Versuche wurden auf epoxysilanisierten Glassubstraten in Kombination mit einem Blocken durch GABA durchgeführt. Die Sonden sind in einer Konzentration von 15µM kovalent über einen C6-Aminolinker immobilisiert worden. Die OnChip-PCR wurde wie unter 3.5.5 beschrieben vorbereitet.

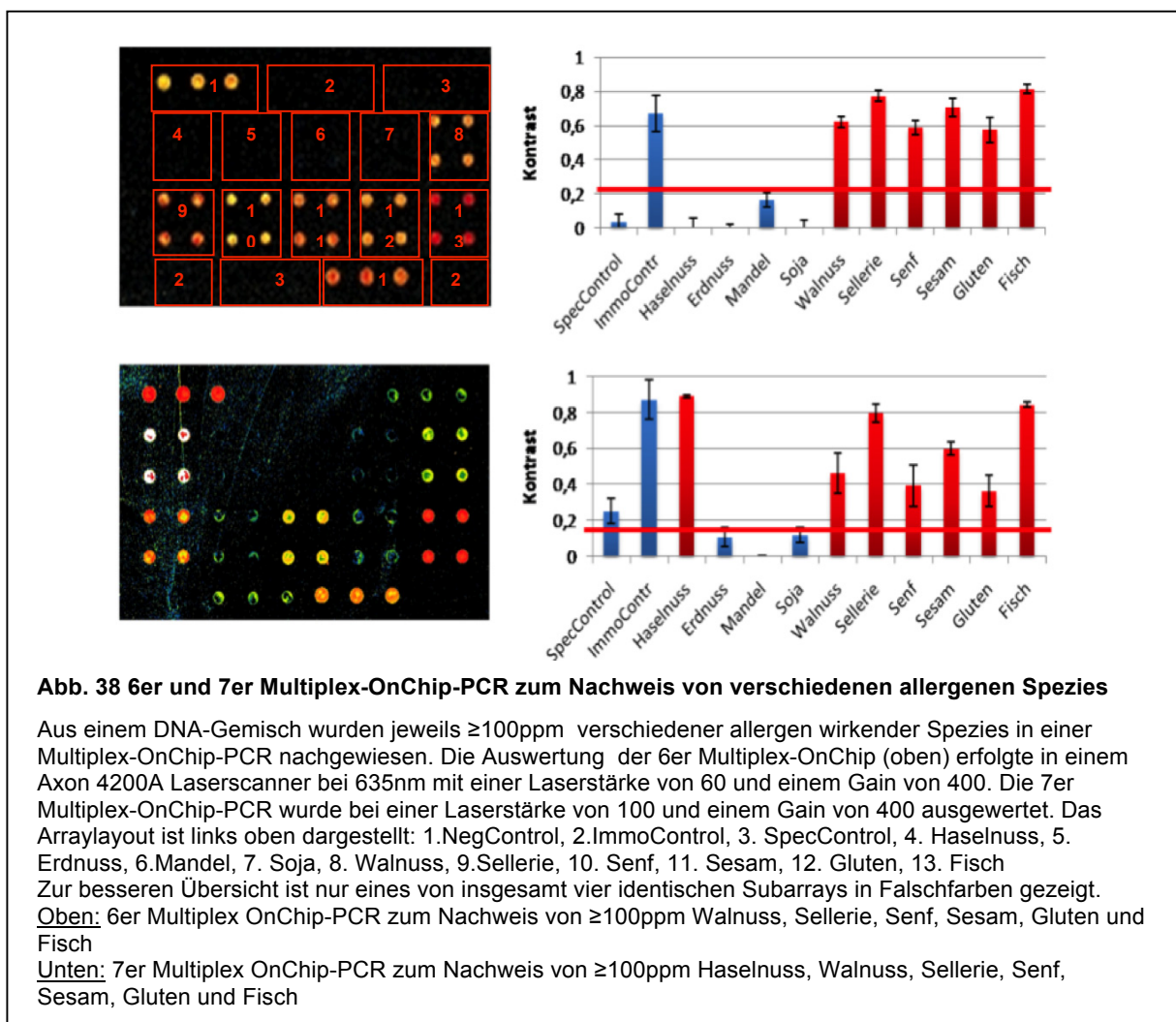
Die eingesetzten DNA-Mengen sind sowohl aus einem hohen als auch einem niedrigen ppm-Bereich gewählt worden, um zu testen, wie leistungsfähig die entwickelte OnChip-PCR bezüglich der Sensitivität und Spezifität bei dem Nachweis von allergenen Kontaminationen in Lebensmittelproben ist.



Die Ergebnisse in Abb. 37 zeigen in der oberen Reihe zwei Auswertungen von OnChip-PCRs zum Nachweis von Haselnuss- bzw. Erdnuss-DNA aus verschiedenen Schokoladenprodukten. Die Haselnuss-DNA wurde aus einem Schokoladenbonbon mit einem 5,8%igen Anteil an Haselnuss isoliert und anschließend amplifiziert. Sie diente zunächst als Positivnachweis. Die OnChip-PCR zum Nachweis der Erdnuss-DNA aus Feinherbschokolade erfolgte hingegen im niedrigen ppm-Bereich. Es konnte erfolgreich eine Verunreinigung mit 10ppm Erdnuss nachgewiesen werden. Neben den spezifischen Amplifikaten wurden allerdings in beiden OnChip-PCRs starke Signale für Soja-DNA detektiert. Diese Signale sind nicht unspezifisch, sondern basieren vermutlich auf dem Vorhandensein von Sojalecithin, welches in der Schokoladenproduktion als Emulgator Verwendung findet. Da in der OnChip-PCR die Gesamt-DNA eingesetzt wird und in dem Reaktionsansatz Primersysteme für den Nachweis von Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-DNA vorhanden sind, kommt es somit zu einer parallelen Detektion von Soja- und

Haselnuss- bzw. Erdnuss-DNA in den untersuchten Schokoladenprodukten. Für den Nachweis von Mandel-DNA (s. Abb. 37 unten links) wurden 50ppm Mandel Referenzmaterial in Backmischung gemischt und anschließend in einer OnChip-PCR detektiert. Das vierte Diagramm zeigt den Nachweis >10ppm Soja aus braunen Maccaroni. In beiden OnChip-Amplifikationen konnten spezifische Nachweise aus unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes erbracht werden.

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die OnChip-PCR für den Einzelnachweis von allergenen Kontaminationen aus unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes geeignet ist, wurde überprüft, wie hoch die Leistungsfähigkeit der entwickelten Multiplex-OnChip-PCR ist. Dazu wurde getestet, wie viele verschiedene Ausgangsmatrizes maximal parallel in einem Reaktionsansatz amplifizierbar sind. Zunächst wurde das Arraylayout für die parallele Detektion von 10 verschiedenen potentiell allergen wirkenden Spezies erweitert, so dass mit diesem Layout alle diagnostisch relevanten Lebensmittellallergene detektiert werden können. Dazu wurden in dem Layout neben den bereits getesteten Spezies Haselnuss, Erdnuss, Mandel und Soja auch Primer für die OnChip-Amplifikation von Walnuss, Sellerie, Senf, Sesam, Gluten und Fisch in einer Konzentration von jeweils 15µM immobilisiert.



Mit Hilfe der Multiplex-OnChip-PCR konnten verschiedene Allergen- bzw. Spezies-spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert und parallel nachgewiesen werden. Für diese Versuche wurden Kombinationen von bis zu 10 unterschiedlichen allergen wirkenden Spezies in Multiplex-OnChip-PCRs überprüft. Die Ergebnisse in Abb. 38 zeigen, dass mit dem entwickelten OnChip-PCR-Verfahren eine parallele Amplifikation von bis zu maximal sieben verschiedenen allergen wirkenden Spezies aus einem DNA-Gemisch möglich ist. Da nicht von allen zu testenden Spezies (Inhaltsstoffen) Referenzmaterial verfügbar war, wurden DNA-Proben aus verschiedenen Lebensmittelmatrizes miteinander vermischt, um ein möglichst große Anzahl parallel zu testender DNAs zur Verfügung zu haben. Die Sensitivität bei den in Abb. 38 gezeigten Ergebnissen ist daher nicht genau anzugeben, liegt aber in Abhängigkeit der verwendeten Lebensmittelmatrizen bei $\geq 100\text{ppm}$. Multiplex-OnChip-PCR-Ansätze mit mehr als sieben verschiedenen DNAs konnten nicht erfolgreich amplifiziert werden. Hier kam es zu unspezifischen Amplifikationen oder es wurden weniger Zielsequenzen amplifiziert, als erwartet. So wurden z.B. in einer 8er-Multiplex-OnChip-PCR nur sechs Zielsequenzen spezifisch detektiert. Ferner war zu beobachten, dass mit steigender Anzahl einige der Zielsequenzen weniger effizient amplifiziert wurden. So sieht man z.B. im Vergleich zwischen der gezeigten 6er- und 7er-Multiplex-OnChip-PCR, dass bei letzterer Gluten und Senf relativ schwache und unsaubere Signale zeigten und an der Spezifitätskontrolle ebenfalls ein Signal detektiert werden konnte. Die unspezifischen Signale an der Position der Kontrollen traten während der OnChip-PCR-Versuche nur sporadisch auf. In der Mehrheit konnten keine Signale für die Spezifitätskontrollen oberhalb der jeweils berechneten LOD detektiert werden. Dies läßt den Schluß zu, dass die Auswahl der entsprechenden Sequenz prinzipiell als Kontrolle geeignet ist. Da es keine Unterschiede zwischen den jeweils in der Multiplex-OnChip-PCR verwendeten Reaktionsansätzen mit Ausnahme der Primersysteme und DNA-Matrizen gab, ist ein negativer Einfluß auf die Amplifikation, bspw. durch eine erhöhte MgCl_2 -Konzentration, auch auszuschließen. Eventuell könnte eine zu niedrige Temperatur im Annealingschritt zu den unspezifischen Amplifikaten geführt haben. Generell ist bei dem Chip mit dem die 7er Multiplex-OnChip-PCR durchgeführt wurde, partiell ein leicht erhöhtes Hintergrundsignal durch leichte Eintrocknungseffekte zu erkennen, die Auswertung des Chips wird dadurch allerdings nicht nachhaltig beeinträchtigt, wie der niedrige dynamische Schwellenwert von 0,2 (entspricht 20% Kontrast) zeigt.

4.3.5 Abschließende Bewertung der OnChip-PCR Versuche

Die OnChip-PCR ist ein Verfahren, welches die Sensitivität der PCR mit der Multiparameteranalytik eines Microarrays kombiniert. Dadurch wird es möglich, mehrere Zielsequenzen parallel zu amplifizieren und direkt im Anschluss an den Amplifikationsschritt die Detektion durchzuführen. Realtime-PCR-Verfahren bieten ebenfalls die Möglichkeit, Amplifikation und Detektion in einem Reaktionsschritt durchzuführen, scheitern aber bei der Multiparameteranalyse derzeit noch an der eingeschränkten Anzahl an möglichen Detektionskanälen. So können mit aktuellen Geräten theoretisch maximal sieben Parameter parallel in einem Reaktionsansatz analysiert werden. Um dies zu ermöglichen, bedarf es einer genauen Kalibrierung der fluoreszenzbasierten Detektion, um ein Übersprechen (Crosstalk) der Detektionskanäle zu vermeiden. In der OnChip-PCR wird dies vermieden. Durch die orts aufgelöste Immobilisierung auf einem planaren Trägersubstrat wird nur ein Fluoreszenzfarbstoff für die Auswertung aller Parameter benötigt. Ein weiterer Vorteil der OnChip-PCR gegenüber konventionellen PCR-Verfahren liegt bei dem Primerdesign bzw. der Auswahl der Zielsequenzen für Multiplex-Ansätze. Generell findet eine Analyse von PCR-Produkten über Gelelektrophorese (Agarose- oder Polyacrylamidgel) bzw. im Falle der Realtime-PCR über den Schmelzpunkt des synthetisierten Amplikons statt. Dies setzt voraus, dass die gewählten Zielsequenzen entweder in ihrer Größe oder ihrer Schmelztemperatur voneinander eindeutig zu unterscheiden sind. Das ist ein Faktor, der bei dem Primerdesign berücksichtigt werden muss und ggf. die Auswahl geeigneter Primersysteme erschweren kann. Für die OnChip-PCR ist dies vernachlässigbar, da mit der orts aufgelösten Immobilisierung eine eindeutige Differenzierung unabhängig von Amplikonlänge oder Schmelzpunkt bereits gegeben ist.

Grundlage für die OnChip-PCR ist eine geeignete Kombination aus Trägersubstrat und Oberflächenchemie, die eine zuverlässige Immobilisierung der Primer auch während der hohen Temperaturen im Thermocycling ermöglicht. In dieser Arbeit wurde daher mit zwei verschiedenen oberflächenfunktionalisierten Glassubstraten gearbeitet: Aminosilanisierten und epoxysilanisierten Glassubstraten. Generell haben sich Glassubstrate für die Durchführung von Microarrayexperimenten auf Grund ihrer optischen Eigenschaften und Widerstandsfähigkeit bewährt. Durch die geringe Porösität der Oberfläche kann mit geringen Probenvolumina gearbeitet werden, was sich positiv auf die Reaktionskinetik auswirkt. Nicht zuletzt besitzt Glas eine geringe Eigenfluoreszenz, so dass es ein geringes Hintergrundsignal erzeugt [132]. Ein weiteres wichtiges Kriterium für die OnChip-PCR ist die Hitzebeständigkeit von Glas. Durch die Denaturierungsschritte bei 95°C während des Thermocyclings muss das verwendete Trägersubstrat formstabil bleiben, um eine Planarität

der Oberfläche und spätere Auswertbarkeit der OnChip-PCR zu gewährleisten. Versuche mit Polymersubstraten scheiterten daher an der nicht ausreichenden Hitzebeständigkeit, die Substrate wurden weich und verformten sich während des Denaturierungsschrittes in der OnChip-PCR. Die unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen zeigten während der Versuche sowohl in Hybridisierungs- als auch OnChip-PCR-Versuchen qualitative Schwankungen. Mit den zu Beginn der Arbeiten eingesetzten aminosilanisierten Glassubstraten der Fa. Genetix wurden in Kombination mit dem Blocken der Oberfläche nach der von Diehl et. al. beschriebenen Methode gute Kontrastwerte ermittelt. Nachdem es aber zu nachhaltigen Qualitätsproblemen seitens des Herstellers kam, wurde auf eine inzwischen neu verfügbare Oberflächenfunktionalisierung gewechselt. Epoxysilanisierte Glassubstrate zeigten in Vergleichsstudien bessere Spothomogenitäten und Signal/Hintergrundverhältnisse als amino- oder aldehydsilanisierte Substrate [133].

Neben der Qualität der verwendeten Trägersubstrate ist auch die effiziente Blockierung freier reaktiver Oberflächengruppen wichtig, um unspezifische Hintergrundsignale bei der Auswertung zu minimieren. Für die epoxysilanisierten Substrate konnte mit der gamma-Aminobuttersäure ein chemisches Blockingreagenz gefunden werden, welches im Vergleichstest zu der Standardmethode mit Ethanolamin höhere Signalintensitäten bei minimiertem Hintergrundsignal bewirkte.

Ferner ist die Art der Immobilisierung sowie die Konzentration, mit der die Primer auf der Oberfläche gekoppelt werden, für die Qualität der OnChip-PCR entscheidend. Ein Vergleich zweier epoxysilanisierter Glassubstrate der Fa. Schott und Corning wurde im Rahmen der Arbeit durchgeführt, um die Faktoren Blocking, optimale Immobilisierungskonzentration und Oberflächenqualität zu evaluieren (s. 4.3.1). Die Ergebnisse zeigten, dass die Glassubstrate der Fa. Corning stärkere Signale bei vergleichbaren Kontrastwerten zeigten als Substrate der Fa. Schott. Generell konnten auf epoxysilanisierten Substraten bei einer Immobilisierungskonzentration von 6-15 μ M die höchsten Signalintensitäten gemessen werden. Eine weitere Erhöhung der Immobilisierungskonzentration zeigte einen Rückgang in der Signalintensität, was auf eine sterische Hinderung durch eine zu hohe Moleküldichte in den einzelnen Spots zurückzuführen ist. Es ist dabei zu beachten, dass die für die Immobilisierung eingesetzte DNA-Konzentration nicht gleichzusetzen ist mit der tatsächlich auf der Chipoberfläche immobilisierten DNA-Konzentration. Vielmehr handelt es sich um die benötigte DNA-Konzentration, die eine optimale Belegungsdichte auf der Chipoberfläche in einem Spot gewährleistet. In Publikationen von Kleinjung et al. [134] und Adessi et al. [98] konnte nachgewiesen werden, dass zwischen 11-14fmol/mm² DNA gebunden werden kann, ohne dass es zu einer Einschränkung enzymatischer Reaktionen auf Grund sterischer Hinderung kommt.

Ferner haben frühere Publikationen gezeigt, dass ein „Abstandshalter“ zwischen dem Primer und der Oberfläche eine bessere Zugänglichkeit des Moleküls für Hybridisierungsexperimente oder enzymatische Reaktionen bewirkt [110, 135]. In der vorliegenden Arbeit wurden Primer mit poly-T-Spacern (18 nt) und C6-Aminolinkern versehen. Die Immobilisierung erfolgte im Falle der aminosilanisierten Substrate kovalent über 5'-phosphorylierte-Primer und bei epoxysilanisierten Substraten über einen am 5'-Ende gekoppelten C6-Aminolinker.

Auf Grundlage der durchgeführten Versuche wurden als Basis für die OnChip-PCR epoxysilanisierte Glassubstrate der Fa. Corning in Kombination mit GABA-Blocking sowie einer kovalenten Immobilisierung von C6-Aminolinker-modifizierten Primern in einer Konzentration von 15µM eingesetzt. Im Vergleich zu der für die OnChip-PCR beschriebenen optimalen Immobilisierungskonzentration auf aminosilanisierten Substraten von 25-50µM [98] konnte eine Reduzierung um ca. 40-70% erreicht werden.

Die Entwicklung, Durchführung und Optimierung der verwendeten PCR-Verfahren ist bereits in den Abschnitten 4.2.1 bis 4.2.4 eingehend betrachtet worden. Die entwickelten Verfahren konnten erfolgreich für die OnChip-PCR adaptiert werden. Ein Vergleich zweier verschiedener HotStart-Polymerasen hinsichtlich der Amplifikationseffizienz in der OnChip-PCR wurde durchgeführt. Die Versuche mit FastStart- und Titanium Taq-Polymerase zeigten, dass beide getesteten Polymerasen vergleichbar gute Ergebnisse in der OnChip-PCR lieferten. Allerdings wurden bei Verwendung der Titanium Taq-Polymerase höhere Signalintensitäten ermittelt als mit der FastStart-Polymerase. Um eine möglichst hohe Sensitivität in der OnChip-PCR zu gewährleisten, wurde daher mit der Titanium Taq-Polymerase gearbeitet. Die Sensitivität der OnChip-PCR ist wichtig, um auch DNA-Spuren nachweisen zu können. Dies war besonders für die Detektion von versteckten Allergenen in Lebensmitteln von Interesse. Da einige Lebensmittelinhaltsstoffe bereits in geringsten Konzentrationen auf sensibilisierte Menschen allergen wirken können, muss die OnChip-PCR in der Lage sein, auch DNA von wenigen ppm des allergieauslösenden Inhaltsstoffes in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes nachweisen zu können. Hierfür ist zunächst eine leistungsfähige Methode zur DNA-Isolation notwendig, da einige Lebensmittelmatrizes einen sehr hohen Fett-, Salz-, Zucker- oder Proteinanteil aufweisen können, die eine DNA-Isolation erschweren oder nachfolgende PCR-Verfahren inhibieren. Eine weitere Schwierigkeit stellen die unterschiedlichen Prozessierungsgrade der Lebensmittelinhaltsstoffe dar, die eine Vielzahl unterschiedlicher Verarbeitungsschritte bei verschiedenen Temperaturen durchlaufen und somit in stark veränderter Form in dem finalen Lebensmittel vorliegen können. Für die Isolation der DNA aus verschiedensten Lebensmittelmatrizes wurde daher mit einem speziell für diesen Zweck entwickelten kommerziellen Isolationsverfahren der Fa. Congen gearbeitet. Auf Grund des hohen Prozessierungsgrades der Lebensmittel, sollte bei

dem Design der PCR darauf geachtet werden, dass die nachzuweisenden Zielsequenzen nicht zu groß gewählt werden, um zu gewährleisten, dass auch stark prozessierte Inhaltsstoffe von denen ggf. nur noch stark fragmentierte DNA in dem Lebensmittel vorliegt, über die PCR nachweisbar sind. Die in der OnChip-PCR gewählten Zielsequenzen lagen daher in einem Bereich von 50-250bp, so dass der Prozessierungsgrad keinen negativen Einfluss auf die Nachweisbarkeit der gesuchten allergenen Inhaltsstoffe hat. Wie eingangs erwähnt wurde, wäre es in der OnChip-PCR nicht nötig gewesen, auf eine Größenunterscheidung der PCR-Produkte zu achten. Da aber zunächst die PCR-Verfahren entwickelt und validiert werden mussten, war dabei eine Differenzierung über Agarosegelelektrophorese nötig. Für die nachfolgenden OnChip-PCR-Verfahren wurden die PCR-Systeme dann übernommen.

Mit Hilfe der OnChip-PCR war es möglich, Verunreinigungen allergener Lebensmittelinhaltsstoffe aus unterschiedlichen Matrices nachzuweisen. Dabei konnten z.T. Verunreinigungen von <10ppm aus Lebensmitteln bzw. 10 DNA-Kopien von Haselnuss-, Erdnuss-, Mandel- und Soja-Referenzmaterial über Singleplex-OnChip-PCRs nachgewiesen werden.

Um die Leistungsfähigkeit der Multiplex-OnChip-PCR zu testen, wurde ein Gemisch aus isolierter Gesamt-DNA verschiedener Lebensmittelmatrices verwendet. Die Verunreinigungen variierten dabei je nach eingesetzter Lebensmittelmatrix von <10 - 100ppm. In Multiplex-OnChip-PCRs konnten spezifisch bis zu sieben verschiedene allergene Spezies parallel in einem Reaktionsansatz detektiert werden. Die Sensitivität war allerdings geringer als in Singleplex-OnChip-PCR-Verfahren. Zukünftige Arbeiten werden weitere Vergleichsstudien mit bestehenden Verfahren wie Realtime-PCR und ELISA einschließen, um die entwickelten OnChip-PCR-Verfahren ausführlich zu validieren.

Im Vergleich zu den Hybridisierungsverfahren, die in Kombination mit Singleplex- und Multiplex-PCR-Verfahren für den Nachweis von allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen durchgeführt wurden (s. Abschnitt 4.2.5), konnte mit der OnChip-PCR eine vergleichbare Spezifität erzielt werden. Die Sensitivität war jedoch niedriger als bei konventionellen PCR-Verfahren, dies galt insbesondere für die Multiplex-OnChip-PCR. Die entwickelte Multiplex-PCR konnte bei konventioneller Durchführung mit anschließender Hybridisierung bis zu neun verschiedene Spezies detektieren, in der Multiplex-OnChip-PCR gelang dies für sieben Spezies. Die geringere Sensitivität kann damit begründet werden, dass auf Grund der Immobilisierung einer der beiden Primer, die Amplifikation nicht über den gesamten Verlauf der PCR exponentiell verläuft, sondern in eine lineare Amplifikation übergeht. Mercier et al. haben dazu verschiedene Modellierungsansätze publiziert [136, 137], in denen sie beschreiben, dass während der ersten Zyklen der OnChip-PCR eine Grenzflächenreaktion

stattfindet, in der die Amplifikation zunächst noch exponentiell verläuft. Mit steigender Zyklenzahl kommt es dann nach und nach zu einem „crowding effect“, der bewirkt, dass die Amplifikation nur noch linear an den immobilisierten Primern stattfindet. Als „crowding effect“ bezeichnen die Autoren das Phänomen, dass zwei freie Moleküle sich sterisch behindern, wenn sie weniger als ihren Kreisradius als Abstand zueinander haben. Das bedeutet, dass sobald ein Molekül an einem immobilisierten Primer amplifiziert wurde, eine weitere Kopie dieses Moleküls an einem immobilisierten Primer in der Nähe der bereits immobilisierten Ausgangsmatrize synthetisiert wird. Steigt die Anzahl der immobilisierten PCR-Produkte innerhalb eines Spots mit steigender Zyklanzahl, so gehen die Autoren davon aus, dass es bereits nach wenigen Zyklen zu einer sterischen Behinderung kommt. Die weitere Amplifikation wird dann zunehmend inhibiert. Die Autoren stützen ihr Modell allerdings auf die von Adessi et al. beschriebene OnChip-PCR, die aber im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten OnChip-PCR-Ansatz auf einer „Brückenamplifikation“ beruht. Bei der Brückenamplifikation sind beide Primer an der Oberfläche amplifiziert, so dass nach den ersten PCR-Zyklen die an einem Primer immobilisierten DNA-Stränge für einen nachfolgenden Amplifikationszyklus an den jeweils immobilisierten Gegenprimer binden müssen. Dies geschieht über eine Art Brückenbildung [98]. Bei diesem OnChip-PCR Ansatz tritt die Theorie über einen „crowding effect“ wie er von Mercier et al. beschrieben wird zu einem relativ frühen Zeitpunkt ein. Bei dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz ist hingegen nur ein Primer immobilisiert und der Gegenprimer in Lösung. Das bedeutet, dass während der Amplifikation keine Brückenbildung stattfindet. Dadurch sollte es auf Grund des geringeren Abstandes den die Moleküle zu einander benötigen, erst später zu einem „crowding effect“ kommen. In verschiedenen Publikationen wurde beschrieben, dass die Effizienz der OnChip-Amplifikation verbessert werden kann, wenn der immobilisierte Primer zu einem geringen Anteil ebenfalls in Lösung vorliegt [100, 104, 138-140]. In dieser Arbeit wurde der immobilisierte Primer in einem Verhältnis von 1:10 eingesetzt. Unter Betrachtung des Modells von Mercier et al. findet demnach eine parallele Amplifikation in der Flüssig- und an der Festphase statt. Wenn die Primer in der Flüssigphase komplett für die Synthese verbraucht wurden, wird die Amplifikation nur noch an der Festphase weitergeführt. Die „Katalysatorreaktion“ in der Flüssigphase findet dabei exponentiell statt und stellt nach den ersten Zyklen ein Art Voramplifikation dar, in der die Konzentration des Ausgangsmaterials für die finale Festphasen-PCR erhöht wird. Ein „crowding effect“ sollte erst in späteren Zyklen der OnChip-PCR auftreten und dadurch die Amplifikation über einen verlängerten Zeitraum exponentiell möglich sein. Demnach sollte der in dieser Arbeit verwendete Ansatz eine verbesserte Amplifikationseffizienz aufweisen als der von Adessi et al. vorgeschlagene Ansatz der „Brückenamplifikation“ an immobilisierten Primern.

Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Effizienz der OnChip-PCR haben sind elektrostatische Kräfte, Primerkonzentrationen, Polymerase- und Nukleotid-Verfügbarkeit und nicht komplett synthetisierte Moleküle. Über den genauen Einfluss dieser Faktoren kann bisher nur gemutmaßt werden, genaue Angaben sind in der Literatur zum jetzigen Stand nicht publiziert worden. Gerade das Verhalten der Polymerase an den immobilisierten Primern wäre ein interessantes Ziel für Modellierungsversuche. Die Polymerase ist mit einer Sequenzlänge von 832 Aminosäuren ein relativ großes Molekül (Uniprot Accession number P19821), welches vermutlich in seiner Aktivität durch einen „crowding effect“ zu einem gewissen Teil herabgesetzt würde.

In dem entwickelten Multiplex-OnChip-PCR-Verfahren war es möglich, maximal sieben Zielsequenzen parallel nachzuweisen. Für den Nachweis von Allergie-auslösenden Spezies in Lebensmitteln sollte diese Anzahl ausreichend hoch sein, da man nicht davon ausgehen kann, dass mehr als vier oder fünf verschiedene Verunreinigungen in einer Lebensmittelmatrix vorliegen. Allerdings kann es durchaus für andere Einsatzgebiete sinnvoll sein, eine parallele Detektion für mehr als sieben Zielsequenzen zu etablieren (z.B. in der Pathogenidentifikation, Erkennung von Antibiotikaresistenzen, etc.). Da mit steigender Anzahl der nachzuweisenden Zielsequenzen auch die Anzahl der zu entwickelnden Primersysteme korreliert, wird es zunehmend schwieriger, mögliche Kreuzhybridisierungen bzw. Primer-Dimer Bildungen zu verhindern. Verschiedene Ansätze wurden beschrieben, in denen jeweils zwei spezifische Sonden gegen eine bestimmte Zielsequenz hybridisiert werden. Diese Sonden hybridisieren in einem Abstand von 1-2 Basen zueinander und enthalten eine universelle Primersequenz. Nach erfolgreicher Hybridisierung an der Zielsequenz kommt es zu einer Ligation, die die beiden Sonden miteinander verbindet. Die verschiedenen ligierten Produkte können nun über ein einziges Primersystem gemeinsam amplifiziert werden. Diese Methode ist auch als Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) bekannt. Mit dieser Methode wurde bereits die parallele Detektion von 40 verschiedenen Sequenzen gezeigt [141]. Eine noch recht neue Technologie nutzt ein sogenanntes „Dual-Priming-Oligonukleotid“ (DPO), um unspezifische Amplifikationen in Multiplex-PCRs zu verhindern. Das DPO besteht dabei aus zwei Primerregionen, die durch einen Polydeoxyinosin-Linker miteinander verbunden sind. Der Linker bildet eine Art Blase oder Hairpin-Struktur mit sich selbst und ist nicht in den Annealing- und Priming Vorgang involviert. Der Linker stellt vielmehr eine Art Abgrenzung zwischen den beiden Primerregionen dar. Die Regionen selbst sind so gewählt, dass es ein längeres 5'-Ende (18-25nt) existiert, welches für die stabile Bindung während des Annealings verantwortlich ist und ein kürzeres 3'-Ende (6-12nt), welches bestimmend für spezifische Verlängerung der Zielsequenz ist. Durch die unterschiedlichen Längen der Primerregionen ergeben sich unterschiedliche Annealingbedingungen für die beiden Segmente des DPO. Im Falle eines

Mismatches würde das 3'-Ende keine ausreichend starke Bindung eingehen können und die Amplifikation würde blockiert. Ein konventioneller Primer hingegen besteht aus einer durchgängigen Sequenz, die auch im Falle eines Mismatches immer noch eine unspezifische Amplifikation zulassen kann [142-145]. Die DPO-Technologie ist bereits in verschiedenen kommerziellen Assayformaten von der Fa. Seegene Inc. (Südkorea) erhältlich. Für das Seeplex Sepsis DNA Kit wird z.B. beschrieben, dass eine simultaner Nachweis von 64 Pathogenen und drei Resistenz-Genen möglich ist. Eine Adaption der beschriebenen Technologien wäre für die OnChip-Amplifikation vorstellbar, wenn es nötig ist, eine Vielzahl verschiedener Zielsequenzen parallel nachzuweisen.

Um die OnChip-PCR robust und reproduzierbar durchführen zu können, sind nicht nur optimierte PCR-Verfahren zu entwickeln, auch an dem Geräteaufbau sind Anpassungen notwendig. Für die OnChip-PCR wurde ein Thermocycler der Fa. MJResearch mit einem Hybridisierungsturm für 2x16 Chips verwendet. Der Hybridisierungsturm wird über eine Basiseinheit des Thermocycler angesteuert und programmiert. Mit dem Hybridisierungsturm ist es nach Herstellerangaben auch möglich *in situ*-PCR durchzuführen, daher bietet das Gerät die Möglichkeit, für die jeweils verwendeten Trägersubstrate Gewichtsangaben vorzugeben, um optimierte Thermocyclingeigenschaften zu gewährleisten. Mit dem vom Hersteller vorgegebenen Wert für Glassubstrate von 5g wurden allerdings keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt. Daher wurde mit einem Temperaturfühler auf der Oberfläche des Glassubstrates die tatsächliche Temperatur in Echtzeit während eines PCR-Programmes protokolliert. Dabei zeigte sich, dass während der PCR nie die programmierten Zieltemperaturen von 95°C, 58°C bzw. 60°C und 68°C erreicht wurden. Durch schrittweise Erhöhung der Gewichtsangabe für das verwendete Glassubstrat wurde empirisch ermittelt, bei welchem vorgegebenen Gewicht der Thermocycler am nächsten an die erforderlichen Heiz- und Kühlraten für eine PCR an der Chipoberfläche heranreichte. Dabei zeigte sich, dass bei einer Vorgabe von 11g an der Chipoberfläche weitestgehend vergleichbare Bedingungen zu einem konventionellen PCR-Cycling geschaffen werden konnten. Lediglich bei dem Denaturierungsschritt kam es zu einem kurzzeitigen „Überschießen“ auf 100°C an der Chipoberfläche.

Ein weiterer Aspekt für die Durchführung der OnChip-PCR ist die Bereitstellung des Reaktionsraumes bzw. eines Reaktionskompartimentes. Die Herausforderung besteht hier darin, einen Reaktionsraum zu schaffen, der eine genügend große Grundfläche für das verwendete Arraylayout bedeckt, leicht aufzubringen und vor der Auswertung rückstandslos zu entfernen ist. Ferner sollte das verwendete Material hitzestabil sein und Schutz vor Verdunstung bzw. Austrocknung während der OnChip-PCR bieten. In der Literatur werden dafür verschiedene kommerzielle Lösungsansätze beschrieben, die meist auf die Verwendung von selbstklebenden Hybridisierungskammern oder speziellen Klebstoffen in

Kombination mit Deckgläsern zurückgreifen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Möglichkeiten für die Kompartimentierung von Glassubstraten sowie eine kurze Beurteilung bezüglich der Eignung für den Einsatz in der OnChip-PCR.

Tabelle 7 Verschiedene Kompartimentierungsmöglichkeiten für die OnChip-PCR

	Hersteller/ Distributor	Handhabung Anbringung/Entfernen	Hitze- beständigkeit	Effekte bei 95°C
FrameSeal, Gene Frame	MJResearch	++ / +	90-95°C	Luftblasenbildung im Reaktionsraum
HybriWell	GraceBiolabs	+++ / +++	bis ca. 75 °C	Luftblasenbildung im Reaktionsraum durch Verformung der Versiegelungsfolie
LifterSlip + FixoGum	Marabu	++ / +	< 95°C	Eintrocknen des Klebers und Verlust der Versiegelung
Versiegelungslack		++ / ---		Eintrocknen des Klebers und Verlust der Versiegelung
ProPlate Slide	GraceBiolabs	+++ / +++	(<95°C)	Versiegelungsfolie löst sich ab Temperaturen von 70-75°C
SelfSeal Reagent	MJResearch	+++ / -	< 95°C	Reagenz wird in Reaktionsmix beigemischt und härtet bei Denaturierung aus -> Inhibierung der Reaktion
O-Ring + Deckglas		+++ / +++	<95°C	Aufbau ist nicht mit Thermocycler verwendbar, da Aufbau zu hoch; Flachbett-Thermocycler nur bedingt geeignet für OnChip-PCR

Die Bewertung erfolgte auf Grundlage der bei der Durchführung der OnChip-PCR gemachten Erfahrungen. Für die Beurteilung der Hitzebeständigkeit wurde mit einem Temperaturfühler an der Chipoberfläche die Temperatur gemessen und eine optische Beurteilung der jeweils auftretenden Effekte bis zu 95°C vorgenommen. +++ = sehr gute Handhabung, ++ = gute Handhabung, + = ausreichende Handhabung, - = schlechte Handhabung, --- = nicht einsetzbar

Alle getesteten Methoden hatten Schwachpunkte, die sich negativ auf die Durchführbarkeit oder die Reproduzierbarkeit der OnChip-PCR auswirkten. Im Bereich der selbstklebenden Hybridisierungskammern gibt es verschiedene kommerzielle Lösungen, die z.T. unter variierenden Produktnamen von unterschiedlichen Distributoren angeboten werden, aber auf denselben Hersteller zurückgehen. Am gebräuchlichsten sind hier die Produkte von MJResearch und Grace Biolabs. Diese Produkte wurden auch in mehreren Publikationen zur OnChip-Amplifikation eingesetzt. Hinsichtlich der Handhabbarkeit und Eignung für die OnChip-PCR gibt es hier allerdings große Unterschiede. Auch die Befüllung der Kompartimente ist je nach verwendeter Lösung kompliziert. Neben der Verwendung der selbstklebenden Hybridisierungskammern wurden auch verschiedene Kombinationen aus

Deckgläsern mit Abstandshaltern aus Teflon (LifterSlips) und Klebern für die Versiegelung der jeweils offenen Seiten der Deckgläser verwendet. Diese speziellen Kleber sind auch als „rubber cement“ bekannt, und sollen nach der Aushärtung rückstandslos entfernbar sein. Beobachtung haben jedoch gezeigt, dass bei 95°C der Kleber zu stark eintrocknete und die Verdunstungsbarriere zerstört wurde, was zu einem Austrocknen der Reaktionskompartimente führte. Gleiches konnte für den Einsatz verschiedener Versiegelungslacke beobachtet werden. Eine weitere Möglichkeit der Versiegelung, die von MJResearch speziell für den Einsatz in der *in situ* PCR angeboten wird, ist das SelfSeal-Reagent. Dieses wird zu dem PCR-Ansatz zugegeben und unter ein Deckglas mit Teflon-Abstandshaltern pipettiert. Während des ersten Denaturierungsschrittes soll das Reagenz an den Kanten des Deckglases aushärten, so dass eine Verdunstungsbarriere geschaffen wird. In der OnChip-PCR kam es hingegen zu einer vollständigen Polymerisierung des Reaktionsansatzes, so dass die PCR komplett inhibiert wurde. Klassische Lösungsansätze in denen Silikondichtungen verwendet werden, die entweder gedeckelt oder wie im Falle der ProPlate Slides der Fa. Grace Biolabs mit einer Folie versiegelt werden, waren für die Verwendung mit dem Hybridisierungsturm des MJResearch Thermocyclers nicht geeignet. Dies war bedingt durch die schmalen Einschübe des Hybridisierungsturms, der pro Heizkammer nur ein Glassubstrat ohne größere Höhenabweichungen aufnehmen kann. Die Verwendung von Flachbett-Thermocyclern konnte ebenfalls keine zufriedenstellende Leistung in der OnChip-PCR zeigen.

Nach mehreren Versuchen wurde daher auf eine Lösung gesetzt, die eine Verwendung mit dem *in situ* Hybridisierungsturm des MJResearch Thermocyclers und eine gute Handhabbarkeit gewährleistete. Dies waren die selbstklebenden Hybridisierungskammern (HybriWells) der Fa. Grace Biolabs. Nachteilig war allerdings, dass es in ca. 30-40% der Versuche zu Problemen mit Luftblasenbildung oder Austrocknungseffekten kam, die die Auswertung der OnChip-PCR trotz Blocking nur bedingt oder gar nicht zuließen. Da in den übrigen Fällen, in denen keinerlei Probleme mit den Reaktionskammern auftraten, spezifische Ergebnisse erzielt werden konnten, ist prinzipiell von der Funktionalität der entwickelten OnChip-PCR-Verfahren auszugehen.

Die in dieser Arbeit entwickelten OnChip-PCR-Verfahren stellen dabei zum jetzigen Wissensstand das einzige Nachweissystem für die Multiparameteranalyse von Allergie-auslösenden Spezies auf Nukleinsäure-Basis dar. Bisher publizierte chipbasierte Nachweissysteme sind nur für die Allergie-Erkennung beim Menschen über den Nachweis von IgE bekannt. Diese Protein-Microarrays geben also Aufschluß darüber, auf welche Lebensmittelinhaltsstoffe ein Individuum mit einer allergischen Reaktion reagiert [146-151]. Der in dieser Arbeit entwickelte AllergenChip hilft hingegen bei der Identifizierung von allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen bereits bei der Produktion der Lebensmittel, indem

die Spezies-spezifische Nukleinsäuresequenz nachgewiesen wird. Durch den Nachweis der Spezies-spezifischen DNA wird der Allergiker davor geschützt, eventuell die versteckten Allergene zu konsumieren.

Um den Einsatz eines AllergenChips in der Lebensmittelqualitätskontrolle, z.B. bei der Produktion im verarbeitenden Betrieb, zu erleichtern, wäre eine Integration in portable Analysegeräte sinnvoll, die direkt vor Ort in der Produktion eingesetzt werden könnten. Weitere Arbeiten zur OnChip-PCR wären daher in geschlossenen Mikrofluidiksystemen, wie Lab-on-Chip-Systemen, in denen zusätzlich ein miniaturisiertes Thermocyclingsystem integriert ist, nötig. Gerade in Hinblick auf die Anwendung in der Lebensmittelüberwachung, wäre eine Integration der OnChip-PCR und Multiplex-OnChip-PCR in ein portables Lab-on-Chip-System durchaus vorstellbar.

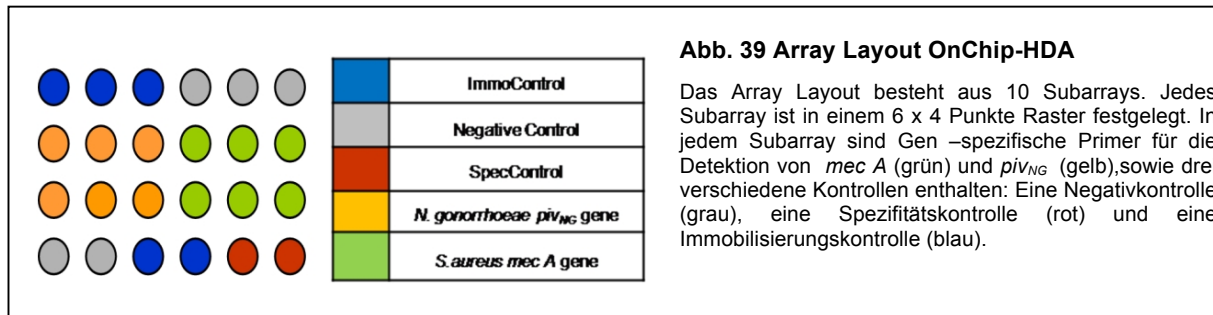
4.3.6 OnChip-HDA

Im bisherigen Verlauf der Arbeit konnte eine OnChip-Amplifikation für die nukleinsäurebasierte Detektion von allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen erfolgreich entwickelt werden. Da das Thermocycling aber hohe Anforderungen an die verwendeten Materialien stellt und auch die Einhaltung der benötigten Temperaturprofile nur mit speziellen Thermocyclern zu erreichen ist, wurden zum Ende der Arbeit weitere Wege gesucht, um die Methode zu vereinfachen. Es galt eine Methode zu finden, die ohne Thermocycling in der Lage ist, ähnliche Ergebnisse wie mit einer PCR zu ermöglichen. Eine solche Methode hat den Vorteil, dass sie mit geringem geräteseitigen Aufwand eingesetzt werden kann und damit auch flexiblere Einsatzmöglichkeiten bietet, wie z.B. für den Bereich der Point of Care-Diagnostik.

Als Lösungsansatz wurde die Helikase abhängige Amplifikation (HDA) gewählt, eine isothermale Amplifikationsmethode, die ähnlich dem Ablauf einer PCR ist. Diese Methode wurde gewählt, weil die hohe Verwandtschaft zur PCR auch ein ähnliches Assaysdesign und damit eine leichtere Adaption bestehender PCR-Assays bedeutet. Hintergrund und Funktionsweise der HDA-Technologie wurden bereits in der Einführung behandelt, es sei daher auf das Kapitel 0 verwiesen.

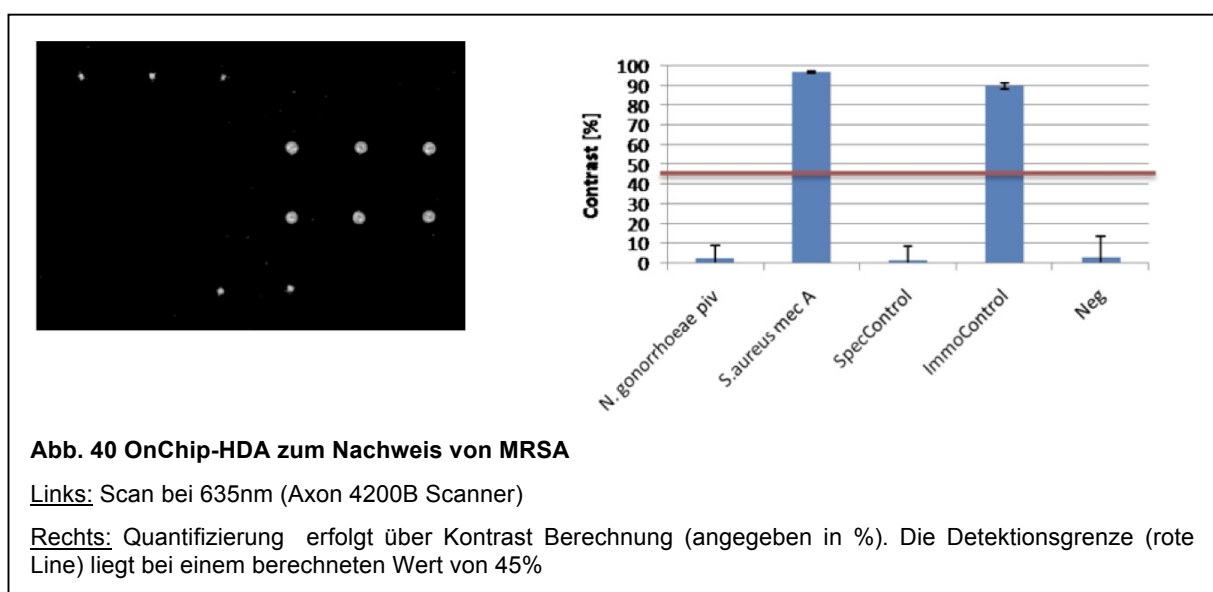
Für die OnChip-Amplifikation mit der HDA wurden zunächst Einzelnachweise von dem *mecA* Gen aus *Staphylococcus aureus* und dem *piv_{NG}*-Gen aus *Neisseria gonorrhoeae* durchgeführt. Nach erfolgreicher OnChip-Amplifikation der einzelnen Zielsequenzen wurde der Versuch auf den parallelen Nachweis beider Zielgene zu einer Duplex OnChip-HDA erweitert. Die Auswahl der genannten Pathogene erfolgte auf Grundlage zweier Publikationen [152, 153], in denen jeweils mit Hilfe der HDA Einzelnachweise von *Staphylococcus aureus* und *Neisseria gonorrhoeae* erfolgreich beschrieben wurden.

Für die Erstellung der Arrays wurde das nachfolgend dargestellte Layout entworfen und auf epoxysilanisierte Glassubstrate gespottet (s. Abb. 39).



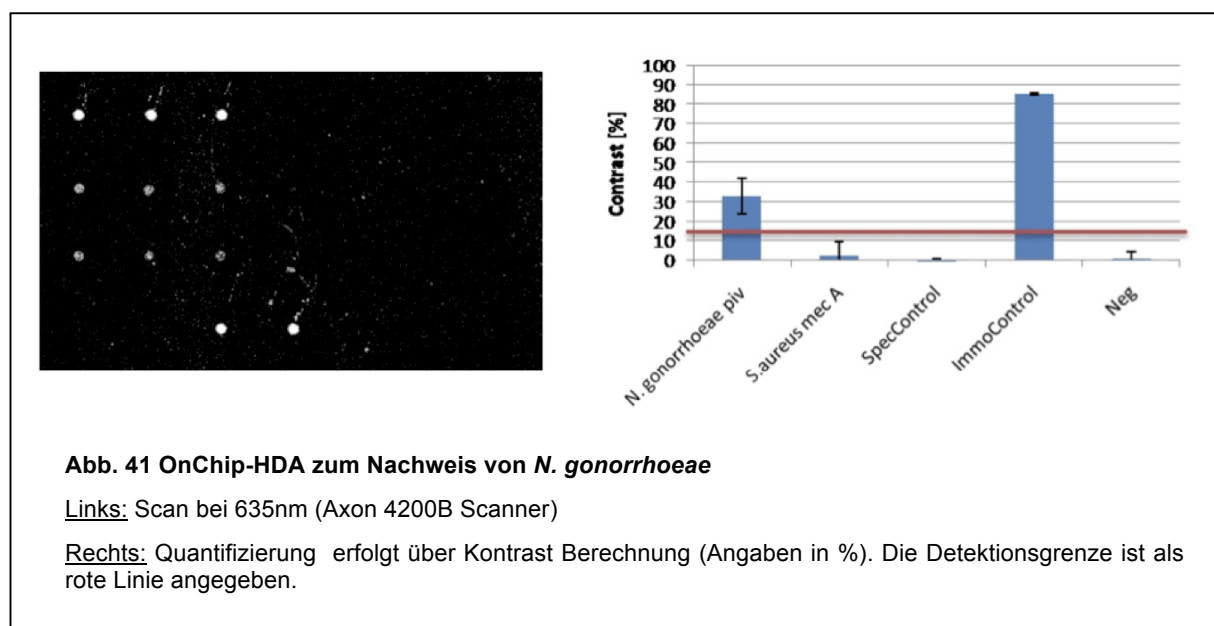
Pro Chip wurden 10 Subarrays gemäß des in Abb. 39 gezeigten Schema gespottet, um eventuellen Inhomogenitäten der Slideoberfläche oder Ineffizienzen bei der Immobilisierung mit einer entsprechenden Statistik zu begegnen. Jedes Subarray enthält neben den spezifischen Primern für das *mec A* Gen (*S. aureus*) und das *piv_{NG}* Gen (*N. gonorrhoeae*) auch verschiedene Kontrollen. Neben einer Negativkontrolle sind auch eine Immobilisierungskontrolle und eine Spezifitätskontrolle in jedes Subarray integriert. Forward Primer sind via C6-Aminolinker auf epoxysilanisierten Glassubstraten immobilisiert. Die entsprechenden Gegenprimer sind Cy5-markiert und befinden sich in Lösung. Zur besseren Übersicht ist bei den nachfolgenden Ergebnissen nur jeweils eines der zehn Subarrays gezeigt, die quantitative Auswertung erfolgte über alle 10 Subarrays eines Chips.

Der Nachweis von *mec A* wurde mit einer seriellen Verdünnung (1:10) von genomischer MRSA-DNA durchgeführt.



Das in Abb. 40 gezeigte Ergebnis konnte mit 250pg eingesetzter genomischer MRSA-DNA erzielt werden. Dies entspricht in etwa einem Äquivalent von 5×10^4 *S. aureus* Zellen, die erfolgreich mit der OnChip HDA detektiert werden konnten. Das Ergebnis zeigt sowohl qualitativ als auch nach Quantifizierung eindeutige Signale für MRSA. Die Immobilisierungskontrollen liegen ebenfalls weit oberhalb der berechneten Detektionsgrenze. An den Positionen der Negativkontrollen konnten keine signifikanten Signale beobachtet werden.

Für die Detektion des *piv_{NG}* Gens konnten positive Signale bis zu einer Grenze von 1ng (ca. $1,32 \times 10^5$ *N. gonorrhoeae* Zellen) beobachtet werden (s. Abb. 41).

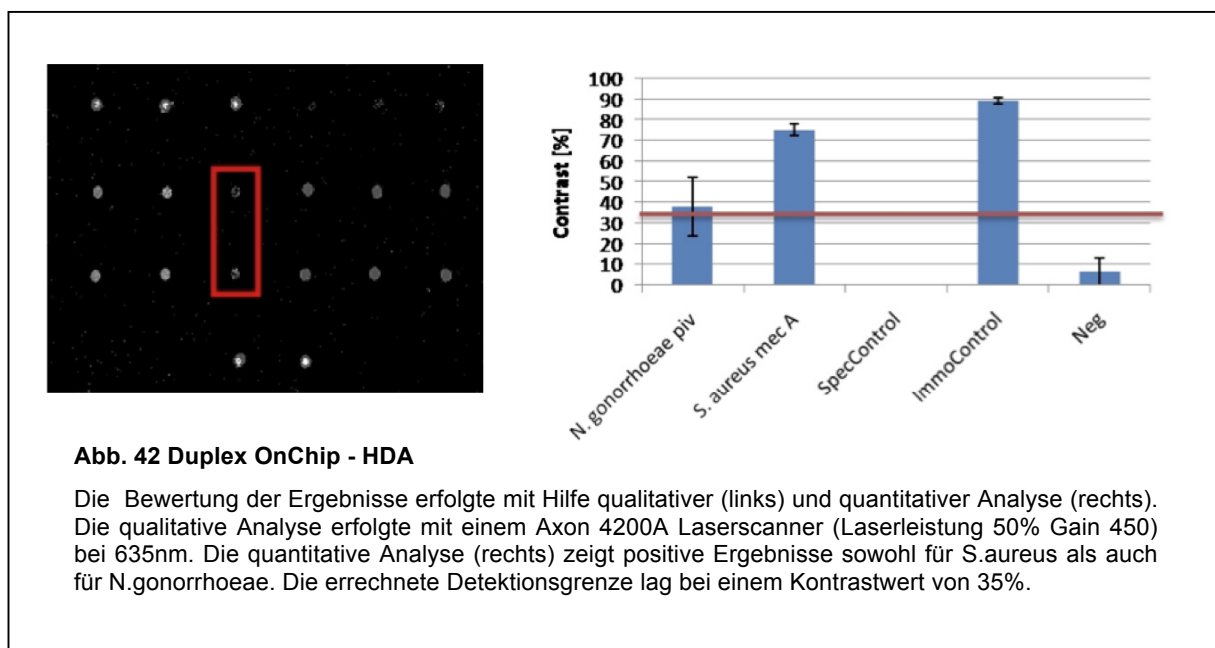


Der Nachweis wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt wie die Versuche zur MRSA-Detektion. Auch hier wurde die qualitative Bildauswertung mit einem Laserscanner bei 635nm durchgeführt und das Ergebnis anschließend über eine qualitative Datenanalyse verifiziert. Die Signale für Immobilisierungskontrollen und das *piv_{NG}* Gen sind klar erkennbar und liegen auch in der qualitativen Auswertung deutlich über der berechneten Detektionsgrenze. Signale an den Positionen für Negativkontrollen und Spezifitätskontrollen konnten nicht detektiert werden. Versuche, die zur weiteren Überprüfung der Spezifität durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls keine Signale außer an den Positionen der Immobilisierungskontrollen. Bei diesen Versuchen wurden Cy5-markierten Primer entweder in Hybridisierungspuffer oder analog in einer Negativkontrolle ohne DNA eingesetzt. Mit diesen Ergebnissen konnte ausgeschlossen werden, dass es bei der OnChip-HDA falsch-positive Signale auf Grund unspezifischer Primer-Dimere oder Kreuzhybridisierungen gibt. Auch Versuche in denen Vorwärts- und Rückwärts-Primer zusätzlich zu den bereits

immobilisierten Primern ohne DNA eingesetzt wurden, zeigten keine Signale. Damit lässt sich ausschließen, dass eventuell von der Oberfläche abgelöste Primer zu ungewünschten Nebenprodukten führen, die als falsch-positive Signale detektiert werden würden.

4.3.7 OnChip-Multiplex-HDA

Nach der erfolgreichen Umsetzung der Singleplex-OnChip-HDA wurde das System einen Schritt weiter integriert und eine Duplex-OnChip-HDA entwickelt, die beide Zielsequenzen parallel in einem Reaktionsschritt detektieren sollte. Wiederum wurde mit genomischer DNA von *S.aureus* und *N. gonorrhoeae* gearbeitet und diese in einer seriellen Verdünnungsreihe für die Duplex-OnChip-HDA eingesetzt. Im Vergleich zu den Einzelnachweisen konnten in der Duplex-OnChip-HDA nur positive Ergebnisse mit DNA-Mengen erzielt werden, die um den Faktor 10 höher lagen. Dennoch konnten in diesen Bereichen durchaus Ergebnisse mit guter Spezifität erzielt werden, wie Abb. 42 zeigt.



Die erzielten Ergebnisse zeigen deutlich über der Detektionsgrenze angesiedelte Kontrastwerte für *S. aureus* und die Immobilisierungskontrollen. Bei den Signalen von *N. gonorrhoeae* sind nur Werte knapp über dem Detektionslimit erkennbar. Dies liegt allerdings in den Signalen begründet, die an den letzten beiden Positionen des *N. gonorrhoeae* Panels liegen (roter Bereich) und geringere Kontrastwerte zeigten, als an den übrigen vier Positionen. Da sich dieses Phänomen an identischer Stelle in jedem Subarray zeigte, verringert dies die durchschnittliche Signalstärke erheblich, so dass das Signal entsprechend verändert berechnet wird. Durch die Regelmäßigkeit mit der dieses Artefakt auftritt, kann davon ausgegangen werden, dass hier ein Problem bei der

Probenabgabe im Spottingprozess, der Immobilisierung (z.B. Oberflächeninhomogenitäten, ungenügende Anzahl aktivierter Oberflächenmoleküle) oder eine ineffiziente Amplifikation vorliegt. Näheres hierzu konnte allerdings nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Die Eingrenzung der Fehlerquelle so wie die Optimierung des Verfahrens sollte Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein. Eine Adaption des Verfahrens zum Nachweis allergener Lebensmittelinhaltsstoffe wird ebenfalls Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Generell konnte mit den Ergebnissen gezeigt werden, dass die OnChip-HDA für die spezifische Detektion von Pathogenen in Einzel und Duplex-Nachweisen geeignet ist. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit konventionellen Singleplex-HDAs in Flüssigphase beschrieben wurden [152, 153], wurden niedrigere Sensitivitäten erreicht. Allerdings stehen die Arbeiten zur OnChip-HDA noch am Beginn, so dass hier zunächst nur die Machbarkeit gezeigt werden sollte.

Die HDA ist nicht die einzige isothermale Möglichkeit, DNA zu amplifizieren. Es gibt daneben einige Alternativen [154]. Eine von ihnen ist die Strand Displacement Amplification (SDA). Bei der SDA wird ein Strangbruch (Nick) in einem unmodifizierten DNA Strang durch eine Restriktions-Endonuclease eingeführt, so dass eine Polymerase ohne Exonuklease-Aktivität das 3'-Ende an dem Nick des DNA-Stranges verlängern kann. Dabei wird der zweite Strang durch die Polymerase von der Ausgangsmatrize getrennt und durch den neu synthetisierten Strang ersetzt (Strand Displacement). Der verdrängte DNA-Einzelstrang dient im Anschluss wieder als Startmatrize für die DNA-Synthese, so dass eine exponentielle Amplifikation stattfindet. In den ersten SDA-Versuchen wurde ein Restriktionsenzym eingesetzt, so dass doppelsträngige Zielsequenzen mit definierten 5'- und 3'-Enden für die SDA vorlagen. Dies setzt allerdings voraus, dass eine entsprechende Restriktionsschnittstelle für das Enzym in der DNA Matrize vorhanden ist [155]. Da dies nicht immer der Fall ist, war der Einsatz dieser Methode nur eingeschränkt möglich. Abhilfe wurde geschaffen, indem Primer mit einer Restriktionsschnittstelle für das in der SDA benötigte Restriktionsenzym in einem ersten Amplifikationsschritt mit Klenow exo⁻ - Fragment eingesetzt wurden. [156]. Dadurch konnte die Amplifikationseffizienz gesteigert werden. Publikationen über die SDA zeigen in erster Linie den Nachweis von verschiedenen Pathogenen, die entweder in Einzel- oder auch in Multiplexnachweisen beschrieben wurden [157-160]. Ebenfalls beschrieben wurde auch der Multiplex-Nachweis an immobilisierten Primern auf elektronischen Microarrays [161]. Hauptproblem der SDA ist, dass sie keine langen Amplifikate synthetisieren kann und vier Primer benötigt werden. Das bedeutet einen erhöhten Arbeitsaufwand bei der Entwicklung neuer Multiplex-Verfahren.

Eine weitere isothermale Amplifikationsmethode ist die Rolling Circle Amplification (RCA). Bei der RCA wird ein Primer an einer zirkularisierten DNA-Matrize durch die DNA-

Polymerase verlängert und es entsteht eine Kette sich wiederholender einzelsträngiger Kopien der Ursprungsmatrize [162]. Auch hier gibt es bereits Publikationen, die die Multiplex-RCA und OnChip-RCA beschrieben haben [163, 164]. Da üblicherweise die zu amplifizierende Zielsequenz nicht in zirkularer Form vorliegt, muss die Matrize zunächst zirkularisiert werden. Dazu wird üblicherweise eine Ligation durchgeführt. Eine Möglichkeit dafür sind sogenannte „Padlock-Probes“, die bei der Detektion von SNPs eingesetzt werden. „Padlock-Probes“ sind Oligonukleotidsequenzen von 70-140bp, die jeweils am 5'- und 3'-Ende komplementär zu der Zielsequenz sind und durch eine Spacersequenz im Mittelteil komplettiert werden. Nach dem Binden an die Zielsequenz werden die Enden der Padlock Probe ligiert. Im Falle einer nicht passenden Sequenz findet keine Zirkularisierung statt [165-172].

Die beschriebenen Amplifikationsmethoden sind wie die HDA isothermal, benötigen aber einen initialen Denaturierungsschritt oder im Vergleich zu der HDA einen höheren experimentellen Aufwand. Daher stellt die HDA eine vielversprechende Option für den Einsatz in Situationen dar, die eine einfache Handhabbarkeit und Integration in diagnostischen Schnelltestverfahren wie z.B. im Point of Care bedingen.

5 Zusammenfassung

In der molekularen Diagnostik besteht ein Bedarf an schnellen und spezifischen Testsystemen, die entweder für die Labordiagnostik oder in Point of Care-Umgebungen eingesetzt werden können. Um dieses Ziel zu erreichen stehen die Miniaturisierung und Parallelisierung im Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Microarrays stellen die hierfür benötigten Voraussetzungen zur Verfügung, um als Werkzeuge in der Multiparameteranalyse in verschiedensten Anwendungsbereichen zu dienen.

In der Lebensmittelanalytik stellen die Nachweismethoden nach LFGB §64 die Richtlinie für den Nachweis von Pathogenen aus unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes dar. Diese Methoden erfordern vom Probeneingang bis zum endgültigen Ergebnis einen Zeitaufwand von 3-5 Tagen. Die Multiplexfähigkeit der bestehenden Methoden, die im Bereich der DNA-Analytik derzeit größtenteils mit Hilfe der Realtime-PCR durchgeführt werden, ist auf Grund der technologischen Hürden derzeit auf maximal vier parallele Analysen in einem Versuchsansatz beschränkt.

Die Anwendung der Multiparameteranalytik ist auch für andere Bereiche in der Lebensmittelanalytik von Nutzen. So stellen versteckte Allergene in Lebensmitteln ein hohes Risiko für Lebensmittelallergiker dar, die auf genaue Kennzeichnungen der Lebensmittel angewiesen sind. Aktuelle Nachweismethoden müssen in der Lebensmittelproduktion eingesetzt werden, um die Spuren von potentiell Allergie-auslösenden Inhaltsstoffen zuverlässig nachweisen zu können. Hier ist es wünschenswert, wenn die Nachweismethode in möglichst einem Analysegang alle relevanten Lebensmittelallergene detektiert. Derzeit sind mehrere Allergene gelistet, von denen die sog. „Big 8“ für mehr als 90% aller allergenen Reaktionen beim Menschen verantwortlich sind.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Multiparameteranalytik auf Grundlage der Microarray-Technologie zu entwickeln und die Eignung der Technologie für die oben genannten Einsatzbereiche zu zeigen. Neben der Entwicklung geeigneter Microarrays wurden auch Multiplex-PCR Verfahren entwickelt, die in der Lage sind sensitiv und spezifisch die gesuchten Nukleinsäuren aus verschiedenen Matrizes zu identifizieren. Durch die Multiplex-PCR-Verfahren konnten mehrere Einzelnachweise in einem Analyseschritt zusammengefasst werden. Für die nachfolgende Hybridisierung auf dem Microarray zeigte sich, dass sich die Konvertierung der doppelsträngigen PCR-Produkte mit Hilfe eines spezifischen Exonukleaseverdaus zu einzelsträngiger DNA vorteilhaft auf die spätere Hybridisierung auswirkt [121]. Für den Nachweis der PCR-Produkte wurden spezifische Sonden in einem Mikroraster auf einem Biochipsubstrat aufgebracht und die spezifischen

DNA-Sequenzen in einer Hybridisierung nachgewiesen. Die Detektion wurde über fluoreszenzmarkierte PCR-Primer oder dUTP (Cy5 oder Cy3) in einem entsprechenden konfokalen Laserscanner durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde mit dem PoultryChip ein Microarray zum Nachweis von verschiedenen Geflügelpathogenen und Lebensmittelpathogenen entwickelt. Mit zwei getrennten Multiplex-PCR-Systemen konnten drei bakterielle und fünf virale Geflügelpathogene spezifisch detektiert werden. Der entwickelte Microarray konnte die insgesamt acht verschiedenen Pathogene sowohl nach Singleplex-, als auch nach Multiplex-PCRs über eine Hybridisierung an pathogenspezifischen Sonden nachweisen.

Mit Hilfe des AllergenChips war es möglich, über eine Hybridisierung bis zu neun der zehn ausgewählten allergenen Spezies aus Realproben zu detektieren. Die Sensitivität lag bei 100ppm in Multiplex-Ansätzen. In Singleplex- und Duplex-Ansätzen konnten allergen wirkende Verunreinigungen in allen getesteten Lebensmittelproben bis in einen Bereich <10 ppm spezifisch nachgewiesen werden. Eine weitere Validierung in Ringversuchen mit Referenzmaterial aller allergenen Inhaltsstoffe ist nun nötig, um den nächsten Schritt in der Produktentwicklung fortzuführen.

Die Entwicklung alternativer Strategien, eine chipbasierte Multiparameteranalyse mit der Sensitivität einer PCR zu verknüpfen und so die bisher getrennt durchgeführten Einzelreaktionen weiter in einem einzigen Reaktionsschritt zu integrieren, hat zu der Entwicklung verschiedener OnChip-Amplifikationsverfahren geführt. Nachdem zunächst OnChip-PCRs zum Nachweis einzelner Parameter entwickelt wurden, folgte die Adaption der entwickelten Multiplex-PCRs an das Microarray-Format. Es konnte gezeigt werden, dass bis zu sieben verschiedene Zielsequenzen aus einem DNA-Gemisch erfolgreich nachgewiesen werden konnten. Als gut geeignet haben sich epoxysilanisierte Glassubstrate in Kombination mit der Blockierung freier reaktiver Gruppen auf der Glasoberfläche durch gamma-Aminobuttersäure erwiesen. Mit dieser Kombination wurden bessere Signalintensitäten bei gleichbleibend hohen Kontrastwerten in der Auswertung der Versuche erzielt, als mit den in den Standardprotokollen verwendeten Blocking mit Ethanolamin.

Die Detektion auf den Chips erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Primern. Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um eine Signalverstärkung des Fluoreszenzsignals zu erzielen. Dazu wurden Cy5- und Cy3-markierte dUTP in Kombination mit Cy5-markierten Primern eingesetzt. Es konnte eine leichte Signalverstärkung bei gleichzeitigem Einsatz von Cy5-dUTP und Cy5-Primern erzielt werden. Versuche in denen Cy3-dUTP und Cy5-Primer eingesetzt wurden, zeigten bei der Auswertung im Laser-Scanner jeweils positive Ergebnisse. Generell konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass der Einbau von fluoreszenzmarkierten dUTP sowohl in einer OnChip-PCR, als auch in einer Multiplex-

OnChip-PCR erfolgreich durchgeführt werden kann. Die erzielte Signalverstärkung ist allerdings auch in Hinblick auf die relativ hohen Kosten für fluoreszenzmarkierte dUTP nicht hoch genug, um die Kombination von fluoreszenzmarkierten dUTP und Primern für die routinemäßige Anwendung einzusetzen.

Die entwickelten OnChip-PCR-Verfahren zeigten eine hohe Spezifität sowohl in Singleplex- als auch in der Multiplex-OnChip-PCR. Eine Sensitivität von 10 Kopien bzw. <10ppm konnte in Singleplex-OnChip-PCRs erzielt werden. Diese Sensitivität ist damit nach jetzigem Wissensstand für eine diagnostische Anwendung zum Nachweis allergene Inhaltsstoffe in Lebensmitteln ausreichend. Die Multiplex-OnChip-PCRs konnten bei Verunreinigungen von 10-100ppm spezifische Ergebnisse gezeigt werden. Die Sensitivität liegt damit derzeit noch außerhalb der diagnostischen Nachweisgrenze von <10ppm.

Eine weitere Vereinfachung der OnChip-Amplifikation wurde in Form einer isothermalen Helikase-abhängigen OnChip-Amplifikation entwickelt. *Staphylococcus aureus* und *Neisseria gonorrhoeae*, die als diagnostisch relevante Humanpathogene bereits mit Hilfe der HDA nachgewiesen werden konnten [152, 153], wurden als Modellorganismen gewählt. Beide Pathogene konnten über die OnChip-HDA sowohl einzeln als auch parallel spezifisch nachgewiesen werden. In der Arbeit konnte damit nach dem derzeitigen Stand der Technik erstmals eine OnChip-HDA sowohl für Einzel- als auch für Duplex-Nachweise gezeigt werden.

6 Ausblick

Diagnostische Microarrays sind in den letzten 10 Jahren einen großen Schritt in Richtung klinischer und Point of Care-Anwendung gegangen. Viele technologische Hürden konnten inzwischen beseitigt werden. Gerade die unterschiedliche Qualität in der Array-Herstellung und die verschiedenen bioinformatischen Ansätze zur Auswertung von Microarray-Experimenten stellten in der Vergangenheit große Probleme für die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von verschiedenen Experimenten dar. Mit der kontinuierlichen Arbeit an Standardisierungsrichtlinien wie sie beispielsweise im MIAME Standard festgelegt wurden, sind diese Probleme eingegrenzt worden. Auch der technologische Fortschritt in der Automatisierung der Arrayherstellung und der Verbesserung der Spotting-Technologien führten zu einem qualitativen Fortschritt. Dennoch sind noch nicht alle Probleme bewältigt, viele kommerzielle Anbieter von vorkonfektionierten Microarrays (bspw. whole genome chips von Mäusen) oder oberflächenfunktionalisierten Chips haben ihre Microarray-Sparte inzwischen wieder abgegeben, da es immer wieder Probleme mit gleichbleibender Qualität zwischen den jeweiligen Chipchargen gab. Ein weiteres Problem waren die hohen Einstiegskosten in die Microarray-Technologie, die vor allem im Forschungsbereich zu einer Hemmschwelle wurden und so die Entwicklung von neuen Anwendungen verlangsamt haben. Dies hat dazu geführt, dass potentielle Kunden verunsichert bzw. zurückhaltender gegenüber der Microarray-Technologie wurden und die Innovations- und Kaufkraft im Microarraysektor gering geblieben ist. Erst in den letzten 3-4 Jahren sind Microarrays aus der Forschung in den Anwendungsbereich vorgedrungen. Diagnostische Arrays sind bis auf wenige Ausnahmen noch nicht im Markt angekommen. Das heißt, die Microarray-Technologie steht momentan an der Schwelle zum Durchbruch. Viele der ehemals reinen Forschungswerkzeuge sind inzwischen im Prototypenstatus und befinden sich nun in der Phase der klinischen Prüfung bzw. Zertifizierung.

Die in dieser Arbeit entwickelten Microarrays OnChip-Amplifikationsverfahren haben gezeigt, dass sie als potentielle Werkzeuge für die Analyse von Lebensmittelallergenen oder infizierten Geflügelprodukten bzw. Nutztieren dienen können. Derzeit ist in den Multiplexnachweisen noch nicht die nötige Sensitivität für die diagnostisch relevanten Nachweisgrenze von <10ppm erreicht worden. Eine Möglichkeit die Sensitivität der Multiplex-OnChip-PCR zu verbessern, könnte der Einsatz von „Locked Nucleic Acids“ (LNA) in den verwendeten Primern sein. In verschiedenen Publikationen wurden Vergleiche zwischen LNA-Primern und konventionellen Primern beschrieben, in denen LNA-Primer eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber der Verwendung konventioneller Primer in PCR und Multiplex-PCR bewirkten [173-177]. LNAs sind Nukleotid-Analoga, die über eine Brücke zwischen dem

2'-O und 4'-C-Atom des Riboseringes in ihrer Konformation blockiert sind [178]. LNAs bewirken auf Grund ihrer Struktur, eine Erhöhung des „Basestackings“ und dadurch eine Erhöhung der Schmelztemperatur eines Primers. Zudem wurde beobachtet, dass Primer die mit LNAs modifiziert wurden eine höhere Bindungsaffinität zu einer Komplementärsequenz aufweisen. Diese Kombination bewirkt eine höhere Spezifität und Sensivität der Primer, was besonders bei schwierigen PCR- und Multiplex-Verfahren zu besseren Ergebnissen führen soll [173].

Eine weitere Methode ist der Einsatz von fluoreszenten Dendrimern, wie z.B. dem 3DNA-Label von der Fa. Genisphere. Hier liegt das Haupteinsatzgebiet im Bereich der Hybridisierungsexperimente. Ein entsprechendes Dendrimer mit bis zu 900 Fluoreszenzmolekülen wird über eine spezielle Tag-Sequenz an das zu detektierende DNA-Fragment gebunden. Zum jetzigen Stand gibt es noch keine erfolgreiche Verwendung von fluoreszenten Dendrimern in OnChip-Amplifikationen. Allerdings soll es nach Herstellerangaben möglich sein, die Dendrimere nicht nur während der reversen Transkription einzubauen, sondern auch PCR-Produkte über eine 2-Schritt-Reaktion zu markieren. Die Kosten sind für diese Art der Signalamplifikation allerdings sehr hoch, könnten aber eine sinnvoll sein, wenn tatsächlich eine bis zu 200-fache Signalverstärkung erzielt werden könnte.

Eine weitere Technologie, die zukünftig eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer Diagnostika spielen wird, ist die Mikrofluidik-Technologie. Sogenannten Lab-on-Chip Systeme haben das Potential, komplette Analysegänge von der Probenaufarbeitung, Analyse bis hin zur Detektion und Auswertung auf der Größe einer Scheckkarte oder weniger zu realisieren. Dies ermöglicht den Einsatz vor allem in der Point of Care-Diagnostik. Hier werden kleine, mobile und möglichst hoch integrierte Systeme benötigt, die einfach zu handhaben sind. Dies erst ermöglicht es, ein breites Anwenderspektrum anzusprechen, im besten Falle ist das Lab on Chip-System für ungeschultes Personal oder den Heimanwender nutzbar.

In mikrofluidischen Systemen wurden sowohl diverse Immunoassayformate, als auch DNA-analytische Assays beschrieben [179-185]. Letztere haben dabei auch häufig eine PCR-Analytik integriert. Diese wird auch von einigen Autoren als ChipPCR bezeichnet, ist aber nicht mit der in dieser Arbeit durchgeführten OnChip-PCR oder anderen Festphasen-PCR Verfahren zu verwechseln. Der Begriff ChipPCR beschreibt hier vielmehr die Durchführung der PCR im Flüssigkeitsstrom im Mikrofluidikkanal. Das Thermocycling wird durch verschiedene technologische Ansätze gelöst. Ein Ansatz nutzt meanderförmige Kanäle, die über drei temperierte Zonen laufen und so die Temperaturabschnitte in der PCR darstellen. Die Zykluszeit wird über die Fließgeschwindigkeit geregelt. Eine weitere Lösung besteht

darin ein Kompartiment als Reaktionsraum für die PCR bereit zu stellen und das komplette Kompartiment zu beheizen, dabei unterscheidet man zwischen Einzel- und Mehrfachkammer-Lösungen. Ebenfalls beschrieben wurden zirkuläre Kanalstrukturen in denen PCR durchgeführt wurde [186, 187]. Die Detektion erfolgt im Falle integrierter Lab on Chip-Systeme über Kapillarelektrophorese oder über low-density Microarrays bzw. elektrische Microarrays.

Die in dieser Arbeit entwickelten OnChip-Amplifikationsverfahren, insbesondere die OnChip-HDA, würden eine sehr gute Option für die Integration von Analytik und Detektion in Lab on Chip- Systemen darstellen. In Hinblick auf das Anwendungsgebiet der Diagnostik von Lebensmittelallergenen wäre eine isothermale Nachweismethode ideal, um eine OnChip-Amplifikation in einem miniaturisierten Lab-on-Chip-System zu integrieren. Durch die Unabhängigkeit vom Thermocycling ergeben sich für das Gerätedesign neue Minimierungspotentiale, da nur noch ein Dünnschichtheizelement benötigt würde, um eine konstante Temperatur für die HDA-Reaktion zu gewährleisten. Die für das Thermocycling benötigten Peltierelemente würden vermieden werden. Die Detektion über die OnChip-HDA könnte optisch basiert sein, z.B. über Fluoreszenznachweis oder mit Hilfe einer nachgeschalteten Kapillarelektrophorese.

Mit der Verfügbarkeit portabler Systeme könnte eine flexibel einsetzbare Multiparameteranalytik helfen, die Lebensmittelkontrollen in produzierenden Betrieben zu verbessern und den Verbraucher nachhaltig zu schützen. Die in dieser Arbeit entworfenen Konzepte und deren Umsetzung in Form verschiedener OnChip-Amplifikationsverfahren stellen hierfür den ersten Schritt dar. Die Umsetzung in ein Lab on Chip-System sowie die Validierung über zukünftig entwickelte Referenzmaterialien sind die nächsten Schritte auf dem Weg zu einer Diagnostikplattform für die Nukleinsäure-basierte Analytik.

7 Literaturverzeichnis

- [1] O'regan E, Mccabe E, Burgess C, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple Salmonella serotypes in chicken samples. *BMC Microbiol* 2008; 8:156.
- [2] Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:47-51.
- [3] Fodor SPA, Rava RP, Huang X, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 1993; 364:555-556.
- [4] Fodor S, Read J, Pirrung M, Stryer L, Lu A, Solas D. Light-directed, spatially adressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991; 251:767-773.
- [5] Schena M, Shalon D, Davis R, Brown P. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Scienc* 1995; 270:467-470.
- [6] Bilitewski U, editor, *Microchip Methods in Diagnostics*, 1st Edition ed: Humana Press, 2009.
- [7] Bier F, Nickisch-Rosenegk Mv, Ehrentreich-Forster E, et al. DNA microarrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2008; 109:433-453.
- [8] Zuo P, Ye B-C. A novel immobilization strategy using oligonucleotide as linker for small molecule microarrays construction. *Biosens Bioelectron* 2008; 23:1694-1700.
- [9] Wu P, Castner D, Grainger D. Diagnostic devices as biomaterials: a review of nucleic acid and protein microarray surface performance issues. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008; 19:725-753.
- [10] Gudnason H, Dufva M, Duong Bang D, Wolff A. An inexpensive and simple method for thermally stable immobilization of DNA on an unmodified glass surface: UV linking of poly(T)10-poly(C)10-tagged DNA probes. *BioTechniques* 2008; 45:261-271.
- [11] Lee M-r, Shin I. Fabrication of chemical microarrays by efficient immobilization of hydrazide-linked substances on epoxide-coated glass surfaces. *Angew Chem Int Ed* 2005; 44:2881-2884.
- [12] Heise C, Bier FF, Immobilization of DNA on Microarrays. In: Wittmann C, editor. *Immobilisation of DNA on Chips II*. Berlin - Heidelberg: Springer Verlag, 2005.
- [13] Preininger C, Bodrossy L, Sauer U, Pichler R, Weilharter A. ARChip epoxy and ARChip UV for covalent on-chip immobilization of pmoA gene-specific oligonucleotides. *Anal Biochem* 2004; 330:29-36.
- [14] Dugas V, Depret G, Chevalier Y, Nesme X, Souteyrand E. Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption? *Sens Actuators* 2004; B 101:112-121.
- [15] Niemeyer CM, Wacker R, Adler M. Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA-protein conjugates. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:e90.
- [16] Gajovic-Eichelmann N, Ehrentreich-Forster E, Bier F. Directed immobilization of nucleic acids at ultramicroelectrodes using a novel electro-deposited polymer. *Biosens Bioelectron* 2003; 19:417-422.
- [17] Jung A, Stemmler I, Brecht A, Gauglitz G. Covalent strategy for immobilization of DNA - microspots suitable for microarrays with label-free and time-resolved optical detection of hybridization. *Fres J Anal Chem* 2001; 371:128-136.

- [18] Husar G, Anziano D, Leuck M, Sebesta D. Covalent modification and surface immobilization of nucleic acids via the diels-alder bioconjugation method. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001; 20:559-566.
- [19] Halliwell C, Cass A. A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces. *Anal Chem* 2001; 73:2476-2483.
- [20] Kumar A, Larsson O, Parodi D, Liang Z. Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:e71.
- [21] Rogers Y-H, Jiang-Baucom P, Huang Z-J, Bogdanov V, Anderson S, Boyce-Jacino MT. Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays. *Anal Biochem* 1999; 266:23-30.
- [22] Rehman FN, Audeh M, Abrams ES, Hammond PW, Kenney M, Boles TC. Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:649-655.
- [23] Schena M, *DNA Microarrays. A Practical Approach*: Oxford University Press, 1999.
- [24] Schena M, *Microarray Analysis*, 1st ed. Weinheim: Wiley & Sons, 2003.
- [25] Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2001; 2:418-427.
- [26] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *nature genetics supplement* 2002; 32:496-501.
- [27] Bansal AK. Bioinformatics in microbial biotechnology-a mini review. *Microb Cell Fact* 2005; 4:19.
- [28] The Institute for Genomic Research.
- [29] Microarray Gene Expression Data Society
- [30] Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *Journal of Clinical Investigations* 2005; 115:1404-1407.
- [31] Nadler S, Attie A. Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr* 2001; 131:2078-2081.
- [32] Katsei PL, Davis KL, Haroutunian V. Large-Scale Microarray Studies of Gene Expression in Multiple Regions of the Brain in Schizophrenia and Alzheimer's Disease. *Int Rev Neurobiol* 2005; 63:41-82.
- [33] Williams NM, O'Donovan M, Owen M. Genome scans and microarrays: converging on genes for schizophrenia? *Genome Biol* 2002; 3:1011.1011-1011.1015.
- [34] Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:9740-9744.
- [35] Bejjani BA, Shaffer LG. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *J Mol Diagn* 2006; 8:528-533.
- [36] WHO. Pharmacogenomics. *WHO Drug Information* 2002; 16.
- [37] Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, et al. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2863-2871.
- [38] Loy A, Bodrossy L. Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin Chim Acta* 2006; 363:106-119.

- [39] Fadiel A, Kovac AD, Jeffrey R, et al. Diagnostic microarray: an array of possibilities for parasitology. *J Egypt Soc Parasitol* 2004; 34:65-82.
- [40] Uttamchandani M, Neo JL, Ong BNZ, Moochhala S. Applications of microarrays in pathogen detection and biodefence. *Trends Biotechnol* 2008.
- [41] Sergeev N, Distler M, Courtney S, et al. Multipathogen oligonucleotide microarray for environmental and biodefense applications. *Biosens Bioelectron* 2004; 20:684-698.
- [42] Bryant PA, Venter D, Robins-Browne R, Curtis N. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:100-111.
- [43] Strommenger B, Schmidt C, Werner G, Roessle-Lorch B, Bachmann T, Witte W. DNA microarray for the detection of therapeutically relevant antibiotic resistance determinants in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes* 2007; 21:161-170.
- [44] Barl T, Dobrint U, Yu X, et al. Genotyping DNA chip for the simultaneous assessment of antibiotic resistance and pathogenic potential of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32:272-277.
- [45] Petrik J. Diagnostic applications of microarrays. *Transfus Med* 2006; 16:233-247.
- [46] Rebsamen M, Desmeules J, Daali Y, et al. The AmpliChip CYP450 test: cytochrome P450 2D6 genotype assessment and phenotype prediction. *Pharmacogenomics J* 2009; 9:34-41.
- [47] Lawrence LM, Gilmour A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:4600-4604.
- [48] Ring C, Attanssova V, *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* aus Geflügelfleisch Nachweis und Differenzierung. Workshop : Nachweis pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln, 2000.
- [49] Kist M, Bereswill S. *Campylobacter jejuni*. *Contrib Microbiol* 2001; 8:150-165.
- [50] Kist M. Lebensmittelbedingte Infektion durch *Campylobacter*. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 2002; 45:497-506.
- [51] Institut RK. Wichtige Infektionskrankheiten in Deutschland Jahresbericht 1999 Teil 1: Darminfektionen. *Epidemiologische Bulletin* 1999; 23.
- [52] Tschäpe H, Bockemühl J. Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 2002; 45:491-496.
- [53] The Merck Veterinary Manual 9th Edition. Whitehouse Station, N.J. USA: Merck & Co., Inc., 2005.
- [54] Steinmüller R. Lebensmittelallergie-wenn Essen krank macht (Teil2). *Hygienereport* 2004; 2:6-9.
- [55] Andre F, Andre C, Colin L, Cacaraci F, Cavagna S. Role of new allergens and of allergens consumption in the increased incidence of food sensitizations in France. *Toxicology* 1994; 93:77-83.
- [56] Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:191-193.
- [57] Madsen C. Prevalence of food allergy: an overview. *Proc Nutr Soc* 2005; 64:413-417.
- [58] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:S470-S475.

- [59] Zuberbier T, Edenharter G, Worm M, et al. Prevalence of adverse reactions to food in Germany – a population study. *Allergy* 2004; 59:338-345.
- [60] Sánchez-Monge R, Saldeco G. Analytical methodology for assessment of food allergens: opportunities and challenges. *Biotechnol Adv* 2005; 23:415-422.
- [61] Rojas-Hijazo B, Garces MM, Caballero ML, Alloza P, Moneo I. Unsuspected lupin allergens hidden in food. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141:47-50.
- [62] Mills ENC, Valovirta E, Madsen C, et al. Information provision for allergic consumers - where are we going with food allergen labelling? *Allergy* 2004; 59:1262-1268.
- [63] Kanny G, Fremont S, Talhouarne G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Anaphylaxis to mustard as a masked allergen in "chicken dips". *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 75:340-342.
- [64] Hischenhuber C. Allergen management in the food industrie - potential and limitations. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49:4-5.
- [65] Hefle SL, Taylor SL. Food allergy and the food industry. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; 4:55-59.
- [66] Giese J. Food Allergen Testing. *FoodTechnol* 2003; 57:98-100.
- [67] Crevel RW, Ballmer-Weber BK, Holzhauser T, et al. Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders. *Allergy* 2008; 63:597-609.
- [68] Borelli S, Anliker MD, Wuthrich B. Peanut anaphylaxis: the problem of hidden allergens. *Dtsch Med Wochenschr* 1999; 124:1197-1200.
- [69] Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. *The EFSA Journal* 2004; 32:1-197.
- [70] Ballmer-Weber BK, Holzhauser T, Scibilia J, et al. Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: a double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1489-1496.
- [71] Hourihane JOB, Knulst AC. Thresholds of allergenic proteins in foods. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 207:S152-S156.
- [72] Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, Atkins FM. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how is too much?? *Clin Exp Allergy* 2004; 34:689-695.
- [73] Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, et al. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much? *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:24-30.
- [74] Boden M, Dadswell R, Hattersley S. Review of statutory and voluntary labelling of food allergens. *Proc Nutr Soc* 2005; 64:475-480.
- [75] Sicherer SH, Teuber S. Current approach to the diagnosis and management of adverse reactions to foods; AAAAI Practice Paper. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1146-1150.
- [76] Analytik ABum. Stellungnahme: Nachweisverfahren für Nahrungsmittelallergene. *Lebensmittelchemie* 2004; 58:116.
- [77] Goodwin PR. Food allergen detection methods: a coordinated approach. *J AOAC Int* 2004; 87:1383-1390.
- [78] Poms RE, Anklam E, Kuhn M. Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *J AOAC Int* 2004; 87:1391-1397.

- [79] Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam* 2004; 21:1-31.
- [80] Koch P, Schappi GF, Poms RE, Wuthrich B, Anklam E, Battaglia R. Comparison of commercially available ELISA kits with human sera-based detection methods for peanut allergens in foods. *Food Addit Contam* 2003; 20:797-803.
- [81] Poms RE, Agazzi ME, Bau A, et al. Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate. *Food Addit Contam* 2005; 22:104-112.
- [82] Maleki SJ. Food processing: effects on allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:241-245.
- [83] Maleki SJ, Hurlburt BK. Structural and functional alterations in major peanut allergens caused by thermal processing. *J AOAC Int* 2004; 87:1475-1479.
- [84] Sathe S, Teuber SS, Roux KH. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnol Adv* 23 2005.
- [85] CEN. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based method. ISO/DIS 21569 prEN ISO 21569 2002.
- [86] CEN. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction. ISO/DIS 21571 prEN ISO 21571 2002.
- [87] Holzhauser T, Stephan O, Vieths S. Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *J Agric Food Chem* 2002; 50:5808-5815.
- [88] Holzhauser T, Vieths S. Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein in complex food matrices. *J Agric Food Chem* 1999; 47:603-611.
- [89] Holzhauser T, Wangorsch A, Vieths S. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes. *Euro Food Res Technol* 2000; 211:360-365.
- [90] Pedersen MH, Holzhauser T, Bisson C, et al. Soybean allergen detection methods - A comparison study. *Mol Nutr Food Res* 2008.
- [91] Dahinden I, von Büren M, Lüthy J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *Euro Food Res Technol* 2001; 212:228-233.
- [92] Sandberg M, Lundberg L, Ferm M, Malmheden Yman I. Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *Euro Food Res Technol* 2003; 217:344-349.
- [93] Mafra I, Ferreira I, Oliveira M. Food authentication by PCR-based methods. *Euro Food Res Technol* 2008; 227:649-665.
- [94] Pastinen T. Scoring human genomic SNPs and mutations: Multiplexed primer extension with manifolds and microarrays as solid-support. Academic dissertation 2000.
- [95] Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, Peltonen L, Syvaanen A-C. Minisequencing: A specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res* 1997; 7:606-614.
- [96] Erdogan F, Kirchner R, Mann W, Ropers HH, Nuber UA. Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:E36.

- [97] von Nickisch-Rosenegk M, Marschan X, Andresen D, Abraham A, Heise C, Bier F. On-chip PCR amplification of very long templates using immobilized primers on glassy surfaces. *Biosens Bioelectron* 2005; 20:1491-1498.
- [98] Adessi C, Matton G, Ayala G, et al. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:E87.
- [99] Huber M, Losert D, Hiller R, Harwanegg C, Mueller M, Schmidt W. Detection of single base alterations in genomic DNA by solid phase polymerase chain reaction on oligonucleotide microarrays. *Anal Biochem* 2001; 299:24-30.
- [100] Huber M, Mündlein A, Dornstauder E, et al. Accessing single nucleotide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays. *Anal Biochem* 2002; 303:25-33.
- [101] Mitterer G, Huber M, Leidinger E, et al. Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1048-1057.
- [102] Nickisch-Rosenegk M, Marschan X, Andresen D, Bier FF. Reverse transcription-polymerase chain reaction on a microarray: the integrating concept of "active arrays". *Anal Bioanal Chem* 2008; 391:1671-1678.
- [103] Tillib S, Mirzabekov A. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12:53-58.
- [104] Huber M, Losert D, Hiller R, Harwanegg C, Mueller MW, Schmidt WM. Detection of single base alterations in genomic DNA by solid phase polymerase chain reaction on oligonucleotide microarrays. *Anal Biochem* 2001; 299:24-30.
- [105] Mitterer G, Huber M, Leidinger E, et al. Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1048-1057.
- [106] Mitterer G, Schmidt W. Microarray-based detection of bacteria by on-chip PCR. *Methods Mol Biol* 2006; 345:37-51.
- [107] Pemov A. DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. *Nucleic Acids Research* 2005; 33:e11-e11.
- [108] Strizhkov B, Dobryshev A, Mikhailovic V, Mirzabekov A. PCR Amplification on a Microarray of Gel-Immobilized Oligonucleotides: Detection of Bacterial Toxin- and Drug-Resistant Genes and Their Mutations. *BioTechniques* 2000; 29:844-854.
- [109] Tillib S, Strizhkov B, Mirzabekov A. Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. *Anal Biochem* 2001; 292:155-160.
- [110] Southern E, Mir K, Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. *nature genetics supplement* 1999; 21:5-9.
- [111] Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep* 2004; 5:795 - 800.
- [112] Motre A, Li Y, Kong H. Enhancing helicase-dependent amplification by fusing the helicase with the DNA polymerase. *Gene* 2008; 420:17-22.
- [113] An L, Kong H, Tang W, Ranalli T, Kim H, Wytiaz J. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J Biol Chem* 2005; 280:28952 - 28958.

- [114] Goldmeyer J, Tang W, Kong H. Development of a novel one-tube isothermal reverse transcription thermophilic helicase-dependent amplification platform for rapid RNA detection. *J Mol Diagn* 2007; 9:639-644.
- [115] Goldmeyer J, Li H, McCormac M, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of methicillin resistance directly from positive blood cultures by isothermal amplification and a disposable detection device. *J Clin Microbiol* 2008; 46.
- [116] Biohelix. IsoAmp II Universal tHDA Kit Manual. 2008.
- [117] Tong Y, Tang W, Kim H, Pan X, Ranalli T, Kong H. Development of isothermal TaqMan assay for detection of biothreat organisms. *BioTechniques* 2008; 45:543-557.
- [118] Ralph RK, Young RJ, Khorana HG. The labeling of phosphomonoester end groups in amino acid acceptor ribonucleic acids and its use in determination of nucleic sequences. *J Am Chem Soc* 1962; 84:1490-1491.
- [119] Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD. Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acid Res* 2001; 29:e38.
- [120] Southern E. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1977; 100:319-323.
- [121] Nikiforov TT, Rendle RB, Kotewicz ML, Rogers Y-H. The use of phosphorothioate primers and exonuclease hydrolysis for the preparation of single-stranded PCR products and their detection by solid-phase hybridization. *PCR Meth Appl* 1994; 3:285-291.
- [122] Higuchi RG, Ochman H. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res* 1989; 17:5865.
- [123] Kujau MJ, Wölfl S. Efficient preparation of single-stranded DNA for in vitro selection. *Mol Biotechnol* 1997; 7:333-335.
- [124] Null AP, Hannis JC, Muddiman DC. Preparation of single-stranded PCR products for electrospray ionization mass spectrometry using the DNA repair enzyme lambda exonuclease. *Analyst* 2000; 125:619-626.
- [125] SantaLucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighborhood thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:1460-1465.
- [126] Andresen D. Arbeiten zur Entwicklung eines Diagnostik-Chips zum Nachweis pathogener Keime am Beispiel dreier unterschiedlicher Bakteriengattungen. Diplomarbeit 2004.
- [127] Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 1997; 23:504-511.
- [128] Jothikumar N, Wang X, Griffiths MW. Real-time multiplex SYBR Green I-based PCR array for simultaneous detection of *Salmonella* Serovars and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 2003; 66:2141-2145.
- [129] Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R. Duplex real-time SYBR Green PCR assays of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5134-5146.
- [130] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270:467-470.
- [131] Eisen MB, Brown PO. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* 1999; 303:179-205.
- [132] Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. Making and reading microarrays. *nature genetics supplement* 1999; 21:15-19.

- [133] Wrobel G, Schlingemann J, Hummerich L, Kramer H, Lichter P, Hahn M. Optimization of high density cDNA-microarray protocols by "design of experiments". *Nucl Acid Res* 2003; 31:e67.
- [134] Kleinjung F, Bier FF, Warsinke A, Scheller FW. Fibre-optic genosensor for specific determination of femtomolar DNA oligomers. *Anal Chim Acta* 1997; 350:51-58.
- [135] Mir K, Southern E. Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1999; 17:788-792.
- [136] Mercier J-F, Slater GW, Mayer P. Solid phase DNA amplification: a simple monte carlo lattice model. *Biophys J* 2003; 85:2075-2086.
- [137] Mercier J-Fo, Slater GW. Solid phase DNA amplification: a Brownian dynamics study of crowding effects. *Biophys J* 2005; 89:32-42.
- [138] Strizhkov BN, Dobryshev AL, Mikhailovic VM, Mirzabekov AD. PCR Amplification on a Micoarray of Gel-Immobilized Oligonucleotides: Detection of Bacterial Toxin- and Drug-Resistant Genes and Their Mutations. *BioTechniques* 2000; 29:844-854.
- [139] Tillib SV, Mirzabekov AD. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12:53-58.
- [140] Tillib SV, Strizhkov BN, Mirzabekov AD. Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. *Anal Biochem* 2001; 292:155-160.
- [141] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e57.
- [142] Chun J-Y, Kim K-J, Hwang I-T, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:e40-e40.
- [143] Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 2005; 126:53-63.
- [144] Kim SR, Ki C-S, Lee NY. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods* 2008.
- [145] Woo HY, Park H, Kim BI, Jeon WK, Kim YJ. Evaluation of dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR for detection of HBV YMDD mutants. *Arch Virol* 2008; 153:2019-2025.
- [146] Wöhrl S, Vigl K, Zehetmayer S, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy* 2006; 61:633-639.
- [147] Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1443-1449.
- [148] Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16:414-416.
- [149] Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43:1321-1326.
- [150] Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays in diagnosing IgE-mediated diseases: spotting allergy at the molecular level. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4:539-548.
- [151] Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, et al. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004; 32:249-254.

- [152] An L, Kong H, Tang W, Ranalli TA, Kim HJ, Wytiaz J. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J Biol Chem* 2005; 280:28952 - 28958.
- [153] Goldmeyer J, Li H, McCormac M, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of methicillin resistance directly from positive blood cultures by isothermal amplification and a disposable detection device. *J Clin Microbiol* 2008; 46.
- [154] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification techniques: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; 27:224-243.
- [155] Walker G, Little M, Nadeau J, Shank D. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:392-396.
- [156] Walker G. Strand Displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucl Acid Res* 1992; 20:1691-1696.
- [157] McCartney RA, Walker J, Scoular A. Detection of *Chlamydia trachomatis* in genitourinary medicine clinic attendees: comparison of strand displacement amplification and the ligase chain reaction. *Br J Biomed Sci* 2001; 58:235-238.
- [158] Spargo CA, Fraiser MS, Van Cleve M, et al. Detection of *M. tuberculosis* DNA using thermophilic strand displacement amplification. *Mol Cell Probes* 1996; 10:247-256.
- [159] Walker GT, Linn CP. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA with thermophilic strand displacement amplification and fluorescence polarization. *Clin Chem* 1996; 42:1604-1608.
- [160] Walker GT, Nadeau JG, Spears PA, Schram JL, Nycz CM, Shank DD. Multiplex strand displacement amplification (SDA) and detection of DNA sequences from *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:2670-2677.
- [161] Westin L, Xu X, Miller C, Wang L, Edman CF, Nerenberg M. Anchored multiplex amplification on a microelectronic chip array. *Nat Biotechnol* 2000; 18:199-204.
- [162] Lizardi P, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas D, Ward D. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* 1998; 19:225-232.
- [163] Hatch A, Sano T, Misasi J, Smith CL. Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection. *Genet Anal* 1999; 15:35-40.
- [164] Demidov VV. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2:542-548.
- [165] Zhang D, Wu J, Ye F, Feng T, Lee I, Yin B. Amplification of circularizable probes for the detection of target nucleic acids and proteins. *Clin Chim Acta* 2006; 363:61-70.
- [166] Szemes M, Bonants P, de Weerd M, Baner J, Landegren U, Schoen C. Diagnostic application of padlock probes-multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:e70.
- [167] Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, Landegren U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science* 1994; 265:2085-2088.
- [168] Nilsson M, Krejci K, Koch J, Kwiatkowski M, Gustavsson P, Landegren U. Padlock probes reveal single-nucleotide differences, parent of origin and in situ distribution of centromeric sequences in human chromosomes 13 and 21. *Nat Genet* 1997; 16:252-255.
- [169] Nilsson M, Banér J, Mendel-Hartvig M, et al. Making ends meet in genetic analysis using padlock probes. *Hum Mutat* 2002; 19:410-415.

- [170] Gyarmati P, Conze T, Zohari S, et al. Simultaneous genotyping of all hemagglutinin and neuraminidase subtypes of avian influenza viruses by use of padlock probes. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1747-1751.
- [171] Banér J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landegren U. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:5073-5078.
- [172] Banér J, Nilsson M, Isaksson A, Mendel-Hartvig M, Antson D-O, Landegren U. More keys to padlock probes: Mechanisms for high-throughput nucleic acid analysis. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12:11-15.
- [173] Sun Z, Zhou L, Zeng H, Chen Z, Zhu H. Multiplex locked nucleic acid probes for analysis of hepatitis B virus mutants using real-time PCR. *Genomics* 2007; 89:151-159.
- [174] Ballantyne KN, van Oorschot RAH, Mitchell RJ. Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance. *Genomics* 2008; 91:301-305.
- [175] Fratzczak A, Kierzek R, Kierzek E. LNA-modified primers drastically improve hybridization to target RNA and reverse transcription. *Biochemistry* 2009; 48:514-516.
- [176] Gustafson KS. Locked nucleic acids can enhance the analytical performance of quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2008; 10:33-42.
- [177] Latorra D, Arar K, Hurley JM. Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes* 2003; 17:253-259.
- [178] Kaur H, Arora A, Wengel J, Maiti S. Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes. *Biochemistry* 2006; 45:7347-7355.
- [179] Fritzler MJ, Fritzler ML. The emergence of multiplexed technologies as diagnostic platforms in systemic autoimmune diseases. *Curr Med Chem* 2006; 13:2503-2512.
- [180] Jain KK. Applications of biochips: from diagnostics to personalized medicine. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2004; 7:285-289.
- [181] Jain KK. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clin Chem* 2007; 53:2002-2009.
- [182] Michell P. Microfluidics-downsizing large-scale biology. *Nat Biotechnol* 2001; 19:717-721.
- [183] Witek M, Hupert M, Park D, Fears K, Murphy M, Soper S. 96-well polycarbonate-based microfluidic titer plate for high-throughput purification of DNA and RNA. *Anal Chem* 2008; 80:3483-3491.
- [184] Kricka L. Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century. *Clin Chim Acta* 2001; 307:219-223.
- [185] Kricka L, Park J, Li S, Fortina P. Miniaturized detection technology in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5:549-559.
- [186] Zhang C, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:4223-4237.
- [187] Zhang C, Xu J, Ma W, Zheng W. PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnol Adv* 2006; 24:243-284.

Anhang A Material

Material

1. Laborgeräte

Analysewaage Satorius BP211T	Satorius AG, Göttingen
Centrifuge 5415 D	eppendorf, Hamburg
Färbekammer für Glasobjektträger	AppliChem, Darmstadt
Gelkammer Modell 40-0708	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gel-Fotodokumentationssystem	biostep GmbH, Jahnsdorf
Hybridisierungsstation	Epigenomics, Berlin
Konfokaler Laserscanner GSM 428	Affymetrix, Santa Clara, USA
Konfokaler Laserscanner Genepix 4200A	Axon Instruments, Vertrieb durch BIO-RAD, München
Lightcycler Version 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
PTC-200 DNA-Engine Thermocycler	MJResearch, Vertrieb durch BIO-RAD, München
PTC-200 DNA-Engine Thermocycler Hybridisierungstower	MJResearch, Vertrieb durch BIO-RAD, mit München
SciFlex Arrayer	Scienion, Berlin
TopSpot M	HSG-IMIT/IMTEK Freiburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
QuadriPERM Kulturschale	Greiner BioOne, Frickenhausen
Wippschüttler Swip	Edmund Bühl

2. handelsübliche Kits und Enzyme

λ – Exonuklease inkl. 10x Puffer	Epicentre, Vertrieb durch Biozym Diagnostic GmbH, hess. Oldenburg
Amicon Microcon-PCR Aufreinigungssäulen	Millipore, Schwalbach
Biotaq PCR Kit	Bioline, Luckenwalde

Amersham Cy3-dUTP 25nmol in 10mM Phosphatpuffer	GE Healthcare Life Science
Amersham Cy5-dUTP 25nmol in 10mM Phosphatpuffer	GE Healthcare Life Science
CentriSpin 50 Aufreinigungssäulen	Princeton Separations Inc., Vertrieb durch EMP Biotech GmbH, Berlin
dNTP-Mix 100mM	Larova GmbH, Teltow
DNA-Marker Hyperladder V	Bioline, Luckenwalde
FastStart SybrGreen I Master	Roche Diagnostics, Mannheim
Fast Start SybrGreen I Master ^{Plus}	Roche Diagnostics, Mannheim
FastStart Multiplex DNA Master Hyb Probe	Roche Diagnostics, Mannheim
IsoAmp II tHDA Amplifikations-Kit	Biohelix , Vertrieb durch NEB, Frankfurt
InviSorb Spin PCRapid Kit	Invitek, Berlin
Ladepuffer 6x	Fermentas, Sankt Leon-Rot
Marker puc19 DNA/Mspl (HpaIII)	Fermentas, Sankt Leon-Rot
Phusion Taq	NEB, Frankfurt
Platinum Taq PCR Kit	Invitrogen, Karlsruhe
SureFood PREP Allergen	Congen Biotechnologie GmbH, Berlin
TITANIUM Taq PCR Kit	Clontech

3. Verbrauchsmaterialien

Glasobjektträger

- | | |
|--|------------------|
| — Aminosilanisierte Glasobjektträger, 76x26mm | Genetix, München |
| — Epoxysilanisierte Glasobjektträger, 76x26mm | Corning, USA |
| — Epoxysilanisierte Glasobjektträger, 76x26mm | Schott, Jena |
| — Objektträger unmodifiziert, Kalk Natron Glas | Röth, Karlsruhe |

Hybriwells, HBB20	Grace Biolabs, Vertrieb durch SIGMA, Taufkirchen
-------------------	--

Lightcycler Capillaries 20µl	Roche Diagnostics, Mannheim
------------------------------	-----------------------------

Reaktionsgefäße 0,2ml, 0,5ml, 1ml und 2 ml	eppendorf, Hamburg
--	--------------------

Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Greiner, Vertrieb durch Diagonal GmbH & Co KG, Münster
----------------------------	---

4. Chemikalien

1-methyl-2pyrrolidinone	AppliChem, Darmstadt
1-Methylimidazol (>99%)	Fluka, Seelze
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bernsteinsäureanhydrid	AppliChem, Darmstadt
DEPC Wasser	AppliChem, Darmstadt
Dichlorethan	AppliChem, Darmstadt
DMSO	AppliChem, Darmstadt
EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethyl-carbodiimid)	Fluka, Seelze
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Gamma-Aminobuttersäure (GABA)	Fluka Biochemica, Seelze
MgCl ₂ 50mM	Promega, Mannheim
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	AppliChem, Darmstadt
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt

5. Puffer

HEPES	AppliChem, Darmstadt
SDS	Sigma Aldrich, Steinheim
50x TAE-Puffer : 2M Tris-Base, 2M Essigsäure, 50mM EDTA	
20x SSC Puffer: 300mM Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7,4	
Hybridisierungspuffer: 5xSSC, 0,5% SDS, 50mM HEPES, 0,5 µM Hybridisierungskontrolle	
Waschpuffer I: 0,6x SSC, 0,2% SDS	
Waschpuffer II: 0,06x SSC	
Waschpuffer III: H ₂ O _{bidest.}	

6. Primer

Alle Primer wurden entweder bei Roth GmbH in Karlsruhe oder via Internet bei Thermo Scientific (www.thermohybid.de) oder Biomers.net (www.biomers.net) bestellt.

Die Primer-Sequenzen unterliegen der Geheimhaltung. Auf Wunsch ist die Einsicht der Sequenzen für die Gutachter möglich. Die Primer-Sequenzen, die in den HDA-Versuchen verwendet wurden sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8 Primersequenzen für die HDA Versuche

Primer ID	Primerlänge	Primersequenz
Ngon Fwd C6-Amino	29 mer	5'-C6-Aminolinker- GCAAAGTTTGACAACGATTCAAAGGTTT-3'
Ngon Rev- Cy5	27 mer	5'-Cy5-TTGCTCCATGCAGATATGCAGATTCT-3'
MRSA Fwd C6-Amino	27 mer	5'-C6-Aminolinker-GAAAAATGATTATGGCTCAGGTAAGTGC-3'
MRSA Rev Cy5	27 mer	5'-Cy5-TGGATAGACGTCATATGAAGGTGTGCT-3'

Anhang B Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Peer reviewed

1. Markus von Nickisch-Rosenegk, Xenia Marschan, **Dennie Andresen**, Alexandra Abraham, Christian Heise, Frank F. Bier: *On-chip PCR amplification of very long templates using immobilized primers on glassy surfaces*; Biosensors and Bioelectronics, Volume 20, Issue 8, 15 February 2005, p. 1491-1498 Selected Papers from the Eighth World Congress on Biosensors, Part I
2. Bier F.F.; **Andresen, D.**; Walter, A.: *DNA based Bio-Micro-Electrical-Mechanical Systems*. Urban, G. A.: BioMEMS, Springer Verlag, p.167-198 (2006)
3. Frank Bier , Markus von Nickisch-Rosenegk , Eva Ehrentreich-Förster , Edda Reiß , Jörg Henkel , Rothin Strehlow , **Dennie Andresen**: *DNA Microarrays*. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2007 Nov 6; : 17985099
4. Markus von Nickisch-Rosenegk, Xenia Marschan, **Dennie Andresen**, Frank F. Bier: *Reverse transcription-polymerase chain reaction on a microarray: the integrating concept of "active arrays"*. Anal Bioanal Chem 391(5): 1671-1678.
5. **Dennie Andresen**, Markus von Nickisch-Rosenegk, Frank F. Bier: *OnChip-HDA for Single and Multiplex detection of pathogens*. Under Review bei Acta Chimica Clinica, 2009
6. Ehrentreich-Förster, **Andresen D.**: *Point of Care – Verfügbarkeit und Marktpotential*. In press bei LaboratoriumsMedizin, 2009

Andere:

1. **Andresen, D.** Eva Ehrentreich-Förster: *Microarray-Diagnostik von Allergenen*; Laborwelt 6/2005
2. **Andresen, D.**, Ehrentreich-Förster, E.: *Microarray-Diagnostik von Lebensmittelallergenen*. 2006, Artikel in Tagungsband anlässlich der 4. Biotechnologischen Umwelttage in Reisingburg (Bayern)
3. Bier Frank F., **Andresen D.**: *Technical Challenges in Hardware Development for Modern in vitro Diagnostics and the Point of Care Testing*. BioTopics 32, September 2007 Molecular Diagnostics

Posterbeiträge und Vorträge

Poster

2004

- | | |
|--------------------|---|
| Frankfurt | Dechema 4. Chipstatusseminar
"Development of a DNA-Chip for detection of Food Allergens" |
| Suhl | 6. Fachsyposium der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene
"Entwicklung von DNA-Chips für Anwendungen in der Lebensmitteldiagnostik" |
| Granada
Spanien | Biosensor World Congress
"Development of a DNA-Chip for detection of Food Allergens" |

2005

- | | |
|-----------------|---|
| Frankfurt | Dechema 5. Chipstatusseminar
"Development of a Multiplex OnChip-PCR and their use in diagnostic Applications" |
| Genf
Schweiz | Screening Europe
"Development of a Multiplex OnChip-PCR and their use in diagnostic applications" |
| Regensburg | Deutsches Biosensor Symposium
"Multiplex OnChip-PCR for the analysis of food ingredients" |

2006

- | | |
|-----------|--|
| Frankfurt | Dechema 6. Chipstatusseminar
"Development of a DNA-Chip for detection of pathogens in poultry" |
|-----------|--|

Toronto Biosensor World Congress 2006
Kanada **"Development of a Multiplex OnChip-PCR and its use in food-allergen testing"**

2008

Barcelona Lab on Chip Worldcongress 2008
"A modular platform for Lab on Chip systems in Point of Care diagnostics"

Vorträge

2005

Luckenwalde Deutsch-Schwedisches Wissenschaftsmeeting
"Development of a Multiplex OnChip-PCR and its use in food-allergen testing"

2006

Ulm Symposium: Biotechnologie und Umwelttage Ulm
"Microarraydiagnostik von Lebensmittelallergenen"

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Bier für die Bereitstellung und Betreuung dieser Doktorarbeit sowie der Unterstützung und Förderung meiner betriebswirtschaftlichen Horizonterweiterung im Rahmen meines MBA Studiums.

Frau Dr. Eva Ehrentreich-Förster danke ich für ihre Unterstützung und freundlichen Ratschläge sowohl im Fachlichen als auch Organisatorischen.

Herrn Dr. Markus Nickisch von Rosenegk danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und das offene Ohr, wenn es mal Probleme gab.

Der Firma Congen danke ich für die Bereitstellung des DNA-Materials und für die Möglichkeit, dass ich einige der Versuche bei ihnen durchführen konnte.

Frau Prof. Dr. Ursula Bilitewski, Frau Prof. Dr. Kullinger und Herrn Prof. Dr. Till Bachmann danke ich für das Gutachten dieser Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fraunhofer IBMT danke ich für eine schöne, lehrreiche und unterhaltsame Zeit in einem angenehmen Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich Dirk Michel und Michaela Schellhase für ihre unermüdlichen Arbeiten an den Spottern danken. Martina Beysel und Mandy Heim danke ganz besonders für die Unterstützung bei den HDA-Experimenten zum Ende der Arbeit. Kathi Großmann danke ich dafür, dass sie die administrativen Dinge immer so einfach für einen gestaltet hat.

Heiko Andresen, Niko Hentze und Lena Pawella danke ich für die inspirierenden Pausen und Kaffeegespräche und vor allem den Spaß, den wir während der gesamten Zeit innerhalb und außerhalb des Institutes gehabt haben. Danke dafür!!

Chris und Ani, Sassi, Olli, Maria und Emil, Sean, Dani und Liam, Fabian und Julia, Kevin und allen Baseballern der Berlin Sluggers danke ich dafür, dass ihr es geschafft habt, dass ich mich in Berlin so schnell heimisch gefühlt und neben meiner Arbeit immer den nötigen Ausgleich und Rückhalt gefunden habe, egal ob es gerade gut oder schlecht lief. Danke für alles, was ihr für mich getan habt und das ich Euch als Freunde habe!

Von ganzem Herzen danke ich ganz besonders meiner Freundin Conny, für ihre Hilfe, ihre Geduld während der Zeit, wo ich schreiben musste und für einfach alles was wir zusammen haben und noch erleben werden. Danke für alles !!

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Ihr seid die Besten! Ohne Euch wäre alles schwieriger geworden.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Desweiteren bestätige ich, dass diese Arbeit bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Dennie Andresen, Potsdam, 5. März 2009