

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Analytische Chemie
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

**Entwicklung und Validierung eines
automatisierten DNA-Mikroarrays zur Detektion
von humanpathogenen Bakterien in
Trinkwasser**

Simon Donhauser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schuster

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. M. Groll

Die Dissertation wurde am 07.03.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 08.04.2014 angenommen.

Meinen Eltern

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit vom April 2007 bis Juni 2010 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der TU München unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner. Ein Teil der Arbeit wurde durch das Projekt „AQUASense“ des BMBF gefördert. Den Menschen, die mich auf diesem Weg unterstützt haben, möchte ich diese Seiten widmen.

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit, dieses sehr interessante Projekt durchführen zu können. Die Bereitstellung der guten Rahmenbedingungen sowie die gute Ausstattung der Laboratorien trugen sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Seidel für seine hilfreichen Anregungen und Diskussionen, den Freiraum zur selbstständigen Arbeit und die produktive und zugleich angenehme Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.

Dr. Gerhard Pappert und Julius ElMasry danke ich herzlich für die akademischen und nicht akademischen Diskussion sowie die kameradschaftliche Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhles danke ich an dieser Stelle ganz besonders für das freundliche Arbeitsklima und die konstruktive Zusammenarbeit v.a. Dr. Christian Cervino, Dr. Carsten Kykal, Dr. Gabriele Hörnig, Agathe Szkola, Dr. Veronika Langer, Dr. Sonja Ott, Sandra Lengger, Dr. Klaus Wutz, Dr. Clemens Helmbrecht, Dr. Caroline Peskoller, Dr. Jimena Saucedo-Friebe und Dr. Johannes Schmid möchte ich meine ganz besondere Wertschätzung entgegenbringen. Dr. Anne Wolter danke ich besonders für die Einarbeitung und einführenden Erklärungen während der ersten Wochen am Institut.

Vielen Dank auch der IWC Weihnachtsband und dem IWC Weihnachtschor.

Herrn Sebastian Wiesemann und Julius ElMasry danke ich auf diesem Weg für ihre Hilfe bei Auf- und Umbau der Anlagen und Chips.

Meinen Praktikanten und Bachelorstudenten Wolfgang Wolter, Andreas Maier, Jens Buchholz, Florian Huber, Aleksei Vjunov und Stephanie Robu gebührt ein Dank für die Hilfe, die sie mir im Labor waren.

Vielen Dank an Dr. Stefan Jordan für die Unterstützung bei den DNA-Konzentrationsmessungen, an Herrn Dr. Michael Bandilla von FRIZBiochem für die Diskussionen zum Sondendesign, sowie an die anderen Kollegen im AQUASens

Projekt. Dem Pettenkofer Institut in Großhadern danke ich für die Unterstützung und Diskussion zur EHEC-Analyse. Dr. Xaver und York Karsunke möchte ich für die neu entwickelte Auswertesoftware danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn apl. Prof. Dr. Dietmar Knopp, PD Dr. Thomas Baumann, PD Dr. Christoph Haisch und Dr. Natalia Ivleva für ihre offenen Ohren und für ihre hilfreichen Tipps.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem für die Unterstützung der Forscherfreunde, Florian Neudecker, Dr. Frederik Naraschewski, sowie meinen Freunden aus der EliteAkademie.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mentoren und akademischen Lehrern Dr. German Paul, Professor Dr. Michael Mirow, Professor Dr. Elfriede Nößner, Professor Dr. Thilo Fuchs, Professor Dr. Siegfried Scherer, Professor Dr. Johannes Buchner und Herrn Maier.

Mein ganz besonderer und liebevoller Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Susanne, ihrem Mann Rainer, meinem Patenkind Rosemarie und meiner guten Fee Alina Scripnic für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Außerdem danke ich folgenden Institutionen die durch finanzielle und ideelle Förderung zur Ermöglichung dieser Arbeit erheblich beigetragen haben: das BMBF, die Hanns-Seidel-Stiftung e.V., die Carl von Linde-Akademie und die Bayerische EliteAkademie.

Der Huntsman Corporation danke ich für die Bereitstellung kostenloser PEG-Proben. Der Adhesives Research GmbH danke ich für die Bereitstellung kostenloser Klebefolien.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Vater, Alina Scripnic, Dr. Julia Zorn, Dr. Gerhard Pappert, Dr. Christoph Kaiser und Julian Gronau für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht

Donhauser, S.C., Niessner, R., and Seidel, M. (2008). Rapid automated chemiluminescence oligonucleotide microarray for the detection of human pathogens in liquids, e.g. drinking water. *Luminescence* 23, 216–217.

Donhauser, S.C., Niessner, R., and Seidel, M. (2009). Quantification of *E. coli* DNA on a flow-through chemiluminescence microarray readout system after PCR amplification. *Anal. Sci.* 25, 669–674.

Donhauser, S.C., Niessner, R., and Seidel, M. (2011). Sensitive Quantification of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Campylobacter jejuni* by combining stopped polymerase chain reaction with chemiluminescence flow-through DNA microarray analysis. *Anal. Chem.* 83, 3153–3160.

Zitate

„Wir alle stehen auf den Schultern von Riesen.“

Bernhard von Chartres

“I’d rather shoot for the stars and miss, than aim at the mud and hit every time.”

Anonymous

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Zielsetzung.....	6
2. Theoretische Grundlagen	8
2.1 Mikroorganismen im Trinkwasser	8
2.2 Untersuchte Bakterien.....	10
2.2.1 Coliforme Keime.....	10
2.2.2 <i>Raoultella planticola</i>	14
2.2.3 <i>Escherichia coli</i>	15
2.2.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	21
2.2.5 <i>Legionella pneumophila</i>	23
2.2.6 <i>Salmonella</i> Typhimurium	28
2.2.7 <i>Campylobacter jejuni</i>	33
2.2.8 Vergleichbarkeit der Analysen mit unterschiedlichen PCR-Primern	36
2.3 Anreicherung der Bakterienzellen	38
2.4 Zellaufschluß und DNA-Extraktion	41
2.4.1 Zelllyse	41
2.4.2 DNA-Extraktion.....	43
2.5 Polymerasekettenreaktion.....	45
2.5.1 PCR und DNA-Quantifizierung	45
2.5.2 Identifikation der PCR-Produkte	46
2.5.3 PCR-Strategien	47
2.6 Quantitative PCR	48
2.6.1 Realtime-PCR mit <i>SYBR Green</i>	48
2.6.2 Realtime-PCR mit Hydrolysesonde	49
2.6.3 Digitale Tropfen-PCR	51
2.6.4 Einbindung der quantitativen PCR in eine automatisierte fluidische Umgebung.....	52
2.7 Isothermale Amplifikation.....	53

2.8 PCR zur Amplifikation des gesamten Genoms	55
2.9 Heterogene CL-DNA-Hybridisierungsassays	56
2.10 Vergleich der Mikroarrayreportersysteme	58
2.10.1 Chemilumineszenzreportersysteme	58
2.10.2 Elektrochemilumineszenzreportersysteme (ECL).....	60
2.10.3 Fluoreszenzreportersysteme	61
2.10.4 Elektrochemische Reportersysteme	62
2.10.5 Markierungsfreie Detektionssysteme.....	63
2.11 Fortschritte in der Mikrofluidik und Chiptechnik.....	66
2.12 Vergleich der verschiedenen Testverfahren.....	67
3. Ergebnisse und Diskussion	72
3.1 Oberflächenchemie	72
3.1.1 Entwicklung der Oberflächenchemie und der Spotting-Bedingungen.....	72
3.1.2 Regenerationsmethoden	73
3.1.3 Verbesserung der Regenerierbarkeit.....	79
3.1.4 Diskussion	81
3.2 Quantifizierung von synthetischen Oligonukleotiden.....	82
3.2.1 Der Nachweis von DNA auf einem DNA-Mikroarraysystem	82
3.2.2 Kalibrierung des DNA-Mikroarrays mit synthetischen Oligonukleotiden ...	85
3.2.3 Diskussion	86
3.3 Gegenüberstellung der Amplifikationsmethoden.....	87
3.3.1 Arbeitsablauf	87
3.3.2 <i>Multiple Displacement Amplification</i>	89
3.3.3 GenomePlex Whole Genome Amplification.....	91
3.3.4 Endpunkt-PCR.....	93
3.3.5 Stopped-PCR	95
3.3.6 Diskussion	97
3.4 Quantifizierung von PCR-Produkten	98
3.4.1 Nachweisprinzip	98
3.4.2 Das Prinzip der Quantifizierung.....	100
3.4.3 Diskussion	101

3.5 Quantifizierung von pathogenen Bakterien	102
3.5.1 Weitere Optimierung.....	102
3.5.2 Einzelstrangabtrennung.....	106
3.5.3 Parameterbestimmung im Auslesegerät.....	107
3.5.4 Quantifizierung mit einem DNA-Mikroarray in Zellen pro Milliliter.....	108
3.5.5 Kreuzreaktivitäten	117
3.5.6 Diskussion	118
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	119
5. Summary and Outlook.....	123
6. Experimenteller Teil.....	126
6.1 Chemikalien	126
6.2 Puffer	127
6.3 Bakterien.....	129
6.4 Geräte	130
6.5 Bakterienanzucht	130
6.6 Konzentrationsbestimmung der Bakteriensuspension	131
6.7 DNA-Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung.....	131
6.8 Sondendesign	132
6.9 Realtime-PCR mit Hydrolysesonde.....	137
6.10 Realtime-PCR mit SYBR Green.....	139
6.11 Multiple Displacement Amplification.....	141
6.12 GenomePlex Whole Genome Amplification	142
6.13 Einzelstrangabtrennung mittels μ Bead-Assay.....	143
6.14 DNA-Mikroarray-Auslesegerät	144
6.14.1 Aufbau	144
6.14.2 Ablaufprotokoll.....	145
6.14.3 Oberflächenchemie	146
6.14.4 Vorbehandlung	147
6.14.5 Silanisierung.....	147
6.14.6 Vorbereitung und Aktivierung der Diamino-PEG-Oberfläche.....	148
6.14.7 DNA-Mikrodosierung	148
6.14.8 Flusszelle	150

6.15 Statistische Angaben und Auswertung.....	151
7. Abkürzungsverzeichnis.....	152
8. Abbildungsverzeichnis.....	154
9. Tabellenverzeichnis.....	159
10. Literatur	161

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Sauberes Trinkwasser ist essentiell für das Überleben eines jeden Menschen. Ein Mensch kann einige Tage, eventuell auch Wochen ohne Nahrung überleben, ohne sauberes Trinkwasser verkürzt sich die Überlebenszeit allerdings erheblich. Deshalb ist in unserer modernen Gesellschaft die Kontrolle der Qualität von Trinkwasser eine sehr wichtige Aufgabe (Mälzer et al., 2010; Smeets et al., 2010). Es gibt eine große Zahl an verunreinigenden Agentien, u.a. Pestizide, pharmazeutische Stoffe und chemische Toxine, aber auch humanpathogene Mikroorganismen. Diese sind die bekanntesten Kontaminanten, aber auch die gefährlichsten, da sie sich unter Umständen vermehren und dadurch beim Menschen Krankheiten auslösen können (Ashbolt, 2004a; Richardson, 2009). Von 1971 bis 2002 wurden in den USA 764 Fälle von Infektionen dokumentiert, bei denen verseuchtes Trinkwasser der Auslöser war. 575.457 Erkrankungen und 79 Tote wurden gezählt (Reynolds et al., 2008; Blackburn et al., 2004; Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats (Hrsg.), 2009).

Einer der schwersten Krankheitsausbrüche, die über das Trinkwassersystem ausgelöst wurden, war eine Infektion mit dem Protozoon *Cryptosporidium parvum* im Jahr 1993 in Milwaukee, Wisconsin (Mac Kenzie et al., 1994). Dabei wurden 400.000 Menschen infiziert. Trotz guter Reinigungssysteme wurde in einer Ausnahmesituation das Trinkwasser verunreinigt und konnte aus technischen Gründen nicht wieder desinfiziert werden. Bestimmte Ereignisse wie starke Regenfälle stellen für die Trinkwasserversorgung immer eine Herausforderung dar (Thomas et al., 2006). Mikroorganismen werden dabei aus ihren natürlichen Habitaten ins Trinkwasser eingebracht, was meist durch Verunreinigungen mit Abwasser oder Oberflächenwasser geschieht. Die Trinkwasserverunreinigung in

1. Einleitung und Zielsetzung

Walkerton, Kanada im Jahre 2000 wird auf ein solches Ereignis zurückgeführt. Dabei starben sieben Menschen durch eine Infektion mit *E. coli* O157:H7, die durch das Trinkwasser übertragen wurde (Public Health Agency of Canada, 2000; Schindler, 2004; Pardy, 2003). Im Zusammenhang mit Infektionen, die über das Trinkwasser übertragen werden, sind neben verschiedenen *E. coli*-Stämmen noch weitere Krankheitserreger zu nennen, wie zum Beispiel *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* und *Legionella pneumophila* (Muniesa et al., 2006; Quilliam et al., 2011; Sharma et al., 2003; Zhu et al., 2005).

Zusätzlich zu der natürlichen Gefährdung des Trinkwassers kommt, dass humanpathogene Bakterien, neben Viren, bereits seit den Zeiten des Kalten Krieges als potentielle biologische Waffen betrachtet werden (Guery, 2004; Lim et al., 2005). Die weitreichenden Folgen einer Verunreinigung des Trinkwassers, egal ob diese durch natürliche Ereignisse ausgelöst wird oder menschliche Absicht dahinter steht, machen ein möglichst effizientes und schnelles Nachweissystem für Verunreinigungen im Trinkwasser notwendig (Ivnitski et al., 1999). Der bisherige Goldstandard für den Nachweis humanpathogener Bakterien beruht auf Kultivierungsmethoden, die zwar in der Lage sind, die Organismen zuverlässig zu identifizieren, aber auch teuer, arbeitsintensiv und zeitaufwendig sind (Brown and Hussain, 2003). Wichtigster Bestandteil dieser Methoden sind adäquate Wachstumsmedien und passende Wachstumsbedingungen wie Temperatur oder Luftfeuchtigkeit. Diese Nachweise benötigen in der Regel zwischen 24 und 48 Stunden, um Ergebnisse zu liefern und sind daher nicht für Situationen geeignet, in denen es um schnelle Diagnostik-basierte Entscheidungen geht, die im Ergebnis Geld einsparen oder sogar Leben retten können. Durch den hohen Zeitaufwand für diese Tests ist es nur möglich, die Keime nach einer gewissen Zeit nachzuweisen, nämlich wenn das Trinkwasser bereits von einem großen Teil der Bevölkerung genutzt wurde. Fehlende Standardisierung, geringe Sensitivität und verdachts-basierte Anwendung dieser Tests sind weitere entscheidende Nachteile neben der Tatsache, dass mit diesen Verfahren nur lebende Mikroorganismen nachgewiesen werden können, die sich auch unter den gegebenen Bedingungen kultivieren lassen

(Hobson et al., 1996). Durch die Notwendigkeit eines spezifischen Kulturmediums ist es sehr schwierig, zum Beispiel *Legionella spp.* oder *Mycobacteria spp.* zu identifizieren. Diese Tests geben auch nur Aufschluss über die Spezies, aber nicht über den Genotyp oder die Virulenzfaktoren (Ahmed et al., 2007; Casarez et al., 2007; Pavankumar and Sankaran, 2008).

Um die Pathogenität einer Probe zu beurteilen, ist es notwendig über die Analyse lebender, kultivierbarer Mikroorganismen hinauszugehen. Horizontaler Gentransfer, also die Aufnahme von Bakterien-DNA eines anderen Bakteriums (zum Beispiel eines abgestorbenen Bakteriums) oder der Transfer von Virulenzfaktorgenen durch Bakteriophagen, sind bedeutende Effekte innerhalb einer Probe. Ein zunächst nicht pathogenes Bakterium kann durch die Aufnahme einer gewissen DNA-Sequenz pathogen werden (Abb. 1).

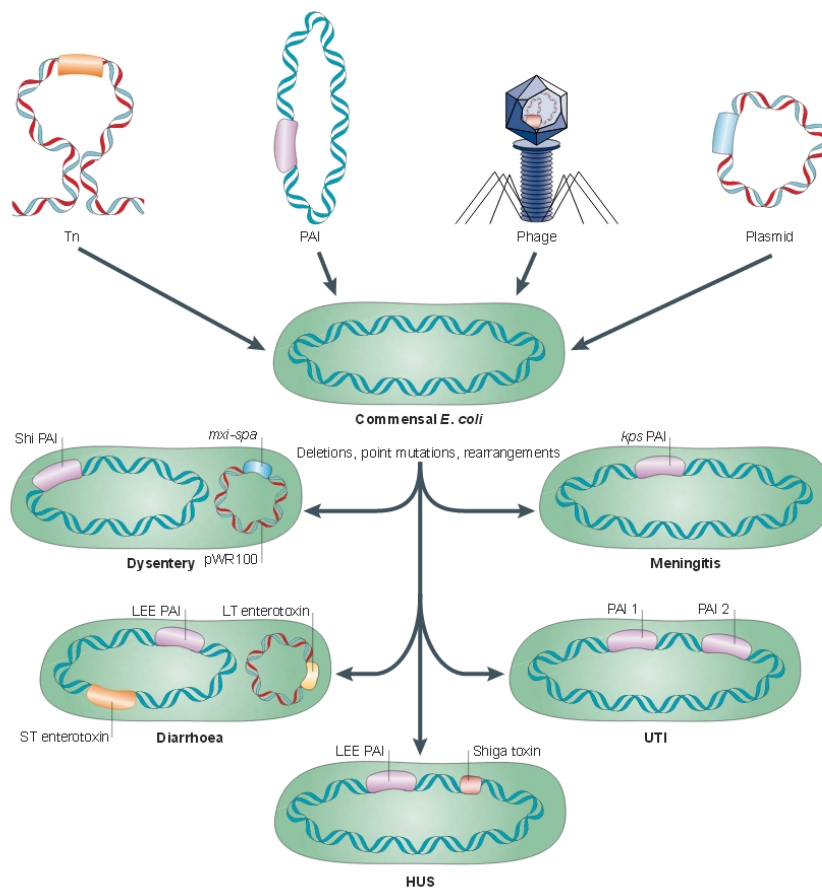


Abb. 1: Beitrag mobiler genetischer Elemente zur Entstehung pathogener *E. coli* (Kaper et al., 2004).

1. Einleitung und Zielsetzung

Virulenzfaktoren von *E. coli* können auf verschiedenen mobilen genetischen Elementen kodiert sein., u.a. auf Transposons (z.B. *heat stable enterotoxin*), auf Plasmiden (z.B. *heat-labile enterotoxin*), auf Bakteriophagen (z.B. *shiga toxin*) und auf Pathogenitätsinseln (z.B. der Locus des *enterocyte effacement*). In nicht pathogenen *E. coli* können Punktmutationen oder DNA-Rearrangements auftreten die ebenfalls einen Einfluss auf die Virulenz haben. Durch die Gesamtheit der Veränderungen können aus nicht pathogenen *E. coli* pathogene *E. coli* entstehen, die Durchfall, Ruhr, ein hämolytisch-urämisches Syndrom, einen Harnwegsinfekt oder eine Meningitis auslösen (Ahmed et al., 2008; Kaper et al., 2004; Yue et al., 2012).

Es ist also nicht nur notwendig die Art der vorliegenden, lebenden Bakterien zu bestimmen, sondern den gesamten genetischen Inhalt einer Probe zu kennen (Akiba et al., 1960; Barlow, 2009; Gogarten, 2000). Das Transformationsprinzip wurde in dieser Hinsicht sehr lange unterschätzt. Die Präsenz von Phänomenen wie horizontaler Gentransfer und mobile genetische Elemente legen nahe, dass die alleinige Analyse lebender Zellen nicht ausreichend ist. Virulenzfaktoren, die auf Plasmiden von toten Bakterienzellen kodiert werden oder sich in Bakteriophagen befinden, können von lebenden, aber bis dahin nicht pathogenen *E. coli*-Zellen aufgenommen werden und sie in pathogene Zellen verwandeln. So kann beispielsweise ein Austreten von ubiquitär vorkommenden Bakteriophagen aus *E. coli* O157:H7 ganz einfach durch die Antibiotika Trimethoprim-Sulfamethoxazol oder Ciprofloxazin ausgelöst werden, wobei die Bakteriophagen dann zum Beispiel *stx*-Gene tragen (Shaikh and Tarr, 2003). Dies führt dazu, dass die Gensequenz auch nach einer Behandlung mit Antibiotika weiter getragen wird. Die Bakteriophagen übertragen die *stx*-Gensequenz wieder auf nicht pathogene Zellen, usw. Ob also eine Probe gesundheitsgefährdend ist, hängt nicht davon ab, ob sie kultivierbare pathogene Bakterien enthält, sondern, ob das gesundheitsgefährdende genetische Material vorhanden ist.

Diese Erkenntnisse zeigen deutlich, dass eine einfache Kultivierung von Mikroorganismen nicht ausreicht, um eine umfassende Analyse von Trinkwasser und

Lebensmitteln zu gewährleisten. Aufwendigere und komplexere Methoden sind von Nöten, um eine genaue Analyse der Proben erreichen zu können. Die Kultivierungsmethoden werden dabei von anspruchsvolleren molekularbiologischen Methoden abgelöst (Connelly and Baeumner, 2012). Dazu zählen zum Beispiel die Realtime-PCR oder DNA-Mikroarrays. Diese Methoden sind bereits etabliert, zuverlässig, empfindlich und benötigen keine vorhergehende Kultivierung der Organismen (Lazcka et al., 2007). Die Realtime-PCR wurde für Multiplexanwendungen erweitert, kann aber nicht mit der Anzahl an parallel möglichen Analysen der Mikroarrays mithalten (Huang et al., 2009; Palka-Santini et al., 2009; Zhu et al., 2007), da sie aufgrund der spektralen Überschneidung der Fluorophore auf ca. sechs gleichzeitige Nachweise beschränkt ist (Pierik et al., 2012). DNA-Mikroarrays haben Eigenschaften der PCR (sequenzspezifische, sensitive Nachweise, schnelle Analysen) in Kombination mit geringen Kosten und der Fähigkeit, viele Analysen parallel durchführen zu können (Lemarchand et al., 2004; Rodriguez-Mozaz et al., 2006; Connelly and Baeumner, 2012). Mikroarrays und die PCR lassen sich zu einem sehr sensitiven Werkzeug kombinieren, das sich für sensitive Hochdurchsatzanalysen eignet (Wang et al., 2002; Vora et al., 2004).

Im Trinkwasser wird zum Beispiel eine Vielzahl von verschiedenen humanpathogenen Bakterien und Viren als mikrobiologische Verunreinigungen betrachtet. Insgesamt sollte Trinkwasser deshalb regelmäßig auf diese untersucht werden (Ashbolt, 2004b; Environmental Protection Agency (Hrsg.), 2009). Mit Hilfe von Mikroarrays kann diese Kontrolle durchgeführt werden (Lee et al., 2008; Seidel and Niessner, 2008). Die wichtigsten Keime sind dabei *E. coli* O157:H7, *C. jejuni*, *S. Typhimurium* und *L. pneumophila*, weshalb diese als Studienobjekte in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden. Für die Kultivierung lebender Organismen wurde auf nicht pathogene *E. coli* und *R. planticola* zurückgegriffen, da sich bei einfacherer Kultivierung auch mit ihnen die Nachweisprinzipien entwickeln lassen. Als Nachweisprinzip wurde in dieser Arbeit ein Chemilumineszenz-DNA-Mikroarray erarbeitet. Da die DNA-Sequenzen der betreffenden Bakterien bekannt sind, ist es relativ einfach, die passenden DNA-Zielsonden mit Hilfe bioinformatischer Techniken

zu entwickeln (Loy and Bodrossy, 2006). Diese Art Mikroarrays ist im Gegensatz zu Fluoreszenz-DNA-Mikroarrays in Bakterienanalysen noch nicht weit verbreitet, obwohl die Chemilumineszenz ein sehr sensibles Reportersystem darstellt (Cannon et al., 2010; Schulze et al., 2009). Unabhängig vom Reportersystem basieren die meisten DNA-Mikroarrays nicht auf automatisierten Durchflusssystemen. Diese passiven DNA-Mikroarrays benötigen sehr lange Inkubationszeiten aufgrund der langsamen Diffusion der Ziel-DNA-Moleküle (Mocanu et al., 2008). Da die Assays dieser Mikroarrays viele manuelle Schritte benötigen, sind sie für einfache Routineanalysen nicht sonderlich geeignet. In dieser Arbeit wurde ein Durchfluss-DNA-Mikroarray-Assay entwickelt, der sich durch hohe Sensitivität, niedrige Nachweisgrenzen, einen hohen Automatisierungsgrad und eine sehr kurze Assayzeit auszeichnet. Außerdem lässt er sich direkt in Zellen pro Milliliter kalibrieren.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein automatisiertes Nachweissystem für mikrobielle Verunreinigungen im Trinkwasser zu entwickeln. Als technische Basis dienten dabei die Stopped-PCR als DNA-Amplifikationsmethode und ein sich anschließender Nachweis auf einem DNA-Mikroarray. Zunächst mussten die nachzuweisenden Bakterien aufgeschlossen und ihre DNA zugänglich gemacht werden, daran schlossen sich die Amplifikation und Modifikation der DNA an. Der letzte Schritt war der Nachweis über eine Chemilumineszenzreaktion auf einem DNA-Mikroarray (Abb. 2).

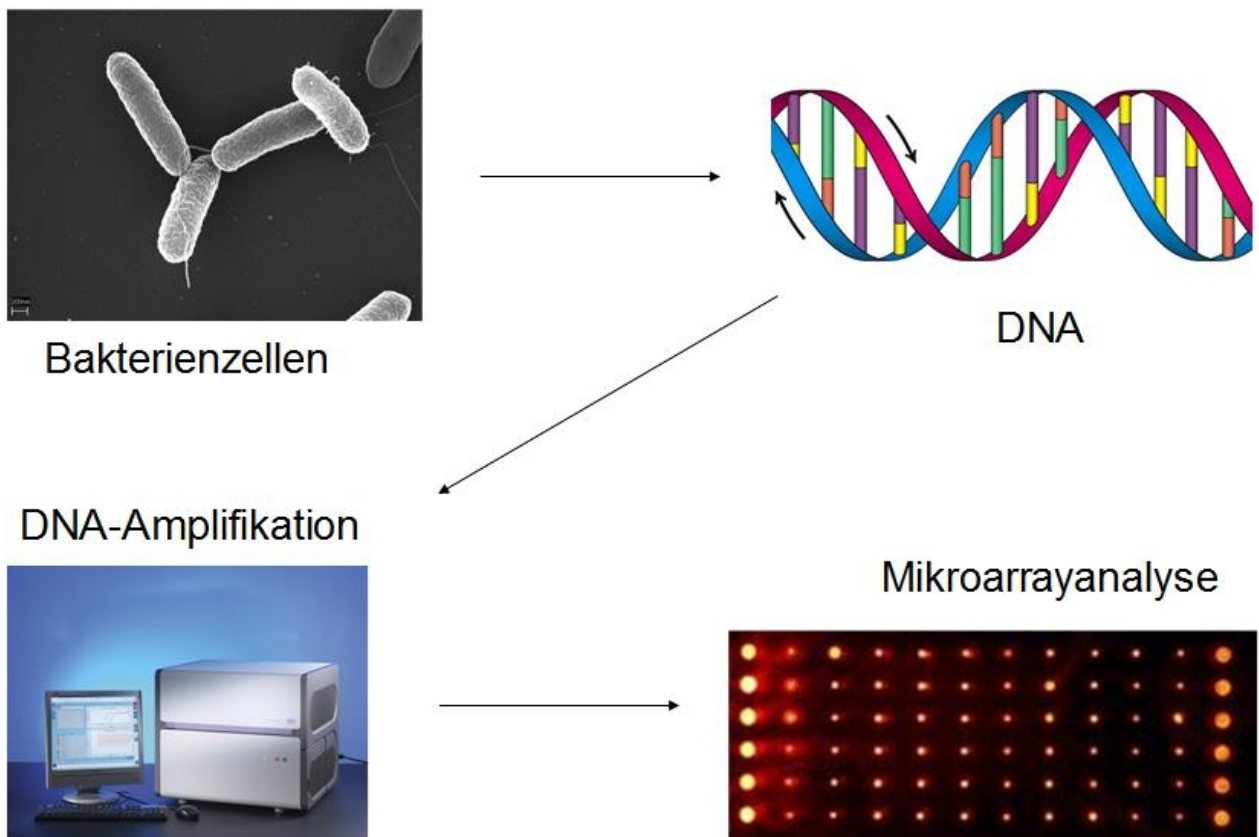


Abb. 2: Zielsetzung und Überblick zu dieser Arbeit (Berg et al., 2002; Brinkmann, 2005; Roche Diagnostics (Hrsg.), 2013a).

2. Theoretische Grundlagen

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit dem theoretischen Unterbau für die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Experimente. Es werden hier die Prinzipien und Hintergründe erläutert, die für ein Verständnis der Ergebnisse notwendig sind. Die verwendeten Methoden werden zusätzlich in den aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik eingeordnet, sowie mit alternativen Methoden verglichen.

2.1 Mikroorganismen im Trinkwasser

Industrieländer haben üblicherweise ein entwickeltes, modernes Trinkwassersystem mit eventuellen Ausnahmen in ländlichen Bereichen und entlegenen Dörfern. Generell besteht die Herausforderung darin, ein solches System auch in extremen Situationen effektiv zu steuern und die Versorgungssicherheit mit einem vernünftigen Aufwand zu garantieren. Extreme Ereignisse wie Schäden im System oder Unwetter können dazu führen, dass Trinkwasser verunreinigt wird. Vor allem Verunreinigungen durch pathogene Mikroorganismen müssen hier schnellstmöglich erkannt werden, um die Bevölkerung warnen und schützen zu können. Im Folgenden werden einige Mikroorganismen untersucht, die als potentielle Verunreinigungen im Trinkwasser auftreten können. Ziel ist es, ihr Bedrohungspotential genauer zu verstehen und einen schnellen Nachweis für diese Organismen zu entwickeln (Ashbolt, 2004a, 2004b; Environmental Protection Agency (Hrsg.), 2009).

Tabelle 1 zeigt einen Überblick der relevanten Organismen im Trinkwasser. Aus diesem Überblick wurden Modellorganismen ausgewählt und für die weiteren Versuche verwendet.

Tabelle 1: Mikroorganismen als Kontaminanten im Trinkwasser – Überblick aus der deutschen und amerikanischen Trinkwasserverordnung (Bundesministerium für Gesundheit, 2012; Environmental Protection Agency (Hrsg.), 2009).

Mikroorganismus	Quelle	Grenzwert
<i>Escherichia coli</i>	TrinkwV 2001	0 / 100 mL
<i>Enterokokken</i>	TrinkwV 2001	0 / 100 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TrinkwV 2001	Analyseverfahren spezifiziert
<i>Clostridium perfringens</i>	TrinkwV 2001	Analyseverfahren spezifiziert
<i>Legionella spec.</i>	TrinkwV 2001	100 / 100 mL (Warmwasseranlagen)
Coliforme Bakterien	TrinkwV 2001	Analyseverfahren spezifiziert
Total Coliforms	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	> 95 % aller Proben müssen negativ sein
Adenovirus	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
Calicivirus	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
<i>Campylobacter jejuni</i>	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
Enterovirus	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
<i>Escherichia coli</i> (0157)	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
<i>Helicobacter pylori</i>	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
Hepatitis A Virus	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
<i>Mycobacterium avium</i>	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
<i>Naegleria fowleri</i>	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
<i>Salmonella enterica</i>	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze
<i>Shigella sonnei</i>	US EPA Water Contaminant Candidate List 3	Keine rechtliche Grenze

2.2 Untersuchte Bakterien

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die verwendeten Bakterien und erläutert, warum diese für eine Untersuchung des Trinkwassers von Bedeutung sind.

2.2.1 Coliforme Keime

Als Ausgangspunkt dieser Untersuchungen wurden etablierte Nachweismethoden und etablierte Indikatorkeime für die Verunreinigung von Trinkwasser gewählt. Zum Beispiel werden coliforme Keime als Indikatorkeime betrachtet. Diese Gruppe enthält hauptsächlich die Gattungen *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* und *Klebsiella* (Bej et al., 1990). Sie wachsen u.a. im Verdauungstrakt sowohl von Tieren als auch von Menschen und dienen so als direkte Indikation für eine Verunreinigung des Wassers mit menschlichen oder tierischen Ausscheidungen. Zu den Coliformen zählen auch Gattungen wie die Bodenkeime *Citrobacter*. Findet man sie im Trinkwasser, gibt es einen möglichen Eintrag aus Agrarflächen. Werden diese Flächen gedüngt, kann es zu einem Eintrag von Fäkalkeimen kommen. Ein Coliformennachweis dient in diesem Fall als indirekte Indikation einer potentiellen Gefährdung (McKinney and Meyer, 2004).

Alle coliformen Bakterien besitzen das Enzym β -Galactosidase (Gen: *lacZ*). Dieses Enzym wurde in einem Farbttest dazu verwendet, die Anwesenheit von coliformen Bakterien in einer Probe über ein Kulturverfahren nachzuweisen. ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid) wird durch die β -Galactosidase enzymatisch gespalten, wodurch das gelbe Farbstoffmolekül o-Nitrophenol entstand (Abb. 3) (Warren et al., 1978).

Das Nachweisverfahren ist in der Routineanalytik etabliert, benötigt aber etwa 18 Stunden Inkubationszeit (Bundesumweltamt, 2004). Ein schnellerer Nachweis ist wünschenswert. Für einen Schnelltest wurde gezeigt, dass die Freisetzung von o-Nitrophenol aus o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid über eine Bor-Diamant-Elektrode detektiert werden konnte. In weniger als 1,5 Stunden konnten Keime mit

einer Nachweisgrenze von 4×10^4 Zellen/mL nachgewiesen werden (Majid et al., 2008). Die Zeitersparnis geht allerdings mit einer deutlich erniedrigten Sensitivität einher.

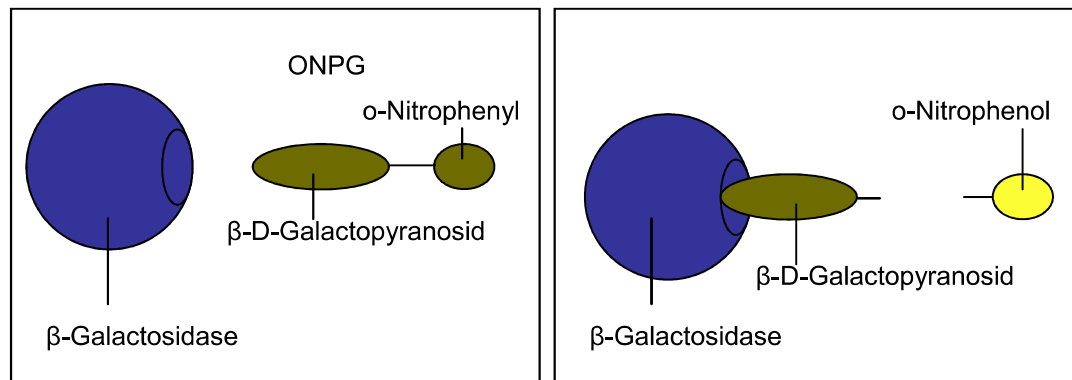


Abb. 3: Schema des Nachweises von β-Galactosidase mit ONPG (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).

Neben dem direkten Nachweis der Enzymaktivität konnte mit PCR-Analysen die Gensequenz nachgewiesen werden. Bej et al. haben für den Nachweis von Coliformen auf das Gen *lacZ* zurückgegriffen. Die Anreicherung erfolgte dabei über einen Zentrifugationsschritt (Bej et al., 1990). Das Gen *lacZ* ließ sich auch für Bakterien in Milchprodukten als Nachweis verwenden. In einem *SYBR Green I*-Assay konnte eine Nachweisgrenze von einer Zelle/mL erreicht werden. Die Anreicherung erfolgte durch eine gezielte Zellkultur vor der DNA-Amplifikation. Durch die Anreicherung mit einer Zellkultur benötigte der Assay allerdings bis zu 12 Stunden (Martín et al., 2010). Der Nachweis der lebenden Gesamtcoliformen konnte mit einer Nachweisgrenze von einer CFU/2,22 mL gezeigt werden. Die Gesamtassayzeit lag inklusive Ausschluss der toten Zellen bei 7,5 Stunden. Nicht berücksichtigt war in dieser Angabe die 18-stündige Zellkultivierung vor dem Nachweisassay. Es wurde eine konservierte Gensequenz zwischen dem 16S und 23S *rRNA*-Gen verwendet (Soejima et al., 2012).

Neben den Nachweisen über die Enzymaktivität oder die Gensequenzen der Enzyme lassen sich coliforme Bakterien noch über weitere Assays nachweisen. Zu

2. Theoretische Grundlagen

den traditionellen Methoden zählen die Fermentationsanalyse in mehreren Röhren, sowie die Membranfiltermethoden. In der Fermentationsanalyse wird die Fähigkeit der Coliformen zur Gas- und Säurebildung aus Laktose bei 35 °C verwendet. Die Membranfiltermethoden verwenden unterschiedliche Nährmedien und Enzymsubstrate zur Einfärbung der Kolonien. Diese beiden Methodengruppen haben Limitierungen in Bezug auf eine lange Dauer der Analyse, sind anfällig für eine Störung der Analyse durch andere Bakterien und können keine langsam wachsenden oder nicht kultivierbaren Bakterien detektieren. Da bei einem ersten positiven Ergebnis eine Validierung stattfinden muss, sind die Ergebnisse erst nach zwei Tagen zu erhalten. Hinzu kommt, dass bei vielen Verdünnungsschritten der Arbeitsaufwand erheblich ansteigt. Die Nachweisgrenze hängt von der Größe der verwendeten Probe ab. Beispielsweise ist es problematisch einen Milliliter Probelösung auf eine Agarplatte aufzutragen. Deshalb kann bei größeren Probenvolumina die Membranfiltermethode verwendet werden. Es konnte aber bei Kultivierungsmethoden eine einzige, lebende und kultivierbare Zelle pro 100 mL nachgewiesen werden (Bundesumweltamt, 2004; Eckner, 1998; Pagel et al., 1982; Rompré et al., 2002). Eine eigentliche Nachweisgrenze gibt es für Kulturnachweise nicht. Eine einzige, lebende und kultivierbare Zelle kann in einem beliebigen Volumen nachgewiesen werden. Das Volumen muss mit Nährmedium versetzt werden und auf MPN-Platten verteilt werden. Begrenzt ist dieses Vorgehen nur durch die Frage nach der Verhältnismäßigkeit des Aufwandes.

Zusätzlich zur PCR sind zwei weitere Methodenkategorien zu nennen: immunologische Methoden und Hybridisierungsmethoden (*fluorescence in-situ hybridisation*, FISH). Für die immunologischen Methoden wurden mehrere Antikörper gegen coliforme Bakterien entwickelt, da aber sehr viele unterschiedliche Bakterienarten gleichzeitig detektiert werden sollten, hatten die entwickelten Antikörper keine ausreichende Spezifität und unterlagen starken Kreuzreaktivitäten. Das verwendete Antigen (enterobacterial common antigen, ECA) war nicht nur auf Coliformen, sondern auch auf weiteren Bakterien zu finden (*Pseudomonas*,

Aeromonas, *Bacillus*). Die Nachweisgrenze lag bei 10^3 und 10^7 Zellen/mL (Hübner et al., 1992; Rompré et al., 2002).

Tabelle 2: Übersicht der Methoden zum Nachweis von coliformen Bakterien.

Methode	LOD	Assayzeit	Literatur
β-Galactosidase Enzymassay	1 Zelle/100 mL	18 h	(Warren et al., 1978)
β-Galactosidase Enzymassay	4×10^4 Zellen/mL	< 1,5 h	(Majid et al., 2008)
PCR (<i>lacZ</i>)	1 Zelle/mL	12 h	(Martín et al., 2010)
PCR (<i>ITS 16S-23S</i> <i>rRNA</i>)	1 CFU/2,22 mL	18 h	(Soejima et al., 2012)
Fermentations- analyse	1 Zelle	48 - 96 h	(Eckner, 1998; Pagel et al., 1982; Rompré et al., 2002)
Membranfiltrations- analyse	1 Zelle	24 - 48 h	
Immuno-Färbung ECA	10^3 und 10^7 Zellen/mL	24 h	(Hübner et al., 1992; Rompré et al., 2002)
FISH	1 Zelle/mL	6 - 8 h	(Hügler et al., 2011; Ootsubo et al., 2003; Rompré et al., 2002)

Bei einem FISH-Assay hybridisiert eine einzelsträngige DNA-Sonde in einer Bakterienzelle mit der komplementären Sequenz. Dieses Hybridisierungsereignis

kann über Fluoreszenz ausgelesen werden. Es können sowohl 16S *rRNA*-Sequenzen verwendet werden, als auch andere Gene detektiert werden. Der Vorteil einer Verwendung der ribosomalen RNA als Sondenziel ist, dass sie mit 10^3 bis 10^5 Kopien/Zelle deutlich häufiger in der Zelle vorkommt als andere Zielsequenzen. Die Anzahl der ribosomalen RNA-Moleküle hängt stark davon ab, in welcher Wachstumsphase sich die Zellen befinden. Bei Mikroorganismen im Trinkwasser handelt es sich meist um ausgehungerte Organismen, die deshalb sehr geringe Ribosomenzahlen aufweisen. Trotz dieser Tatsache lag die Nachweisgrenze bei einer Zelle/mL auf einem Membranfilter (Hügler et al., 2011; Ootsubo et al., 2003; Rompré et al., 2002).

2.2.2 *Raoultella planticola*

Die Gattung *Raoultella* wurde erst 2001 etabliert, basierend auf einer Analyse der 16S *rRNA* und *rpoB*-Gene. Bis dahin wurde der Organismus der Gattung *Klebsiella*, als Teil der Familie *Enterobacteriaceae* zugeordnet. *Klebsiella* zählt zu den coliformen Keimen und ist deshalb für die Trinkwasseruntersuchung relevant (Bej et al., 1990). 1981 wurden die Bakterien zunächst als *Klebsiella planticola* beschrieben und 1983 in *Klebsiella trevisanii* umbenannt. 1986 wurde wieder vorgeschlagen, den Namen *K. planticola* für die von Bagley und Ferragut beschriebenen Spezies zu verwenden (Bagley et al., 1981; Ferragut et al., 1983). Bei der Spezies *Raoultella* handelt es sich um gramnegative, nicht bewegliche Stäbchen, die hauptsächlich als typische Umweltbakterien eingestuft wurden. Es sind sehr wenige Infektionen mit dieser Art direkt beim Menschen bekannt. Es tritt aber als Histaminproduzent in Fischen auf und löst deshalb Fischvergiftungen aus, die aber meist mild verlaufen. Aufgrund der geringen Infektiosität wird dieses Bakterium auch als Modellorganismus eingesetzt (Kanki et al., 2002; O'Connell et al., 2010).

Neben den Nachweisen für coliforme Keime gibt es eine weitere Möglichkeit, diese Bakterien nachzuweisen. *R. planticola* gehört, wie bereits erwähnt, zu den Histamin produzierenden Stämmen und kann deshalb auch über diese Besonderheit nachgewiesen werden. Es wird entweder die Menge an Histamin über einen ELISA-

Test festgestellt oder nach dem Gen *hdc* (Histidindecaboxylase) in einer PCR-Analyse gesucht. Der ELISA-Assay hatte eine Nachweisgrenze von 1 µmol/L, der PCR-Assay von 0,8-1,8 CFU/25 µL. Die Assayzeit lag zwischen 1 und 2 Stunden für den ELISA und 18 bis 24 Stunden für die Kulturanreicherung, sowie weitere 1,5 Stunden für die sich anschließende Realtime-PCR (Bjornsdottir-Butler et al., 2011; Kanki et al., 2002).

Tabelle 3: Übersicht der Methoden zum Nachweis von *R. planticola*.

Methoden	LOD	Assayzeit	Literatur
ELISA Histamin	1 µmol/L	1 - 2 h	(Kanki et al., 2002)
PCR (<i>hdc</i>)	0,8-1,8 CFU/25 µL	18 - 24 h + 1,5 h	(Bjornsdottir-Butler et al., 2011)

2.2.3 *Escherichia coli*

Der bekannteste Vertreter der coliformen Keime ist *E. coli*. Dem Auftreten von *E. coli* in einer Trinkwasserprobe wird eine hohe Korrelation mit einer fäkalen Verunreinigung zugeschrieben. Es ist deshalb von oberster Priorität, eine Trinkwasserprobe auf eine Verunreinigung mit *E. coli* überprüfen zu können. (Bundesministerium für Gesundheit, 2012; Environmental Protection Agency (Hrsg.), 2009).

Die Gemeinsamkeit aller *E. coli*-Stämme liegt in dem Besitz des Enzyms β-Glucuronidase (Gen: *uidA*). Es wurde dazu verwendet, das Substrat MUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid) zu spalten (Abb. 4). Das Produkt 4-Methylumbelliferyl konnte unter UV-Licht durch seine Fluoreszenz nachgewiesen werden (Rice et al., 1990).

2. Theoretische Grundlagen

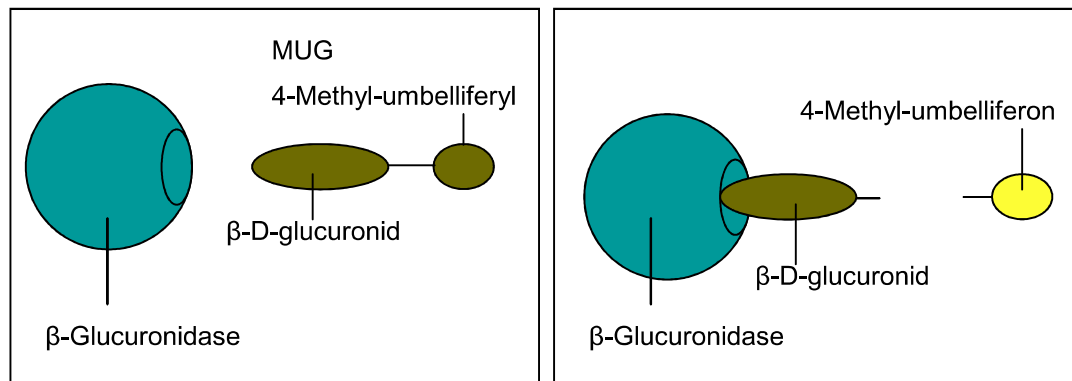


Abb. 4: Schema des Nachweises von β -Glucuronidase mit MUG (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).

Ein weiterer Nachweis für *E. coli* erfolgte über eine PCR und das Gen *lamB*. Es codiert ein Oberflächenprotein von *E. coli*, das sehr spezifisch vom Bakteriophagen Lambda erkannt wird. Dieses Protein findet sich nur auf der Oberfläche von *E. coli*. Die Nachweisgrenze von *E. coli* lag zwischen 1 und 5 Zellen pro 100 mL Wasser. Die Anreicherung erfolgte über einen Zentrifugationsschritt (Bej et al., 1990).

Es ist darüber hinaus wichtig, zwischen den verschiedenen pathogenen *E. coli* zu unterscheiden. Durch horizontalen Gentransfer können die Pathogenitätsfaktoren von einer Art zu einer anderen weitergegeben werden. Die charakteristischen Proteintoxine der in Abb. 5 dargestellten *E. coli* sind auf Plasmiden codiert und können deshalb zwischen den Arten sehr leicht übertragen werden. Ein breites Verständnis der Pathogenitätsfaktoren ist für die Entwicklung diagnostischer Nachweise von fundamentaler Bedeutung (Ahmed et al., 2008; Schmidt and Hensel, 2004). Auch innerhalb der Art *E. coli* O157:H7 gibt es eine Variabilität und einen Austausch genetischer Information. Nicht jeder *E. coli* O157:H7 besitzt die gleichen Pathogenitätsfaktoren. Es gibt *E. coli* O157:H7, die keine *stx*-Gene besitzen, aber trotzdem beim Menschen Durchfall auslösen (Ferens and Hovde, 2011; Friedrich et al., 2007). Umgekehrt gibt es auch *E. coli*, die kein O157-Antigen besitzen, aber Shigatoxine produzieren (Hegde et al., 2012). Der Besitz von nur einem Pathogenitätsfaktor bedeutet aber nicht sofort, dass das Bakterium für den Menschen pathogen ist. Erst die richtige Kombination aus verschiedenen Faktoren

und Umweltbedingungen ergibt ein pathogenes Bakterium (Gilmore and Ferretti, 2003). Deshalb wird in diesem Abschnitt auf die Stoffwechselbesonderheiten der pathogenen *E. coli* genauer eingegangen.

E. coli sind gramnegative Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Zellen sind gerade, abgerundete Stäbchen mit einer Breite von 0,5 bis 0,8 μm und einer Länge von 1 bis 4 μm , die normalerweise einzeln oder als Pärchen vorliegen. Die Zelle hat eine typische gramnegative Zellwand, bestehend aus einer äußeren Membran, einer Peptidoglykanschicht und einer inneren Membran. Die innere Membran hat diverse Transportsysteme, Energieumwandlungssysteme und Chemosensoren. Die Zellen sind üblicherweise durch ihre Flagellen beweglich. Manche Zellen besitzen eine Kapsel, zum Beispiel aus Teichonsäure. *E. coli* ist das übliche Versuchsmodell für Bakterienuntersuchungen, da bereits viel über *E. coli* bekannt ist und es einfach in der Handhabung ist. *E. coli* sollte allerdings nicht als das typische Bakterium betrachtet werden. Aufgrund der hohen Diversität der Bakterien ist das Konzept eines „typischen“ Bakteriums sowieso bedeutungslos (Singleton and Sainsbury, 2006).

E. coli ist eine der häufigsten Spezies im menschlichen Verdauungstrakt, und als natürlicher Bestandteil der Darmflora übernimmt es wichtige Aufgaben. Es verhindert zum Beispiel die Besiedlung des menschlichen Darms durch schädliche Pathogene. Jedoch gibt es auch verschiedene Gruppen pathogener *E. coli*-Keime. Die Übertragung erfolgt zu meist durch kontaminierte Lebensmittel oder Trinkwasser. (Food and Drug Administration (Hrsg.), 2012).

Es sind bisher sechs beschriebene Kategorien von Durchfall auslösenden *E. coli* (Abb. 5) bekannt: EPEC (enteropathogenic *E. coli*), EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*), ETEC (enterotoxigenic *E. coli*), EAEC (enteroaggregative *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*) und DAEC (diffusely adherent *E. coli*). Jede Kategorie hat unterschiedliche pathogene Mechanismen im Umgang mit eukaryotischen Zellen. Abb. 5 zeigt schematisch die pathogenen Mechanismen dieser *E. coli*.

EPEC lagern sich an Enterozyten im Dünndarm an und zerstören dabei die Mikrovilli. Außerdem bilden sie bei der Anlagerung den für sie typischen Sockel aus.

2. Theoretische Grundlagen

Veränderungen des Zytoskeletts werden von Entzündungsreaktionen und Durchfall begleitet. Im ersten Schritt der Infektion erfolgt die initiale Anlagerung, Schritt zwei ist der Transport der Effektormoleküle in die Wirtszelle mittels eines Typ-III-Sekretionssystems und in Schritt drei bildet sich der Sockel (Kaper et al., 2004).

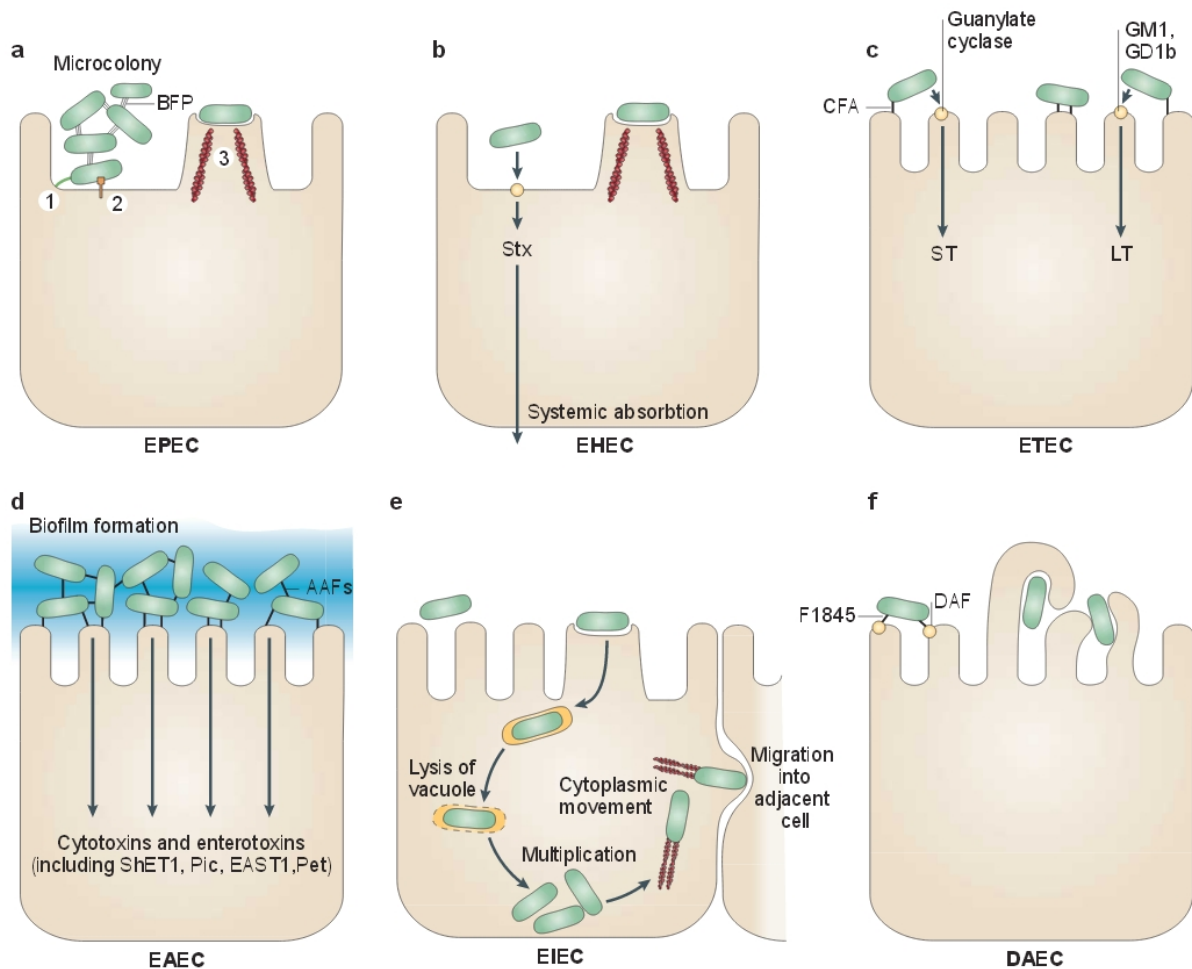


Abb. 5: Pathogene Mechanismen von Durchfall auslösenden *E. coli*. AAF, aggregative adherence fimbriae; BFP, bundle-forming pilus; CFA, colonization factor antigen; DAF, decay-accelerating factor; EAST1, enteroaggregative *E. coli* ST1; LT, heatlabile enterotoxin; ShET1, Shigella enterotoxin 1; ST, heat-stable enterotoxin (Kaper et al., 2004).

Ein Vertreter von EPEC ist beispielsweise *E. coli* O55:H7, das sich auch über das H7-Flagellenantigen (*fliC*) nachweisen lässt, aber keine Shiga-Toxine exprimiert. Die Nachweisgrenze lag in einem tragbaren PCR-Kapillarelektrophorese-Gerät bei 10^5 Zellen/mL. Der Nachweis dauerte 30 Minuten (Lagally et al., 2004). Die H7-

Detektion ließ sich durch einen spezifischeren Assay ergänzen: das *bfp*-Gen (bundle forming pilus) (Gunzburg et al., 1995). In Kombination mit den entsprechenden Anreicherungs- und Extraktionsmethoden kann von einer Nachweisgrenze in der PCR von 1 - 1000 Zellen/100 µL ausgegangen werden.

EHEC bilden ebenfalls diesen Sockel aus, allerdings im Dickdarm. Das Bemerkenswerte an EHEC ist die Sekretion von Shiga-Toxin, das bei einer systemischen Absorption lebensbedrohlich werden kann (Kaper et al., 2004).

ETEC lagern sich ebenfalls an Enterozyten im Dünndarm an. Sie lösen durch die Sekretion von heat-labile (LT) und/oder heat-stable (ST) Enterotoxinen wässrige Durchfälle aus. ETEC lassen sich über das *lt1*-Gen identifizieren und quantifizieren. Die Nachweisgrenze lag zwischen zwei und vier CFU/mL. Dieser Assay konnte in einem verschmutzten Oberflächenwasser zwischen $1,2 \times 10^3$ und $1,4 \times 10^6$ CFU/100 mL innerhalb von zwei Stunden nachweisen (Kaper et al., 2004; Ram et al., 2008).

EAEC bilden sowohl im Dick- als auch im Dünndarm dicke Biofilme auf den Epithelien aus und sekretieren von dort Enterotoxine und Zytotoxine. Vor allem die Toxine ShET1 und EAST1 dienen als Nachweis der Toxizität von EAEC (Harrington et al., 2006; Kaper et al., 2004).

EIEC dringt in die Epithelzellen des Dickdarmes ein, lysiert die Phagosomen und bewegt sich mit Hilfe von Aktinfilamenten durch die Zelle. Die Bakterien bewegen sich seitwärts durch das Epithel direkt von Zelle zu Zelle oder verlassen die Zelle am basolateralen Ende und dringen von dort auch wieder in die nächste Zelle ein. EIEC konnte durch das Gen *ipaH* von anderen *E. coli* differenziert werden. Um EIEC aber auch gegenüber dem sehr ähnlichen *Shigella* abzugrenzen, waren weitere physiologische und biochemische Tests notwendig (Beld and Reubsaet, 2012; Kaper et al., 2004).

DAEC löst eine charakteristische Reaktion der Dünndarmenterozyten aus. Es bilden sich lange, fingerähnliche Strukturen, die sich um die Bakterien wickeln und diese einschließen. Als Nachweis diente neben der Histologie das *afaB*-Gen. Im PCR-

2. Theoretische Grundlagen

Assay wurde damit eine Nachweisgrenze von $3,6 \times 10^2$ CFU/mL erreicht (Hidaka et al., 2009; Kaper et al., 2004).

Tabelle 4: Übersicht der Methoden zum Nachweis von pathogenen *E. coli*.

Methoden	LOD	Assayzeit	Literatur
β -Glucuronidase Enzymassay	1 Zelle/100 mL	18 h	(Rice et al., 1990)
PCR (<i>lamB</i>)	1 - 5 Zellen/100 mL	N/A	(Bej et al., 1990)
PCR (<i>fliC</i>)	10^5 Zellen/mL	30 min	(Lagally et al., 2004)
PCR (<i>bfp</i>)	qualitativ	1 - 2 h	(Gunzburg et al., 1995)
PCR (<i>lt1</i>)	2 - 4 CFU/mL Realprobe: $1,2 \times 10^3$ bis $1,4 \times 10^6$ CFU/100mL	2 h	(Ram et al., 2008)
PCR (<i>ipaH</i>)	qualitativ	N/A	(Beld and Reubsaet, 2012)
PCR (<i>afaB</i>)	$3,6 \times 10^2$ CFU/mL	N/A	(Hidaka et al., 2009)
PCR 58 Gene	qualitativ	48 h	(Masters et al., 2011).

Aus diesen Details lassen sich umfangreiche Tests zur Überprüfung der Wasserqualität entwickeln. Masters et al. verwendeten 58 verschiedene

Virulenzgene. Die verwendeten Kultivierungs- und Filtrationsschritte vor der PCR benötigten aber bis zu zwei Tage (Masters et al., 2011). Anhand der gefundenen Virulenzgene in einer Wasserprobe konnten auch Rückschlüsse auf die Quelle der Verunreinigung gemacht werden (Ahmed et al., 2007).

2.2.4 *Escherichia coli* O157:H7

Die Gruppe der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* beinhaltet verschiedene pathogene *E. coli*-Stämme, die mindestens eines oder gar beide Shiga-Toxine (Stx1, Stx2) sekretieren. EHEC ist dabei kein zellinvasives, intrazelluläres Pathogen. Er ist ein sogenannter hochansteckender A/E Keim (*attaching and effacing pathogen*). Er besiedelt den unteren Dünndarm und den Dickdarm.

EHEC wird zumeist durch verunreinigte Lebensmittel und Wasser übertragen. Die typischen Symptome einer Infektion reichen von einem leichten Durchfall bis zu schweren blutigen Durchfällen (hämorrhagische Colitis). Vor allem bei Kindern kann es sogar zu einem hämolytischen urämischem Syndrom kommen. Auch vaskuläre Schäden werden mit Shiga-Toxinen in Verbindung gebracht. Alle der über 25 Serotypen des EHEC lösen Erkrankungen aus. Der weltweit am häufigsten isolierte Serotyp ist O157:H7. Er kommt häufig in nicht ausreichend erhitztem Fleisch, dabei besonders in Hackfleisch vor, aber auch in Milch und Milchprodukten. Im Wasser wird er sowohl im Trinkwasser als auch in Oberflächengewässern wie Badeseen und Flüssen nachgewiesen. Die minimale Infektionsdosis liegt bei weniger als 100 Zellen. Nutztiere sind wohl das größte Reservoir für Infektionen. EHEC konnte sowohl in Rindern als auch in Schweinen, Geflügel und Schafen nachgewiesen werden (Kaper et al., 2004; Ray and Liu, 2001; Singleton and Sainsbury, 2006).

EHEC-Stämme produzieren mindestens eines der Shiga-Toxine. Stx ist ein 71-kDa-Komplex, der aus einer 32-kDa-Untereinheit (A) und fünf 7,7-kDa-Untereinheiten (B) besteht. Stx erkennt spezifisch das Glykosphingolipid Gb3 (Galaktose- α -(1-4)-Galaktose- β -(1-4)-Glukosylceramid). Gb3 befindet sich auf der Plasmamembran der Zielzellen. Die B-Untereinheit vermittelt die Bindung des Holotoxins an den Oberflächenrezeptor (Gb3). Die Bindung des Stx an Gb3 ist der zentrale Startpunkt

2. Theoretische Grundlagen

für die Toxizität, da hier die Internalisierung des Toxins ausgelöst wird, worauf das Absterben der Zelle erfolgt (Abb. 6).

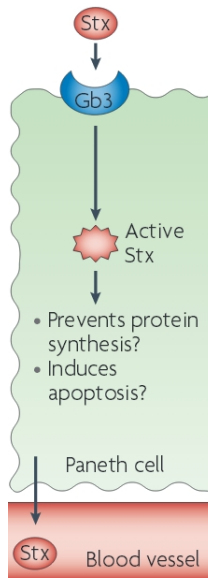


Abb. 6: Aufnahme und Abgabe von Stx an einer Paneth-Zelle (Croxen and Finlay, 2009).

Die Zytotoxizität des Stx ist eine Funktion der 32-kDa-A-Untereinheit, eine RNA-N-Glykosidase, die in der Zelle die Translation unterbindet, in dem sie einen spezifischen Adeninrest an der ribosomalen RNA entfernt (Ray and Liu, 2001).

E. coli O157:H7 ist ein gefährliches humanes Pathogen. Eine Kontrolle des Trinkwassers und ein spezifischer Nachweis sind hier von zentraler Bedeutung (Yoon and Kim, 2012). Ein *E. coli* O157-Antikörper in Kombination mit Goldnanopartikeln ermöglichte einen sehr sensitiven Nachweis von *E. coli* O157:H7 über Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma. Die Nachweisgrenze lag bei 500 CFU/mL, bei einer Assaydauer von 40 Minuten (Li et al., 2010). Die Nachweismethoden mit Oberflächenantigenen haben allerdings Limitationen. Unter Bedingungen der Aushungerung verlieren O157-Stämme ihr O157-Antigen, behalten aber die Fähigkeit zur Produktion von Shiga-Toxinen. Dies führt zu der Frage, ob der Antigennachweis hier eine ausreichende Methode ist. Außerdem hat der Antigenverlust erhebliche Auswirkungen auf Voranreicherungsverfahren, die zum

Beispiel auf einer immunomagnetischen Anreicherung beruhen (Singleton and Sainsbury, 2006).

Alternativ lässt sich *E. coli* O157:H7 recht einfach über seine Pathogenitätsfaktoren nachweisen. Folgende Gene wurden auf einem DNA-Immuno-Mikroarray verwendet: *vt1*, *vt2*, *eae*, und *ehxA*. Die Nachweisgrenzen lagen bei 10^4 bis 10^5 CFU/mL und der Assay dauerte 1,5 Stunden (Noguera et al., 2011).

Eine duplex Realtime-PCR für die Gene *fliCh7* und *rfbE* hatte Nachweisgrenzen von 10^1 und 10^2 CFU/g (Hackfleisch). Mit einer Voranreicherung von vier Stunden bei 37 °C, konnte sogar eine Nachweisgrenze von 1 CFU/g erreicht werden. Der Assay dauerte dann insgesamt acht Stunden. (Gordillo et al., 2014).

Tabelle 5: Übersicht der Methoden zum Nachweis von *E. coli* O157:H7.

Methoden	LOD	Assayzeit	Literatur
Massenspektrometrie	500 CFU/mL	40 min	(Li et al., 2010)
DNA-Immuno-Mikroarray	10^4 bis 10^5 CFU/mL	1,5 h	(Noguera et al., 2011)
PCR (<i>fliCh7</i> , <i>rfbE</i>)	10^1 , 10^2 , 1 CFU/g	4 - 8 h	(Gordillo et al., 2014)

2.2.5 *Legionella pneumophila*

Legionella sind gramnegative, nicht sporenbildende Bakterien. Sie sind stäbchenförmig bis filamentös bei einer Länge von 2,0 bis über 20 µm und einer Breite von 0,3 bis 0,9 µm. Die Zellen sind durch eine oder mehrere Flagellen beweglich, und die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 35 °C und 37 °C.

2. Theoretische Grundlagen

Oberflächengewässer, feuchte Böden, durch Wärme verunreinigte Fließgewässer und Hauswassersysteme gehören zu den natürlichen Habitaten dieser Keime, wobei die meisten der bisher untersuchten, in diesen Habitaten vorkommenden *Legionellen* für den Menschen pathogen sind. *L. pneumophila* lösen nach der Infektion eine Lungenentzündung aus. Der typische Infektionsweg ist das Einatmen *L. pneumophila*-haltiger Bioaerosole aus Duschen, Luftbefeuchtern oder aus Kühltürmen für Klimaanlage. Die Inkubationszeit liegt bei zwei bis zehn Tagen. Die Symptome sind allgemeines Unwohlsein, Muskelschmerzen und Kopfschmerzen. Gefolgt werden diese von Fieber, Schüttelfrost und schließlich einer Lungenentzündung (Legionärskrankheit), die hauptsächlich die Alveolen und die Endbronchien betrifft. Charakteristisch ist dabei ein intraalveolares Sekret. Weitere häufige Symptome sind Brustschmerzen, Bauchschmerzen, Erbrechen, Durchfall und geistige Verwirrung (Singleton and Sainsbury, 2006). Infektionen mit *L. pneumophila* haben eine hohe Mortalität, für Infektionen sind sehr niedrige Zellzahlen ausreichend (eine Zelle kann ausreichend sein) (Cavillon, 2002; Krøjgaard et al., 2011).

Ein wichtiger Teil der Pathogenität ist die Fähigkeit von *L. pneumophila* in alveolare Makrophagen einzudringen, die Fusion von Phagosomen und Lysosomen zu verhindern, sich in diesen Zellen zu vermehren und schließlich die Wirtszelle zu lysieren (Abb. 7) (Isberg et al., 2009; Singleton and Sainsbury, 2006).

Als wichtige Virulenzfaktoren wurden mehrere Proteine der äußeren Bakterienmembran identifiziert, zum Beispiel Mip (*macrophage infectivity potentiator*), welches ein Membran-assoziiertes homodimeres Protein ist, dessen C-terminale Domäne eine PPIase-Aktivität (Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase) besitzt. Dieses Protein ist mit dem menschlichen FK506-Bindeprotein verwandt und bindet an Kollagene des Typs I, II, III, IV, V und VI. Mip ist für eine effiziente Vermehrung innerhalb der Wirtszellen notwendig.

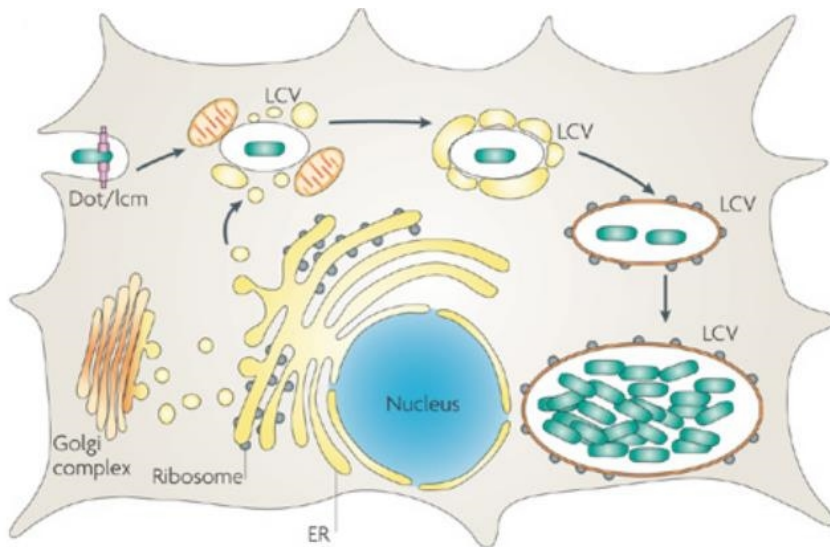


Abb. 7: Ausbildung der *L. pneumophila*-Replikationsvakuole (Isberg et al., 2009). (LCV, *Legionella containing vacuole*)

Das Protein ist aber auch notwendig, um wie in einem *in vitro*-Modell gezeigt, das Lungenepithel zu durchdringen. Das genaue Substrat von Mip wurde noch nicht identifiziert. Ein bemerkenswerter Punkt ist aber, dass Mip dafür verantwortlich ist, eine extrazelluläre Phospholipase-C-Aktivität freizusetzen. Mip könnte das sekretorische Enzym – und eventuell andere Proteine – sofort nach der Sekretion unter Verwendung seiner PPlase-Funktion aktivieren (Shevchuk et al., 2011).

Das *mip*-Gen kann als *house keeping gene* für *Legionella* betrachtet werden. Die Variabilität zwischen den einzelnen Spezies beschränkt sich hauptsächlich auf einen kleinen Bereich, weshalb die Sequenz gut als Nachweis für *Legionella* im Allgemeinen geeignet ist (Ratcliff et al., 1998). Der *mip*-Nachweis wurde auch gegen die Zellkulturmethode aus der französischen AFNOR-Richtlinie (AFNOR T90-431) getestet. Die Nachweisgrenze lag bei 100 genomischen Einheiten pro Liter. Der Assay dauerte vier Stunden. Ein Ersatz der Standardkulturmethode durch PCR ist noch nicht möglich. Allerdings ergänzen sich beide Methoden. Die PCR ist besonders sensitiv und schnell (Morio et al., 2008; Yaradou et al., 2007). Während eines akuten Ausbruchs wird trotzdem auf mehrere Methoden gleichzeitig zurückgegriffen: FISH, Zellkultur und Auszählung nach DAPI-Färbung (Mathieu et al.,

2. Theoretische Grundlagen

2006). Eine weitere Methode zur Untersuchung von *L. pneumophila* ist die Durchflusszytometrie. Antikörper erkennen ihr passendes Antigen entweder auf der Oberfläche der Zielzelle oder innerhalb dieser Zielzelle und binden daran. Der Antikörper ist mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt. Der Marker wird im Durchflusszytometer mittels Laserlicht angeregt und das Signal detektiert. So kann bestimmt werden, ob die jeweilige Zelle das Antigen besitzt oder nicht (Leach et al., 2013). Dieses Prinzip kann wie folgt eingesetzt werden. Werden Warmwassersysteme zur Desinfektion von *L. pneumophila* aufgeheizt, gibt es je nach benutzter Temperatur zu meist drei Gruppen: eine sehr geringe Zahl überlebender und kultivierbarer Bakterien, eine Zahl an lebenden, aber nicht mehr kultivierbaren Bakterien (*viable but nonculturable*, VBNC) und die große Gruppe der toten Bakterien. Die lebenden, aber nicht mehr kultivierbaren Bakterien lassen sich im Kulturassay nicht mehr nachweisen. Gelangen diese Bakterien aber auf lebende Wirtszellen, können sie wieder kultiviert werden. Im Durchflusszytometer kann zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden. Durch die einfache Antigenerkennung können auch die VBNC mit nachgewiesen werden. Der Kulturassay wäre nur in der Lage gewesen, die kleine Gruppe der lebenden und gleichzeitig kultivierbaren Zellen zu detektieren (Allegra et al., 2008). Egli et al. nutzten diese Technik, um eine schnellere Alternative zum Zellkulturassay (ISO 11731) zu entwickeln. Sie verwendeten eine Kombination aus Filtration, immunomagnetischer Separation und Durchflusszytometrie. Sie verwendeten polyklonale Antikörper gegen *L. pneumophila*-Serogruppen 1 - 12. Es wurden Nachweisgrenzen von 15 bis 50 Zellen pro Liter erreicht. Der Assay dauerte 120 Minuten (Füchslin et al., 2010; Keserue et al., 2012).

Im DNA-Nachweis kann neben *mip*, auch das *dotA*-Gen (*defective organelle trafficking*) für den *L. pneumophila*-Nachweis genutzt werden. *dotA* unterstützt das Überleben von *L. pneumophila* im Phagosom. Die Nachweisgrenze für diesen PCR-Assay lag bei 15 genomischen Kopien/50 µL (Yáñez et al., 2007). In einem weiteren *mip*-Assay, in dem auch die 16S rRNA von *L. pneumophila* analysiert wurde, konnte eine Nachweisgrenze von 1 fg DNA/20 µL erreicht werden. Mit Probenahme, DNA-

Aufreinigung und PCR-Assay dauerte der Nachweis fünf Stunden (Wellinghausen et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein negatives PCR-Ergebnis eine gute Korrelation mit einem negativen Kulturassay hat. Stammen die Proben aus Heißwassersystemen, zeigt sich im Allgemeinen eine gute Korrelation zwischen PCR und Kulturassay. Dies trifft aber nicht auf Proben aus Kühltürmen zu. Außerdem sind die PCR-Ergebnisse meistens höher als die Kulturassayergebnisse (Tronel and Hartemann, 2009).

Tabelle 6: Übersicht der Methoden zum Nachweis von *L. pneumophila*.

Methoden	LOD	Assayzeit	Literatur
PCR (<i>mip</i>)	100 genomische Einheiten pro Liter	4 h	(Morio et al., 2008; Yaradou et al., 2007)
PCR (<i>dotA</i>)	15 genomische Kopien/50 µL	N/A	(Yáñez et al., 2007)
PCR (<i>mip</i> , 16S <i>rRNA</i>)	1 fg DNA/20 µL	5 h	(Wellinghausen et al., 2001)
Durchflusszytometrie	N/A	N/A	(Allegra et al., 2008)
Durchflusszytometrie	15 - 50 Zellen/L	2 h	(Füchslin et al., 2010; Keserue et al., 2012)

2.2.6 *Salmonella* Typhimurium

Die Gattung *Salmonella* besteht aus gramnegativen Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Es sind gerade Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,0 µm und einer Länge von 1,0 bis 5,0 µm (Singleton and Sainsbury, 2006).

Die Gattung *Salmonella* wird in zwei Spezies unterteilt, *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica*. Die meisten für den Menschen pathogenen Bakterien der Gattung *Salmonella* gehören zur Spezies *Salmonella enterica*. In dieser Arbeit wurde *Salmonella enterica*, Subspezies *enterica*, Serovar Typhimurium, kurz *Salmonella* Typhimurium, untersucht. Diese hier beschriebene Nomenklatur ist allerdings nicht die Einzige, die in der Literatur verwendet wird. Generell kann nur festgestellt werden, dass in der Literatur für die Benennung von *Salmonella* nicht die Standardnomenklaturprinzipien für Bakterien verwendet wurden. Insgesamt sind inzwischen über 2500 Serotypen bekannt (Stand 2007) (Food and Drug Administration (Hrsg.), 2012; Singleton and Sainsbury, 2006).

Infektionen mit *Salmonella* treten sehr häufig auf. Hierbei ist es wichtig, zwei prinzipiell unterschiedliche Typen zu trennen. Nicht typhoidale Salmonellosis kommt dabei in westlichen Gesellschaften deutlich häufiger vor (ca. 1 Million Fälle pro Jahr in den USA) als das typhoide Fieber (ca. 2.000 Fälle pro Jahr in den USA). Die nicht-typhoidale Salmonellosis wird von Bakterien ausgelöst, die nicht dem Serovar Typhi und Paratyphi A angehören. Im Schnitt haben diese Infektionen eine Mortalität von weniger als 1 %. Dies kann allerdings bei manchen Personengruppen, wie älteren Menschen, etwas höher liegen. Die Inkubationszeit variiert zwischen sechs Stunden und drei Tagen. Für die Detektion in Trinkwasser und Lebensmitteln ist hier besonders bemerkenswert, dass bei manchen Stämmen bereits eine Zelle für die Auslösung einer Infektion ausreicht. Als Symptome treten Durchfall, Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindel auf, die je nach Verlauf 4 bis 7 Tage, die akute Phase 1 bis 2 Tage andauern. Die Konsequenzen sind starke Dehydrierung, Arthritis (2 % der Fälle) sowie eine Sepsis, ausgelöst durch den Übergang aus dem Gastrointestinaltrakt in das Blut. Üblicherweise erfolgt die Infektion über verunreinigte

Lebensmittel oder Trinkwasser. Typhoide Fieber werden durch die Serotypen *S. Typhi* und *S. Paratyphi A* ausgelöst, die ausschließlich im Menschen vorkommen. Die Sterblichkeit liegt bei diesen Infektionen bei bis zu 10 %. Die Inkubationszeit liegt bei ein bis drei Wochen, kann aber auch bis zu zwei Monate dauern. Die infektiöse Dosis liegt bei weniger als 1000 Zellen. Als Symptome zeigen sich Kopfschmerzen, Übelkeit, Durchfälle und starke Fieberanfälle. In manchen Fällen tritt der bekannte Ausschlag auf. Es sind dann Flecken auf der Haut sichtbar. Die Dauer der Erkrankung kann zwei bis vier Wochen sein. Auch hier kann es zu einer Sepsis und somit zu einer Infektion anderer Gewebe im menschlichen Körper kommen. Nach einer gewissen Zeit kann die Infektion asymptomatisch werden, wobei trotzdem weiterhin Erreger ausgeschieden werden. Die betroffenen Patienten werden als sogenannte Dauerausscheider bezeichnet (Food and Drug Administration (Hrsg.), 2012).

Das natürliche Vorkommen von *Salmonella*-Spezies ist sehr unterschiedlich. *S. Typhi* ist sehr wirtsspezifisch und kann nur in Menschen und höheren Primaten eine Infektion auslösen. Bei *S. Typhimurium* zeigt sich ein sehr heterogenes Bild. Manche Typen können eine ganze Reihe verschiedener Wirte befallen, wohingegen andere sehr begrenzt anpassungsfähig sind. Zu den bekannten Wirten zählen zum Beispiel Menschen, Nutztiere, Haustiere, Nagetiere und Wildvögel (Rabsch et al., 2002).

Oral aufgenommene Salmonellen überleben den niedrigen pH-Wert im Magen und gelangen über den Dünndarm schließlich zu den Epithelzellen (Abb. 8). Typhoide Salmonellen bevorzugen M-Zellen, die sie direkt zu den T- und B-Zellen des Immunsystems transportieren. In Makrophagen werden die Salmonellen über das gesamte retikulohistiozytäre System verteilt. Im Gegensatz dazu verursachen nicht-typhoide Salmonellen eine lokale Entzündung. Dies führt zu polymorphkernigen Leukozyten (PMN) im Darmlumen und zu Durchfall (Haraga et al., 2008).

Als fakultativ intrazelluläres Pathogen dringt *Salmonella* nicht nur in nicht-phagozytotische Zellen ein, sondern repliziert sich auch in phagozytotischen Zellen während einer systemischen Infektion. Zwei entscheidende Merkmale der Salmonellenpathogenese, die Invasionsmechanismen und die Replikation innerhalb

2. Theoretische Grundlagen

der Zellen, korrelieren mit den Pathogenitätsinseln der Salmonellen (Salmonella pathogenicity islands, SPIs). Diese Pathogenitätsinseln sind vergleichsweise große chromosomale Strukturen und beinhalten Gene für Virulenzfaktoren. Diese Virulenzfaktoren werden zumeist in virulenten Stämmen gefunden. Die Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1) beinhaltet Gene, die für die Wirtszellinvasion erforderlich sind, wohingegen die Pathogenitätsinsel 2 (SPI-2) Gene enthält, die für das Überleben in der Wirtszelle sowie die Vermehrung innerhalb der Wirtszelle notwendig sind.

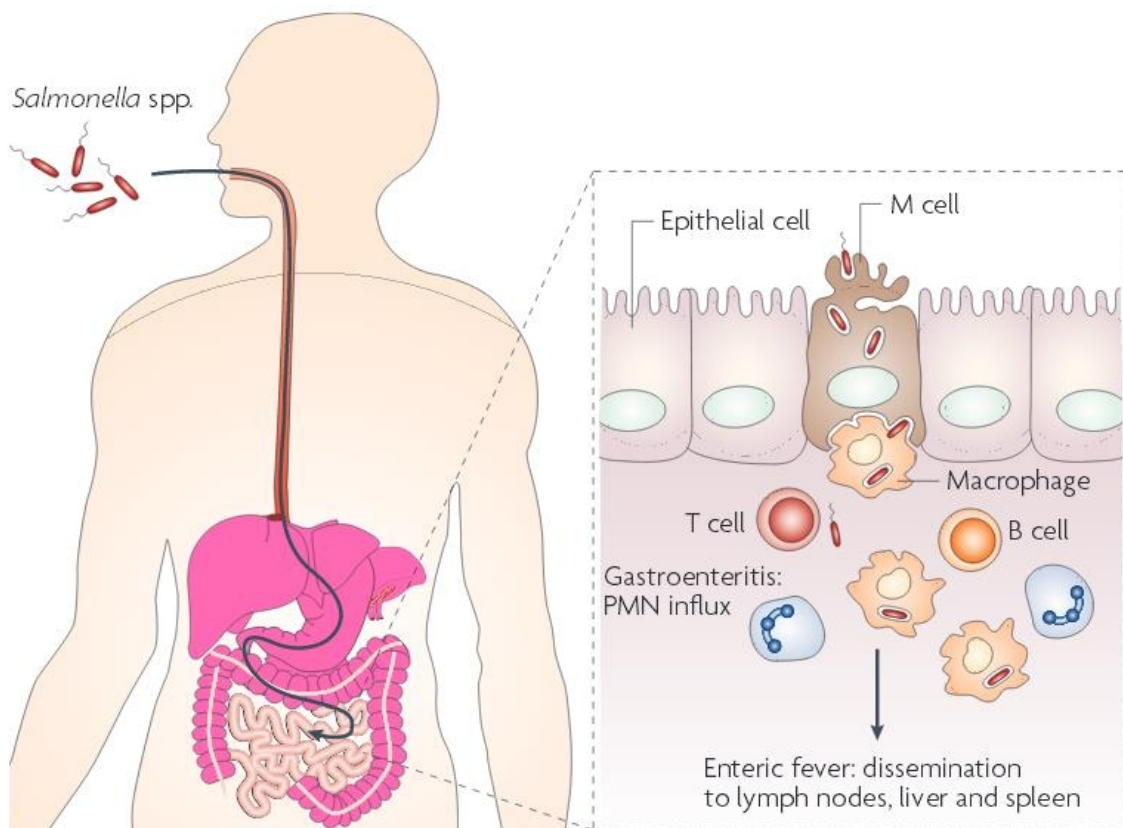


Abb. 8: Weg der Salmonellen bei oraler Aufnahme (Haraga et al., 2008).

Sowohl SPI-1 als auch SPI-2 codieren Typ-III-Sekretionssysteme (T3SS). Hierbei handelt es sich um spezielle Systeme, die in der Lage sind, Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle einzuschleusen. Die T3SS-Systeme sind Injektionsnadelgleiche Strukturen innerhalb der inneren und äußeren Bakterienzellwand, die in der

Lage sind, die Zellmembran der Wirtszellen zu durchdringen. Über die T3SS injiziert *Salmonella* Translokon-Proteine in die Zellmembran der Wirtszelle, was wiederum die Injektion von Effektorproteinen in die Wirtszelle erlaubt. Dadurch kann die Wirtszelle reguliert werden, was die Immunantwort reduziert und somit die Bakterienpathogenität unterstützt. Eine genaue Regulierung der SPI-Gene wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet und ist für die Pathogenität und die Infektion notwendig. Der genaue Ablauf der Regulation ist sehr komplex und bisher nur begrenzt verstanden (Gong et al., 2011).

Die Gene von SPI-1 werden durch ein komplexes Zusammenspiel von HilA, HilC, HilD, HilE und Phop/Q reguliert. HilE spielt eine wichtige regulierende Rolle in Bezug auf *hilA*. HilE interagiert dabei mit HilD und führt zu einer negativen Regulierung von *hilA*. Ist HilE mutiert, sorgt dies für eine Überexpression von HilA. Wird HilE dagegen überexprimiert, sorgt dies für eine Unterdrückung der Expression von HilA und führt somit zu einer Unterdrückung des invasiven Phänotyps. Das *hilA*-Gen codiert einen OmpR/ToxR-ähnlichen transkriptionalen Aktivator, der eine zentrale Rolle in der Regulation der T3SS-Gene und der Gene für Effektorproteine einnimmt. *hilA* wird dabei durch die Umgebungsbedingungen reguliert. Wird *hilA* überexprimiert, bildet sich ein hyperinvasiver Phänotyp. Wird *hilA* dagegen unterdrückt, bildet sich ein nicht invasiver Phänotyp. Hier zeigt sich also die zentrale Rolle für die Regulation des invasiven Phänotyps. Deshalb bietet sich *hilA* als geeignetes Zielgen für eine Pathogenitätsanalyse von Salmonellen an (Baxter et al., 2003; Ellermeier et al., 2005; Gong et al., 2011).

Auch bei *S. Typhimurium* können genetische und immunologische Nachweisverfahren verwendet werden. Neben *hilA* kann das Gen *ttr* für einen *S. Typhimurium*-Nachweis genutzt werden. Zunächst wurde über einen Serovar-spezifischen Aptamerassay das Bakterium angereichert. Im zweiten Schritt wurde eine Realtime-PCR mit einer *Molecular Beacon*-Sonde genutzt, um das *ttr*-Gen zu amplifizieren. Die Nachweisgrenze lag bei 1 CFU/25 μ L (Jyoti et al., 2011). Unter Verwendung des Gens *invA* konnte in einer Realtime-PCR eine Nachweisgrenze von 2 Kopien/50 μ L erreicht werden. Wie bei allen anderen Bakterien kann auch bei

2. Theoretische Grundlagen

S. Typhimurium die 16S rRNA als Analyt verwendet werden. Die Nachweisgrenze lag bei 10^3 Kopien/50 μ L. Die DNA wurde vor der Verwendung im Assay aus Zellkulturen aufgereinigt. (Fey et al., 2004).

Eine Kombination aus immunomagnetischer Separation und Fluoreszenznachweis ermöglichte eine Nachweisgrenze von 10 CFU/mL unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die notwendige Inkubationszeit vor der Mikroskopie lag bei 30 bis 60 Minuten (Wen et al., 2013). In einem Immunoassay aus einer Milchprobe konnten Mantzila et al. eine Nachweisgrenze von 10^2 CFU/mL bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden erreichen. Hat sich im Immunoassay, wie es hier der Fall war, das Bindungsgleichgewicht noch nicht vollständig eingestellt, kann die Sensitivität durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer erhöht werden (zehn Stunden, 10^1 CFU/mL) (Mantzila et al., 2008).

Tabelle 7: Übersicht der Methoden zum Nachweis von *S. Typhimurium*.

Methode	LOD	Assayzeit	Literatur
PCR (<i>ttr</i>)	1 CFU/25 μ L	2 - 3 h	(Jyoti et al., 2011)
PCR (<i>invA</i>)	2 Kopien/50 μ L	2 - 3 h	(Jyoti et al., 2011)
PCR (16S rRNA)	10^3 Kopien/50 μ L	2 - 3 h	(Jyoti et al., 2011)
Fluoreszenz- mikroskopie	10 CFU/mL	<60 min	(Wen et al., 2013)
Immunoassay	10 - 10^2 CFU/mL	2 - 10 h	(Mantzila et al., 2008)

2.2.7 *Campylobacter jejuni*

C. jejuni ist ein gramnegatives Bakterium, das keine Sporen bildet und eine gebogene bis S-förmige Morphologie besitzt. Es ist 0,2 - 0,5 µm dick und ca. 0,5 - 5 µm lang. Viele Stämme sind beweglich, was auf einem oder zwei Flagellen an einem oder an beiden Enden des Bakteriums beruht. *Campylobacter* sind mikroaerophil, d.h. ihre idealen Wachstumsbedingungen weisen eine niedrigere Konzentration als die atmosphärische Sauerstoffkonzentration auf, meist zwischen 3 % und 5 %. Die idealen Wachstumsbedingungen liegen bei einer Temperatur von 42 °C, einer Sauerstoffkonzentration von 5 %, einer Kohlendioxidkonzentration von 10 % und einer Stickstoffkonzentration von 85 %. Diese Bakterien sind relativ fragil und deshalb auch schwer zu kultivieren. Außerdem sind sie sensibel gegenüber starker Trockenheit, Erhitzen, Einfrieren, Desinfektionsmitteln und stark azidischen Bedingungen (Food and Drug Administration (Hrsg.), 2012; Mihaljevic et al., 2007; Singleton and Sainsbury, 2006).

Campylobacteriosis ist die durch eine Infektion mit *Campylobacter* ausgelöste Krankheit. Üblicherweise handelt es sich bei den Symptomen um eine Durchfallerkrankung/Enterocolitis. Bei Neugeborenen kann sich eine Meningitis ausbilden. Infektionsherde sind meist ungekochte Lebensmittel, dabei besonders Hühnerfleisch, nicht pasteurisierte Milch und unbehandeltes/kontaminiertes Trinkwasser (Abb. 9).

Wichtig sind dabei auch Kreuzkontaminationen anderer Lebensmittel und Wasser mit Hühnerfleischprodukten. *Campylobacter*-Zellen sind in den meisten Tieren als Kommensale im Verdauungstrakt zu finden, haben aber auch in Wasser ein natürliches Reservoir. Sie kommen in Hühnern in hoher Zahl im Gastrointestinaltrakt vor. Dort siedeln sie hauptsächlich in der Mukosa und werden über den fäkal oralen Weg zwischen den einzelnen Hühnern einer Schar übertragen. Von hier gelangen *C. jejuni* in Wasserreservoirs und bilden dort gemeinsam mit Protozoen und Frischwasseramöben einen Biofilm. Im menschlichen Körper angelangt, kann *C. jejuni* schließlich die Epithelschicht im Darm überwinden (Lehtola et al., 2006; Young et al., 2007). Die Inkubationszeit beträgt beim Menschen ein bis sieben Tage,

C. jejuni hydrolysiert Hippurat zu Benzoesäure und Glycin. Dieser Stoffwechselfvorgang wurde als Nachweis für *C. jejuni* verwendet. Glycin wurde dabei mit Ninhydrin zu einem violetten Farbstoff umgewandelt. Das Besondere an *hipO* ist, dass das Gen in allen *C. jejuni*-Zellen vorhanden ist und im Gegensatz zum Rest des *C. jejuni*-Genoms hinsichtlich seiner Sequenz sehr stabil ist (Slater and Owen, 1997). Rudi et al. entwickelten für 3 verschiedene Abschnitte des *C. jejuni*-Genoms eine Kombination aus PCR-Nachweis und einem Zell-Anreicherungsassay, der auch gleichzeitig die DNA-Aufreinigung beinhaltet. So konnte eine Nachweisgrenze von 2 - 25 CFU/50 µL erreicht werden. Die Assayzeit lag unter vier Stunden (Rudi et al., 2004).

Ein Nachweis von *C. jejuni* über eine PCR und das *mapA*-Gen erreichte eine Nachweisgrenze von 19 - 25 genomischen Kopien, was ungefähr 3×10^3 CFU/g Fäzes entspricht. Der Assay dauerte mit Probenaufbereitung zwischen drei und fünf Stunden (Inglis and Kalischuk, 2004).

Ein PCR-Assay zum Nachweis von *C. jejuni* aus rohem Hühnerfleisch, verwendete Primer für das Gen *hipO*. Die Nachweisgrenze für den vier Stunden dauernden Assay war 10 CFU/mL (Hong et al., 2007).

Tabelle 8: Übersicht der Methoden zum Nachweis von *C. jejuni*.

Methoden	LOD	Assayzeit	Literatur
PCR	2-25 CFU/50 µL	< 4 h	(Rudi et al., 2004).
PCR (<i>mapA</i>)	3×10^3 CFU/g Fäzes	3 - 5 h	(Inglis and Kalischuk, 2004)
PCR (<i>hipO</i>)	10 CFU/mL	4 h	(Hong et al., 2007)

2.2.8 Vergleichbarkeit der Analysen mit unterschiedlichen PCR-Primern

Die Quantifizierung von Bakterien kann natürlich auch innerhalb ein und desselben Gens mit unterschiedlichen Primersequenzen durchgeführt werden. Vergleicht man die Nachweisgrenzen bei einer Bakterienart und einem bestimmten Gen zwischen verschiedenen Studien, kann allerdings nicht sicher bestimmt werden, dass die Variationen alleine auf den unterschiedlichen Sequenzen der Primer beruhen. Die Variationen zwischen verschiedenen Laboren können sowohl technischen als auch menschlichen Ursprungs sein. Akkreditierte analytische Labore nehmen deshalb regelmäßig an Ringversuchen teil, um die Varianzen zwischen den Laboren möglichst gering zu halten.

Drei verschiedene Primer-Kombinationen wurden für den Nachweis von *Salmonella* spp. (Gen: *invA*) verglichen. Tabelle 9 zeigt Nachweisgrenzen zwischen 35 und 3×10^4 CFU/50 μ L (Csordas et al., 2004).

Tabelle 9: Nachweisgrenzen verschiedener PCR-Primer für das Gen *invA* (Csordas et al., 2004).

Primersequenz	LOD	Literatur
5'-TATCGCCACGTTTCGGGCAA-3' 5'-TCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	3×10^3 CFU/50 μ L	(Wang et al., 1997)
5'-ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT-3' 5'-AGACGACTGGTACTGATCGATAAT-3'	3×10^4 CFU/50 μ L	(Chiu and Ou, 1996)
5'-TTTCAATGGGAACTCTGC-3' 5'-AACGACGACCCTTCTTTT-3'	35 CFU/50 μ L	(Csordas et al., 2004)

Eine vergleichende Studie für *E. coli* (Gen: *uidA*) zeigt Variationen der Nachweisgrenzen zwischen 5 und 10 genomischen Kopien/20 µL. Dabei wurden fünf verschiedene Primer-Kombinationen verglichen (Maheux et al., 2009). Tabelle 10 zeigt einen Überblick der Nachweisgrenzen und der eingesetzten Primersequenzen.

Tabelle 10: Nachweisgrenzen verschiedener PCR-Primer für das Gen *uidA* (Maheux et al., 2009).

Primersequenz	LOD	Literatur
5'-TGTTACGTCCTGTAGAAAGCCC-3' 5'-AAAACCTGCCTGGCACAGCAATT-3'	10 Kopien/20 µL	(Bej et al., 1991)
5'-AAAACGGCAAGAAAAAGCAG-3' 5'-ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG-3'	5 Kopien/20 µL	(Bej et al., 1991)
5'-TATGGAATTTGCCCCGATTTT-3' 5'-TGTTTGCCTCCCTGCTGCGG-3'	5 Kopien/20 µL	(Bej et al., 1991)
5'-ATGGAATTTGCCCCGATTTTGC-3' 5'-ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3'	5 Kopien/20 µL	(Heijnen and Medema, 2006)
5'-TGGTAATTACCGACGAAAACGGC-3' 5'-ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG-3'	10 Kopien/20 µL	(Tantawiwat et al., 2005)

2.3 Anreicherung der Bakterienzellen

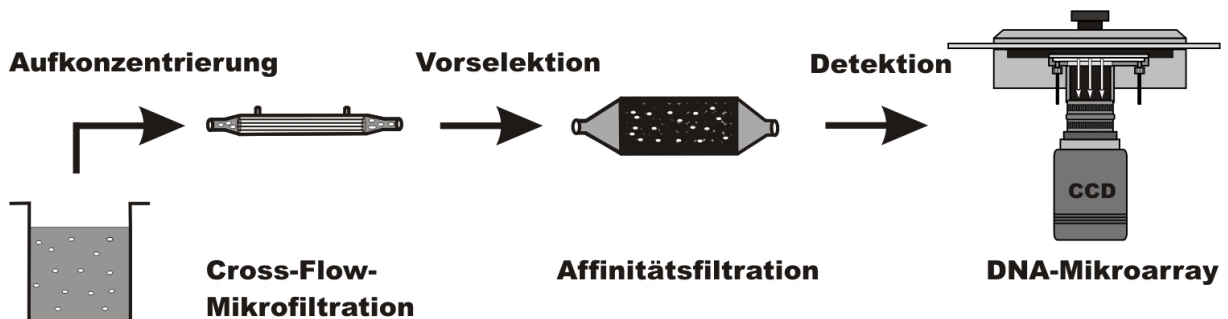


Abb. 10: Beispielhafte Kombination einer Mikrofiltration und einer Affinitätsfiltration als Probenvorbereitung für ein DNA-Mikroarray (Grafiksammlung des Instituts für Wasserchemie).

Eine passende Probenvorbereitung ist die Voraussetzung für einen sensitiven Nachweis von humanpathogenen Bakterien im Trinkwasser, aber auch in anderen Matrices. Die analytischen Methoden müssen dabei mit den Regularien Schritt halten. Dies erfordert die Kombination aus sensitiven Nachweismethoden und entsprechenden Aufkonzentrierungsmethoden (Abb. 10). Für eine Kombination aus Matrices und analytischem Problem muss die entsprechend passende Probenvorbereitung und Nachweismethode gewählt werden.

Der Goldstandard der Bakterianreicherung ist die Zellkultur (Davies et al., 2000; Martín et al., 2010). Hier ist es wichtig auf mögliche Unterschiede bei verschiedenen Wachstumsmedien hinzuweisen (Van Heirstraeten et al., 2009). Sollen mehrere Stämme gleichzeitig aus einer Probe analysiert werden, kann das gewählte Medium bereits eine Vorselektion der Bakterien bewirken. Der eine Stamm wächst eventuell besser unter den gegebenen Bedingungen als ein anderer.

Eine Alternative ist die immunomagnetische Separation. Magnetische Nanopartikel besitzen auf ihrer Oberfläche Antikörper gegen das anzureichernde Bakterium. Nanopartikel und Bakterien binden über die Antigenerkennung, können durch einen Magneten gegenüber der Matrix zurückgehalten und mit einem Spülpuffer gereinigt werden. Durch Entfernung des Magneten lassen sich die Nanopartikel und Bakterien

eluieren oder es kann direkt eine DNA-Extraktion angeschlossen werden. Mit einem Antikörper spezifisch gegen das O157-Antigen von *E. coli* O157:H7 konnte eine Nachweisgrenze von 5×10^2 Zellen/mL in Kombination mit einer PCR ermittelt werden. Der Assay dauerte ca. 4 - 5 Stunden. Eine Anreicherungskultur vor dem Nachweis entfällt (Fu et al., 2005; Pappert et al., 2009). *S. enteritidis* wurden ebenfalls nachgewiesen. Eine Kombination aus Kultivierung und Filtration, immunomagnetischer Separation und PCR-Nachweis erreichte innerhalb von 24 Stunden eine Nachweisgrenze von 1 - 5 Zellen/25g Probe (Jeníková et al., 2010). Für den Nachweis von *Mycobacterium bovis* wurde auf magnetische Nanopartikel eine Kombination aus Antikörper und *M. bovis* spezifischer Peptidliganden aufgebracht. Diese Kombination erreichte eine Nachweisgrenze von 3,16 und 57,7 CFU/ml für einen PCR-Nachweis und einen Kulturnachweis (Stewart et al., 2012).

Magnetische Nanopartikel können aber auch für eine spezifische Bindung zum Beispiel mit einer Aptamer-Oberfläche versehen werden. Das Aptamer-Molekül erkannte und band spezifisch *S. Typhimurium*-Zellen. Die darauffolgende PCR-Detektion hatte eine Nachweisgrenze von einer CFU/25 μ L (Jyoti et al., 2011).

Die Bindungsstärke monoklonaler Antikörper ($K_d = 26 \pm 2$ nM) wird von der Bindungsstärke von Phagen ($K_d = 21 \pm 2$ nM) an ihr Antigen übertroffen. Phagen können aufgrund der hohen Spezifität für Biosensoren oder zur Aufreinigung verwendet werden (Bennett et al., 1997; Mehta et al., 2011; Nanduri et al., 2007; Singh et al., 2013).

Magnetische Nanopartikel können für eine unspezifische Bindung von Bakterien genutzt werden. Dann ist die Oberfläche mit Polyvinylalkoholen überzogen und teilweise silanisiert. Der silanisierte Teil der Oberfläche ermöglichte die Bindung der Bakterien-DNA. Zellseparation und DNA-Aufreinigung konnten direkt aufeinander folgen (Rudi et al., 2004). Weitere Oberflächen für Nanopartikel sind bekannt (Lu et al., 2007).

2. Theoretische Grundlagen

Tabelle 11: Übersicht zur Kombination von Anreicherungsmethoden.

Anreicherungsmethode	Organismus	Literatur
Zellkultur	Coliforme Bakterien	(Martín et al., 2010)
Immunomagnetische Separation	<i>E. coli O157:H7</i>	(Fu et al., 2005)
Aptamere auf magnetischen Nanopartikeln	<i>S. Typhimurium</i>	(Jyoti et al., 2011)
Polyvinylalkoholoberfläche auf magnetischen Nanopartikeln (Bugs 'n Beads) + Teilsilanisierung	<i>C. jejuni</i>	(Rudi et al., 2004)
Filtration	<i>E. coli</i>	(Peskoller et al., 2009a)
Monolithische Affinitätsfiltration	<i>E. coli</i>	(Peskoller et al., 2009b)
Zentrifugation	<i>Coliforme Bakterien</i>	(Bej et al., 1990)
Durchflusszytometrie	<i>S. Typhimurium</i>	(Stevens and Jaykus, 2004)
Ionenaustauscher	<i>Pseudomonas cepacia</i>	(Stevens and Jaykus, 2004)

Filtrationsmethoden sind ebenfalls geeignet Bakterien anzureichern. Die Membranfiltrationsmethode stellt eine Kombination aus Bakterienanreicherung und Bakteriennachweis dar. Es handelt sich dabei um eine *dead-end* Filtration (Eckner, 1998). Die Alternative dazu ist eine *cross-flow* Ultrafiltration. Die gesuchten

Mikroorganismen wurden in einem sich verkleinernden Probenvolumen aufkonzentriert (Pei et al., 2012; Peskoller et al., 2009a). Daran ließ sich direkt eine monolithische Affinitätsfiltration anschließen. Die Säule war mit Polymyxin B beschichtet. Daran banden gramnegative Bakterien. Eine Variation des pH-Wertes ermöglichte eine anschließende Elution der Bakterien (Peskoller et al., 2009b).

Neben diesen Methoden können Bakterien über weitere Filtrationsmethoden, Zentrifugation, Durchflusszytometrie oder Ionenaustauschersäulen aufkonzentriert werden (Brehm-Stecher et al., 2009; Stevens and Jaykus, 2004).

Tabelle 11 zeigt eine Übersicht der in der Literatur bereits beschriebenen Anreicherungsmethoden.

2.4 Zellaufschluß und DNA-Extraktion

2.4.1 Zellyse

Zahlreiche, zumeist mechanische Methoden können dazu genutzt werden biologische Zellen aufzuschließen. Die häufigsten Methoden werden in Tabelle 12 gezeigt (Thermo Scientific (Hrsg.), 2009).

Die in Tabelle 12 genannten Methoden können auch adaptiert werden, um einzelne Zellen zu lysieren. Dies kann für sehr sensitive Analysesysteme von Bedeutung sein. Aufgrund sehr niedriger Bakterienkonzentrationen, sind dort nur sehr wenige Zellen in den Proben nötig (Brown and Audet, 2008).

Zellyse konnte durch einen gepulsten Laserstrahl ausgelöst werden. Dabei wurde ein Laserstrahl (523 nm Wellenlänge) durch eine Linse mit einer hohen numerischen Apertur stark fokussiert, wodurch sich am Auftreffpunkt ein Plasma bildete. Dies verursachte eine Schockwelle und eine Kavitationsblase, die sich innerhalb weniger Mikrosekunden ausdehnte und wieder zusammenzog. Die Zellen lysierten entweder schon während der Expansion der Blase oder bei deren Kollaps. Nutzte man diese

2. Theoretische Grundlagen

Methode bei Zellen auf einer Oberfläche, ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Zellen im Zentrum des Auftreffpunktes wurden vollständig zerstört. Die Zellen etwas außerhalb verblieben auf der Oberfläche, waren aber nekrotisch und die Zellen in einer gewissen Entfernung blieben vital, waren aber porös (Brown and Audet, 2008; Rau et al., 2004, 2006).

Elektrische Felder erzeugen auf biologischen Zellen ein Transmembranpotential. Liegt dieses Potential zwischen 0,2 und 1,5 V kann es zur Ausbildung von Poren in der Lipidmembran führen. Noch stärkere Potentiale führen nach einer gewissen Zeit schließlich zu einer Zellyse. Die notwendige Feldstärke, um eine Zellyse auszulösen, ist abhängig von der Zellgröße, deren Form und der Zusammensetzung der Zellmembran. Bakterienzellen (1 - 2 μm) benötigten eine Feldstärke von 7 - 10 kV/cm für eine Lyse. Bei Pflanzenprotoplasten (20 - 40 μm) dagegen reichten bereits 1,5 - 1,75 kV/cm aus (Brown and Audet, 2008; Lee and Tai, 1999; Lu et al., 2006; Teissie, 1992).

Nur zwei dieser genannten Methoden wurden zum Aufschluss der Bakterien aus Reinstwasser in dieser Arbeit verwendet. Die Zellen wurden entweder ohne vorherige DNA-Aufreinigung in den PCR-Ansatz gegeben. In der ersten Phase der PCR erfolgte ein Aufschluss durch Erhitzen. Die Dauer der Prozedur lag bei 10 bis 20 Minuten und war kein zusätzlicher Aufwand, da auch die DNA in der PCR zunächst durch eine Temperaturerhöhung aufgetrennt wurde (Donhauser et al., 2011).

Der Aufschluss mit Detergentien und Proteinase K-Verdau wird in DNA-Aufreinigungskits verwendet, um Bakterien aus Wasser zu analysieren. Dieser zusätzliche Lyse- und Aufreinigungsschritt war aufwendig und benötigte ca. 3,5 Stunden, wobei alleine 3 Stunden für den Proteinase-Verdau benötigt wurden (Birnboim and Doly, 1979; Donhauser et al., 2009).

Tabelle 12: Methoden zur Lyse von biologischen Zellen.

Lysemethode	Gerät	Beschreibung
Mechanische Mühle	Waring® Blender Polytron® Mixer Mörser und Stößel Kugelmühle	Klingen zerstören die Zellen, Pflanzenmaterial kann z.B. nach dem Einfrieren mit Flüssigstickstoff, zerkleinert werden
Homogenisation	Dounce Homogenizer Potter-Elvehjem Homogenizer French Press	Scherung der Zellen beim Pressen durch sehr kleine Öffnungen
Ultraschall	Ultraschallstab	Zerstörung der Zellmembran durch Hochfrequenzultraschall
Einfrieren / Auftauen	Gefrierschrank Trockeneis	Eiskristalle zerstören die Zellmembran
Erhitzen	Wasserbad PCR-Gerät	Zellen platzen beim Kochen
Detergentien	Triton X-100 SDS/EDTA	Detergentien lösen die Zellmembran auf, Proteinase K-Verdau unterstützt Lyse
Elektroporation	Elektroporationskammer	Transmembranpotential spaltet die Membran auf
Optische Lyse	Laser	Kavitationsblase zerstört die Membran

2.4.2 DNA-Extraktion

Nach der Zellyse muss die DNA aufkonzentriert und die Reste der zerstörten Zelle abgetrennt werden. Zur DNA-Extraktion werden zu meist Standard-Kits verschiedener großer Hersteller wie z.B. Qiagen (QIAcube), Invitrogen (iPrep)

2. Theoretische Grundlagen

verwendet. Einige dieser Kits können mit entsprechenden Extraktionsautomaten kombiniert werden (Stangegaard et al., 2009; Valgren et al., 2008). Der Verzicht auf traditionelle, manuelle Extraktionsmethoden kann die Ausbeute erhöhen und dadurch die Sensitivität des Gesamtassays steigern. Die Herausforderung dabei ist es, miniaturisierte DNA-Extraktionssysteme zu entwickeln, die mobil oder sogar tragbar sind und gleichzeitig eine fluidische Integration mit den Amplifikations- und Nachweissystemen erlauben (Vulto et al., 2010). Unter der Verwendung von Mikrosystemen hat sich die benötigte Zeit zur Extraktion bereits erheblich verringert (Price et al., 2009).

Micro-solid phase extraction ist die Standardmethode, die auf Mikrochips verwendet wird, um die DNA für die Analyse vorzubereiten. Die Nukleinsäuren banden an Silika- oder Glasfasern in stark chaotropen Salz-Lösungen aufgrund der verringerten statischen Abstoßung. Nachdem die DNA mit einem nicht polaren Lösungsmittel gewaschen wurde, konnte sie mit einem niedrig ionischen Puffer eluiert werden (Bavykin et al., 2001; Kim et al., 2009; Wen et al., 2008).

Eine weitere Möglichkeit der DNA-Extraktion beruht auf der Nutzung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen DNA und modifizierten Oberflächen. Die am häufigsten verwendete Oberfläche ist die Aminooberfläche. Unterhalb des neutralen pH-Wertes haben Aminogruppen eine positive Ladung, die sich oberhalb des neutralen pH-Wertes verringert. Die negativ geladene DNA band an die positiv geladenen Aminogruppen. Um die DNA zu eluieren war ein sehr hoher pH-Wert notwendig, der im nächsten Schritt allerdings die DNA-Amplifikation stark beeinflussen kann. Zur Umgehung dieses Problems konnte eine Chitosan-Oberfläche verwendet werden. Chitosan hatte bei pH 5 eine positive Oberfläche und war bereits bei pH 9,86 wieder neutral (Cao et al., 2006; Kim et al., 2009; Nakagawa et al., 2006).

Die Kombination aus Filtration und elektrostatischer Wechselwirkung hat sich auch als eine erfolgreiche Methode zur DNA-Extraktion herausgestellt. Eine Aluminiumoxid-Membran mit Nanoporen wurde erfolgreich zur DNA-Extraktion eingesetzt. Die Filtration erfolgte mit Puffern mit einer hohen Salzkonzentration. Für

die Elution wurden Puffer mit hohem pH-Wert und hoher Salzkonzentration verwendet (Elgort et al., 2004; Kim et al., 2006, 2009).

Mikropartikel mit DNA adsorbierenden Oberflächen wurden ebenfalls zur DNA-Extraktion eingesetzt. Es wurden magnetische Partikel mit einer Silikaoberfläche, funktionalisierten Carboxylgruppen oder Aminogruppen verwendet. Das Besondere an magnetischen Partikeln ist, dass sie sich zunächst frei in der Lösung verteilen können und dann sehr einfach durch ein magnetisches Feld an einer bestimmten Stelle gesammelt werden können (Akutsu et al., 2004; Hawkins et al., 1994; Kessler et al., 2001; Kim et al., 2009; Nakagawa et al., 2006).

2.5 Polymerasekettenreaktion

2.5.1 PCR und DNA-Quantifizierung

Eine zentrale Aufgabe beim molekularbiologischen Nachweis von Mikroorganismen kommt der PCR zu. Diese Methode erlaubt es, gezielt bekannte Sequenzen der Ziel-DNA zu vervielfältigen und damit auch in einer Probe nachzuweisen (Lorenz, 2012). Nur wenn die Sequenzen auch in der Probe enthalten waren, werden sie auch vervielfältigt. Das Prinzip der PCR ist an die DNA-Vervielfältigung in der Zelle angelehnt. Zunächst muss der Doppelstrang aufgetrennt werden. Technisch ist das dadurch gelöst, dass die Temperatur erhöht wird und folglich die Wasserstoffbrückenbindungen „schmelzen“. Im Anschluss wird die Temperatur bis zur Anlagerungstemperatur der Primer gesenkt. Diese kurzen DNA-Stücke dienen zum einen der Polymerase als Startpunkt, zum anderen definieren sie Anfang und Ende der zu amplifizierenden Sequenz. Die Polymerase wandert nun entlang des Einzelstranges und synthetisiert aus den im PCR-Puffer vorhandenen Desoxynukleotidtriphosphaten den Antistrang. Dieser Vorgang wird wiederholt und

endet von alleine, wenn ein kritischer Faktor im Puffer aufgebraucht ist (Espy et al., 2006; Saiki et al., 1985).

Die Quantifizierung der PCR-Produkte kann während der Amplifikation passieren (Realtime-PCR) oder im Anschluss. Die Realtime-PCR nutzt verschiedene Fluoreszenzmethoden. Der einfachste Weg ist die Nutzung eines Fluoreszenzfarbstoffs, der sich nur in doppelsträngige DNA einlagert (*SYBR Green I*). Je mehr doppelsträngige DNA vorhanden ist, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal. Dies ist allerdings ein sequenzunabhängiger Nachweis, es ist also nicht genau klar, ob auch die richtige Sequenz amplifiziert wurde. Eine Verbesserung stellen molekulare Sonden (*molecular beacon, universal probe library*) dar. Diese Fluoreszenzsonden binden sequenzabhängig und zeigen nicht nur die Menge an DNA, sondern auch, ob die Ziel-DNA amplifiziert wurde.

Möglichkeiten zur Quantifizierung der DNA im Anschluss an die PCR bieten UV/VIS-Photometer, Mikroarrays oder Biosensoren (Helm and Wöfl, 2006; Manz et al., 2004).

2.5.2 Identifikation der PCR-Produkte

Die erhaltenen PCR-Produkte können schließlich auf unterschiedlichen Wegen nachgewiesen oder genauer analysiert werden. Die einfachste Variante ist, die PCR-Produkte über ein Agarosegel aufzutrennen. Anhand einer DNA-Leiter und der Größe des Produktes ist ersichtlich, ob das gewünschte Fragment amplifiziert wurde (Adkins and Burmeister, 1996). Für große Fragmente wird die Pulsfeld-Gelelektrophorese genutzt. Das elektrische Feld ist in diesem Fall nicht wie bei der normalen Agarosegelelektrophorese zeitlich homogen, sondern wird periodisch umgepolt. Dadurch erhöht sich die Auflösung im Bereich zwischen 30 und 50 Kilobasenpaaren. Diese Technik wird auch zur Auftrennung ganzer Bakteriengenome genutzt (Burmeister and Ulanovsky, 1992). Anstatt eines Gels kann auch ein Elektrolyt in einer Kapillare für die Elektrophorese von DNA genutzt werden (Camilleri, 1998). Eine weitere Möglichkeit, die PCR-Produkte nach der Amplifikation zu überprüfen, ist die Sequenzierung (Daigle et al., 2011). Auch ein

Nachweis mittels Massenspektrometrie ist möglich (Nolan et al., 2010). Zur Bestimmung der Ziel-DNA nach einem *SYBR Green*-Assay kann eine Schmelzkurve genutzt werden. Durch die Primersequenz ist die exakte Länge der Ziel-DNA bekannt. Der Schmelzpunkt ist abhängig von der Länge der DNA. Stimmen der erwartete Schmelzpunkt und die Länge der Ziel-DNA überein, wurde die richtige Sequenz amplifiziert. Die Analyse kann während der Amplifikation oder im Anschluss daran durchgeführt werden (Ririe et al., 1997).

2.5.3 PCR-Strategien

Die oben beschriebene Standard-PCR kann je nach Anforderung angepasst werden. Um das PCR-Produkt zum Beispiel auf einem Mikroarray nachweisen zu können, sind für das Hybridisierungsereignis Einzelstränge notwendig, die durch eine asymmetrische PCR erzeugt werden. Die Primer werden nicht in einem Verhältnis von 1:1 dem PCR-Mix beigelegt, sondern ein Primer wird in einem deutlichen Überschuss zugegeben. Dadurch wird ein Strang deutlich stärker amplifiziert als sein Gegenstrang (Innis et al., 1988; Lai et al., 2006).

Um eine höhere Spezifität der PCR zu erreichen, kann eine sogenannte „nested PCR“ eingesetzt werden. Dazu werden zwei Primerpaare ineinander verschachtelt. Dadurch ist es sehr unwahrscheinlich, dass durch eine falsche Bindung der Primer an einer anderen Stelle der Original-DNA das falsche Produkt amplifiziert wird (Inglis and Kalischuk, 2004; Yáñez et al., 2007).

Sollen die PCR-Produkte auf einem Mikroarray quantifiziert werden, kann die weiter unten beschriebene Stopped-PCR genutzt werden. In diesem Fall wird die PCR in der logarithmischen Amplifikationsphase abgebrochen, was eine spätere Quantifizierung ermöglicht (Donhauser et al., 2009, 2011).

Neben diesen Methoden gibt es inzwischen unzählige Abwandlungen der PCR, deren Diskussion deutlich über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen würde (Nolan et al., 2010).

2.6 Quantitative PCR

2.6.1 Realtime-PCR mit SYBR Green

Das Besondere an einer Realtime-PCR ist die Möglichkeit, während der PCR direkt zu beobachten, wie sich die Menge amplifizierter DNA erhöht (Abb. 11).

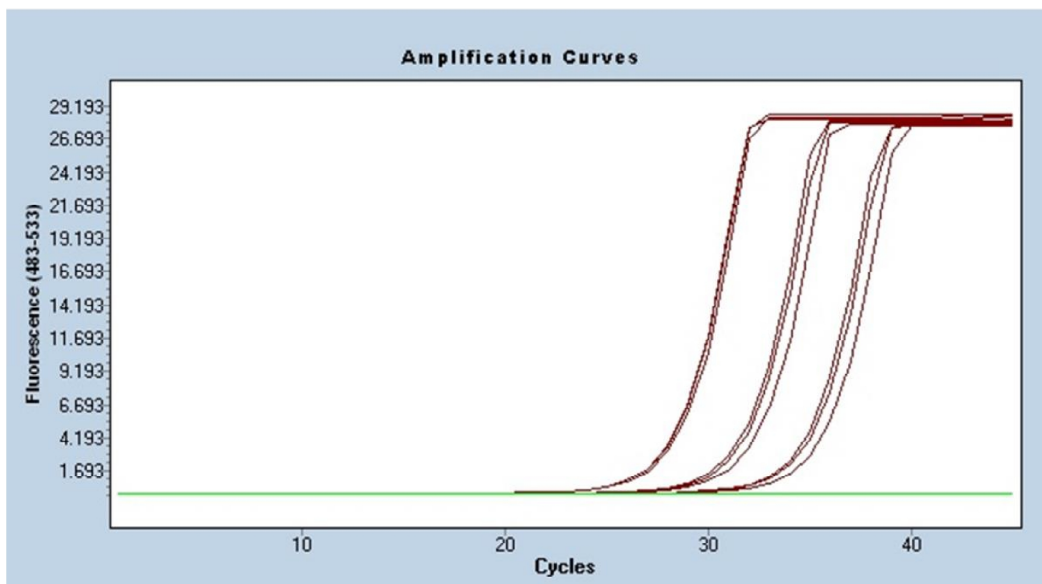


Abb. 11: Realtime-PCR mit *SYBR Green*-Farbstoff für das Gen *uidA*. 10^3 bis 10^1 Kopien sind deutlich als Amplifikationskurven zu erkennen. Die Negativkontrolle bleibt negativ (grüne Basislinie).

Das Prinzip der Amplifikation bleibt hierbei unverändert. Der DNA-Doppelstrang wird aufgeschmolzen, es können sich die Primer anlagern und die Polymerase beginnt die Amplifikation. Dieser Zyklus wird wiederholt. Der große Unterschied zur Standard-PCR liegt in der Verwendung eines Farbstoffs, zum Beispiel *SYBR Green*, für die Echtzeit-Quantifizierung der DNA. Nach jedem Amplifikationszyklus liegt die DNA als Doppelstrang vor. *SYBR Green* lagert sich nun in die Doppelhelix ein. Erst dieser Vorgang ermöglicht eine Anregung des Farbstoffs mit blauem Licht (Wellenlänge = 494 nm). Die Emission erfolgt bei 521 nm (grünes Licht). Die Lichtemission wird detektiert und ist proportional zur Menge der in der PCR

produzierten DNA. Durch das Aufschmelzen am Beginn eines neuen Zyklus wird das *SYBR Green* wieder aus der DNA verdrängt und eine neue Amplifikation kann stattfinden (Schneeberger et al., 1995; Zipper et al., 2004).

2.6.2 Realtime-PCR mit Hydrolysesonde

In diesem Fall erfolgt die Quantifizierung der DNA während der PCR-Amplifikation durch Verwendung einer Hydrolysesonde. Sie besteht aus einem Primer, also einem kurzen einzelsträngigen DNA-Stück, dessen Sequenz so gewählt ist, dass er sich in der Mitte der zu amplifizierenden Sequenz befindet. Da die Polymerase (P) eine Exonukleasefunktion besitzt, ist sie in der Lage, die Hydrolysesonde in einzelne Nukleotide zu spalten, wenn sie sich bereits auf dem Strang angelagert hat. Auf der Hydrolysesonde sind zwei Markierungen angebracht, ein Farbstoff und ein Quencher. Der Quencher sorgt dafür, dass trotz der Anregung des Farbstoffs, kein Signal detektiert werden kann. Werden Quencher und Farbstoff räumlich getrennt, zum Beispiel durch Aufspaltung der Hydrolysesonde, ist es möglich ein Signal zu detektieren. Der Farbstoff wird angeregt und gibt anschließend ein Signal ab (Abb. 12) (Espy et al., 2006). Bei den Hydrolysesonden aus der *Universal Probe Library* handelt es sich um Sonden, aufgebaut aus einer speziellen Art Nukleinsäure, den so genannten *Locked Nucleic Acids* (LNA). Dabei sind das C2- und C4-Atom über eine Sauerstoff-Methylen-Brücke verbunden. Diese Modifikation sorgt für eine stärkere Ausprägung der Wasserstoffbrückenbindungen. Es bildet sich also eine gleichstarke Bindung mit kürzeren Stücken an DNA, was einer gleich hohen Schmelztemperatur entspricht. Dadurch kann die *Universal Probe Library* so gestaltet werden, dass sich die kurzen Sequenzen gleichmäßig über das gesamte Genom verteilen und nicht für jedes Gen einzeln eine entsprechende Sonde synthetisiert werden muss (Reynisson et al., 2006; Roche Diagnostics (Hrsg.), 2013b).

Neben der Hydrolysesonde gibt es inzwischen mehrere Abwandlungen der FRET-Technologie in der Realtime-PCR zum Beispiel *molecular beacons*, *scorpion probes* oder *double-stranded hybridisation probes* (Didenko, 2001).

2. Theoretische Grundlagen

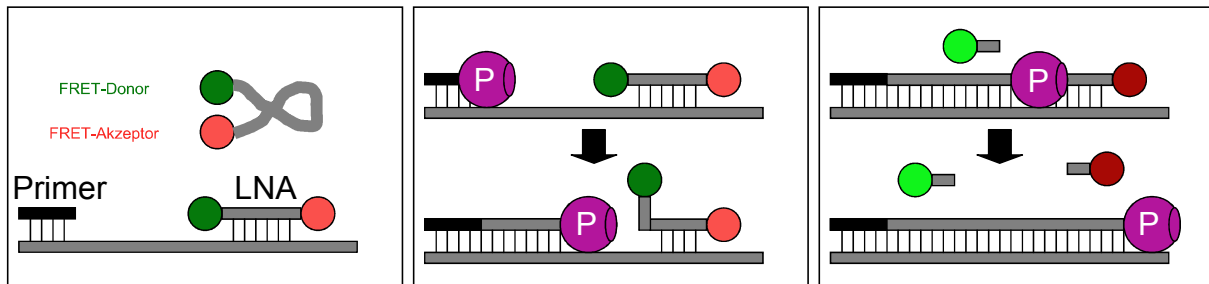


Abb. 12: Schema der Funktionsweise der DNA-Sonden (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).

In jedem PCR-Zyklus bindet nun eine Hydrolysesonde, wie oben beschrieben, an das zu amplifizierende Gen und wird während der Amplifikation hydrolysiert – die Signalstärke nimmt bei jedem Zyklus zu. Allerdings ist die Gesamtzahl der hydrolysierten Moleküle zu Beginn noch recht gering und noch kein Signal sichtbar. Das Signal folgt dem Verlauf einer sigmoidalen Kurve mit einer Lag-Phase am Anfang (Abb. 13). Nach den ersten Amplifikationszyklen erreicht das Signal einen detektierbaren Wert und geht in den exponentiellen Bereich der Kurve über. Diese Stelle wird als C_p -Wert (crossing point) bezeichnet. Die eingesetzte Methode zur Berechnung dieser Stelle wird als „2nd derivative maximum“-Methode bezeichnet. Es wird das Maximum der zweiten Ableitung der sigmoidalen Kurve bestimmt (Pfaffl, 2001, 2004). Dieser Wert wird als Angabe verwendet, um für jede Kurve einen bestimmten Punkt angeben zu können, der dann als relative Referenz gegen andere Kurven verwendet wird. Er gibt an, ob in einer Probe mehr oder weniger DNA einer spezifischen Sequenz vorhanden war. Je mehr Ausgangs-DNA vorhanden war, desto niedriger ist der C_p -Wert und desto früher entsteht während der Amplifikation ein nachweisbares Signal. Am oberen Ende der sigmoidalen Kurve geht die Amplifikationsreaktion ihrem Ende entgegen, verursacht durch das Aufbrauchen der Reagenzien im PCR-Puffer.

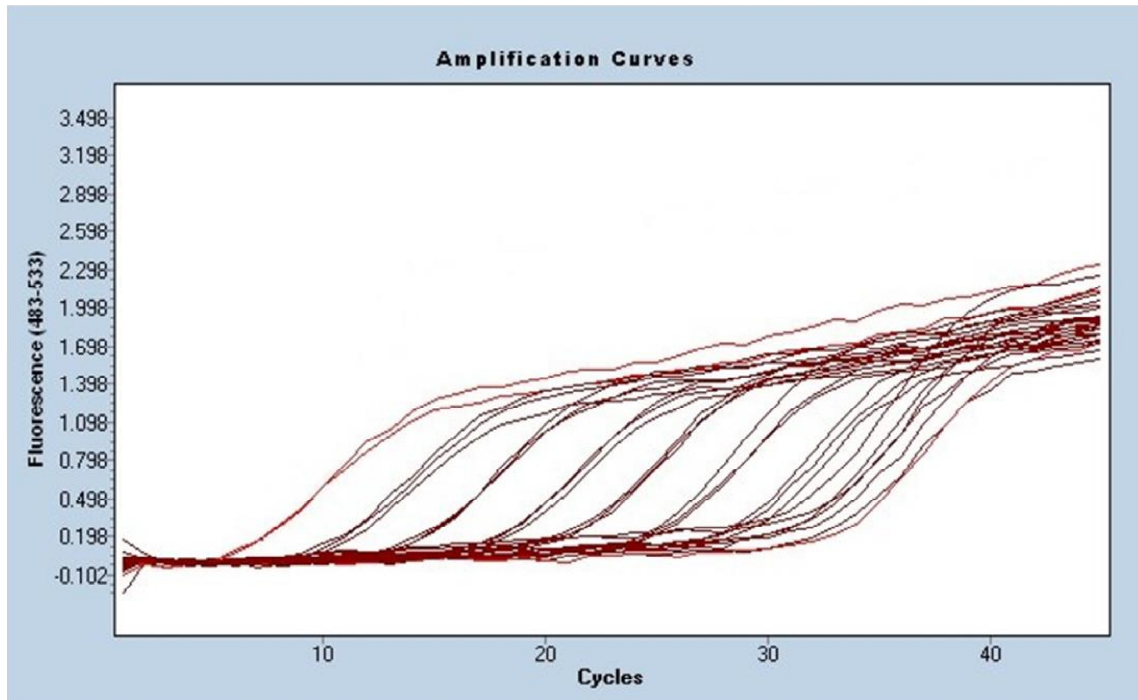


Abb. 13: Realtime-PCR mit einer Hydrolysesonde für das Gen *uidA*. Es wird eine Kopienzahl von 10^9 bis 10^2 , sowie eine Negativkontrolle eingesetzt. Die Negativkontrolle überlappt mit den Proben, die 10^2 Kopien enthalten.

2.6.3 Digitale Tropfen-PCR

Eine Realtime-PCR quantifiziert die Ziel-DNA durch die Messung der Fluoreszenz während der Amplifikation. Um exakt zu quantifizieren, ist eine Standardkurve oder eine Normalisierung mit einem Referenzgen notwendig. Die digitale PCR ermöglicht eine absolute Quantifizierung ohne Standardkurve. Dazu wird jeder 20- μ L-PCR-Ansatz durch den Tropfengenerator unter Verwendung von Tropfengeneratoröl und einem die Emulsion stabilisierenden Tensid in ca. 20.000 Tropfen verwandelt. Es wird eine stabile Wasser-in-Öl-Tropfenemulsion erzeugt, die in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte transferiert wird. Die Platte kann nun mit einer Folie versiegelt werden, das Thermocycling kann beginnen und bis zum Endpunkt durchlaufen. In jedem Tropfen findet eine eigene, abgeschottete PCR-Reaktion statt (Abb. 14A). Nach der Amplifikation werden die Tropfen durch einen Zwei-Farb-Fluoreszenzleser

2. Theoretische Grundlagen

(FAM/VIC) gesaugt und analysiert (Abb. 14B). Die unterschiedliche Fluoreszenz der Tropfen zeigt vier Populationen: entweder ist kein Produkt enthalten (F-/V-), nur ein Produkt ist enthalten (F-/V+, F+,V-), oder beide Produkte sind enthalten (F+,V+). Für eine korrekte Analyse ist ein richtiges Setzen der Fluoreszenzgrenze für positive Tropfen notwendig. Danach lässt sich die Konzentration der Original-DNA errechnen (Abb. 14C) (Pinheiro et al., 2012).

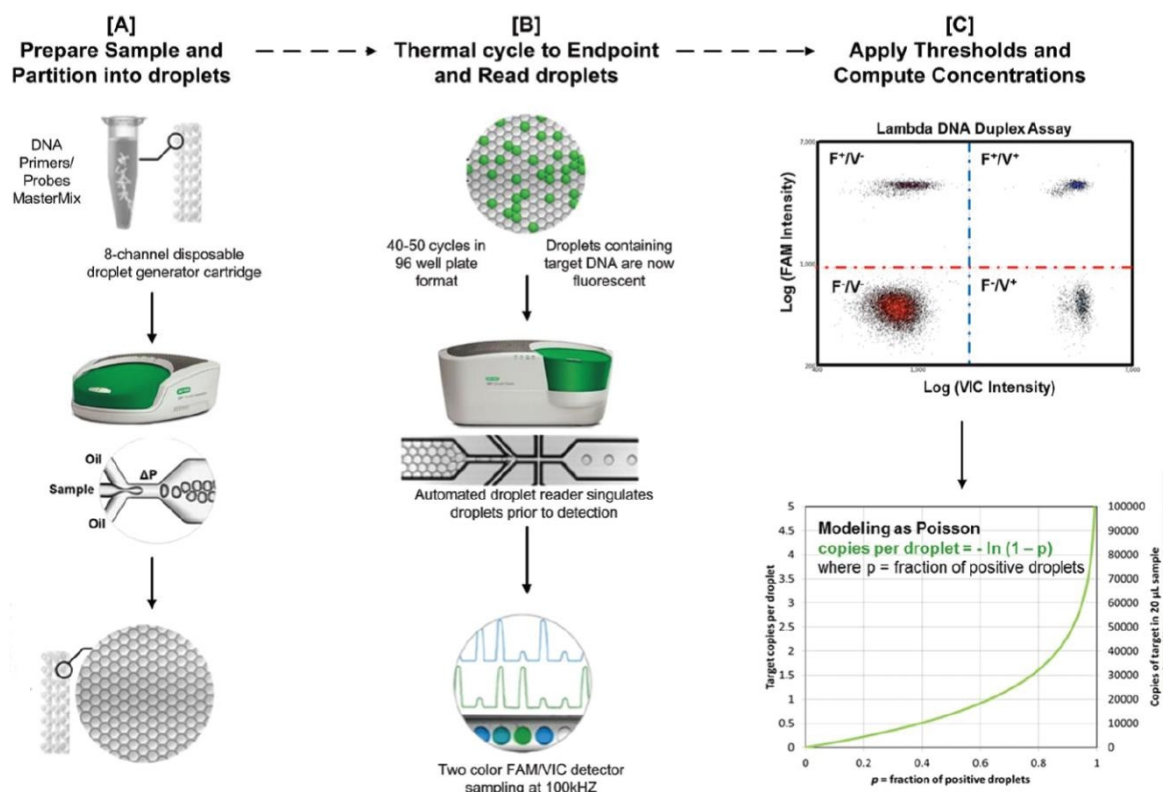


Abb. 14: Ablauf einer digitalen Tropfen-PCR (Pinheiro et al., 2012).

2.6.4 Einbindung der quantitativen PCR in eine automatisierte fluidische Umgebung

Der Vorteil einer konventionellen PCR gegenüber der quantitativen PCR ist der deutlich geringere apparatische Aufwand. Eine konventionelle PCR lässt sich deshalb leichter miniaturisieren. Der Nachteil liegt aber im sich anschließenden DNA-Nachweis. Dazu muss die PCR-Reaktion zum Beispiel auf ein Gel oder einen

Mikroarray übertragen werden. Dies ist mit zusätzlichem Aufwand für die Automatisierung und Quantifizierung verbunden. Bei einer quantitativen PCR findet die Detektion während der PCR-Reaktion statt, deshalb ist eine Miniaturisierung anspruchsvoller (Applied Biosystems (Hrsg.), 2008; Food and Drug Administration (Hrsg.), 2012).

2.7 Isothermale Amplifikation

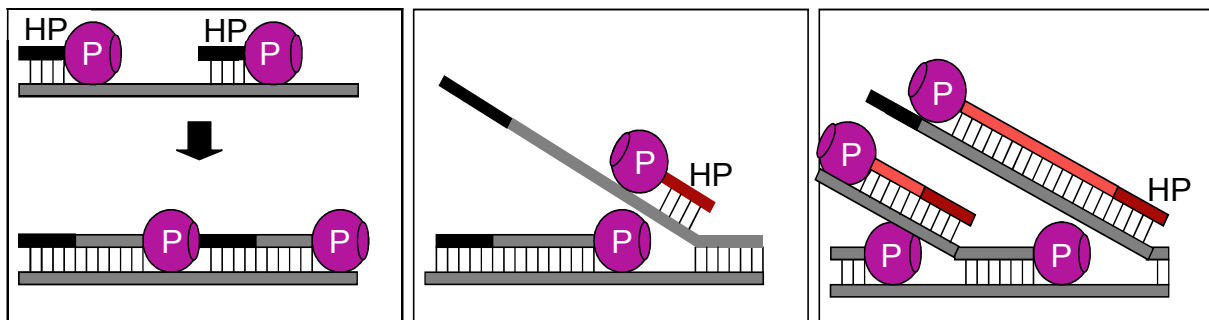


Abb. 15: Prinzip der *Multiple Displacement Amplifikation* (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).

Aus der klassischen PCR lassen sich weitere Methoden ableiten. Die MDA (*multiple displacement amplification*) zum Beispiel, ist ein Assay, bei dem die isothermale Amplifikation zum Einsatz kommt. Sie kann genomische DNA ohne Kenntnis der Sequenz und ohne großen apparativen Aufwand vervielfältigen. Die in einer Pufferlösung vorliegende DNA wird nur einmal denaturiert, woraufhin sich kurze Hexamerprimer (HP) über das gesamte Genom verteilt an die DNA anlagern können. Diese Primer sind der Startpunkt für die Polymerase (P). Erreicht die Polymerase einen auf der Sequenz vor ihr bereits angelagerten Hexamerprimer, werden dieser und die ab seiner Position bereits amplifizierte DNA verdrängt (Abb. 15 Mitte). Aufgrund dieser Technik ist es nicht notwendig, den Doppelstrang wiederholt aufzuschmelzen, was den technischen Aufwand erheblich verringert. Das Produkt dieser Amplifikation sind sehr lange zusammenhängende Kopien der gesamten

2. Theoretische Grundlagen

genomischen DNA (Gorochotegui-Escalante and Black, 2003; Luthra and Medeiros, 2004).

Eine weitere isothermale Methode ist LAMP. LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) verwendet eine DNA-Polymerase, sowie vier speziell entworfene Primer, die sechs bestimmte Sequenzen erkennen. Ein innerer Primer erkennt eine Sequenz auf beiden Strängen der Original-DNA und initiiert LAMP. An einem äußeren Primer beginnt die Polymerase mit der Amplifikation und produziert eine Einzelstrangkopie. Diese dient nun für das zweite Paar aus innerem und äußerem Primer als Kopiervorlage. Die Amplifikation beginnt und eine DNA-Schleife entsteht. Nun initiiert ein innerer Primer die nächste Amplifikation, in der ein Strang verdrängt wird und sich eine doppelt so lange DNA-Schleife bildet. So bilden sich bis zu 10^9 Kopien in weniger als einer Stunde (Notomi et al., 2000).

In einer RPA (*recombinase polymerase amplification*) initiiert ein Rekombinase-Primer-Komplex die Amplifikation der Original-DNA. Die Rekombinase öffnet den Doppelstrang ohne Denaturierung durch eine erhöhte Temperatur und ermöglicht es dem Primer sich anzulagern. Am angelagerten Primer beginnt eine Polymerase mit der Amplifikation und verdrängt dabei den Gegenstrang (Piepenburg et al., 2006).

NASBA (*Nucleic acid sequence based amplification*) ist eine spezielle isothermale Amplifikationsmethode. Sie dient zur Amplifikation von RNA. Reverse Transkriptase beginnt am ersten Primer mit der Synthese eines komplementären DNA-Stranges zur RNA. RNase H zerstört nur RNA-Stränge in einem RNA-DNA-Hybrid, es bleibt also eine einzelsträngige DNA übrig. Nach der Anlagerung des zweiten Primers synthetisiert die reverse Transkriptase den DNA-Gegenstrang. Es ist ein doppelsträngiges DNA-Produkt entstanden. Von diesem fertigt die T7 RNA-Polymerase ständig RNA-Kopien an, die wieder als Ausgangspunkt für den ersten Amplifikationsschritt dienen. Diese Technik eignet sich zum Beispiel für pathogene Viren mit einzelsträngigen RNA-Genomen oder zur Untersuchung von mRNA (Compton, 1991; Heim et al., 1998). Tabelle 13 zeigt eine Zusammenfassung der Eigenschaften der oben beschriebenen isothermalen Amplifikationsmethoden.

Die isothermalen Methoden haben inzwischen eine weite Verbreitung in diagnostischen Systemen gefunden (Asiello and Baeumner, 2011; Chang et al., 2012).

Tabelle 13: Zusammenfassung zu den isothermalen Amplifikationsmethoden.

Amplifikationsmethode	Mindestmenge	Zeit	Temperatur	Primerzahl	Literatur
MDA	10 Kopien	1,5 h	30 °C	Mischung mehrerer Hexamerprimer	(Qiagen (Hrsg.), 2006a)
LAMP	<10 Kopien	1 h	65 °C	6	(Notomi et al., 2000)
RPA	<10 Kopien	1 h	37 °C	2	(Piepenburg et al., 2006)
NASBA	<10 ² Kopien	1,5-2 h	41 °C	2	(Compton, 1991)

2.8 PCR zur Amplifikation des gesamten Genoms

Die „*GenomePlex Whole Genome Amplification*“ verwendet degenerierte Primer, um ein gesamtes Genom in einer PCR-Reaktion zu amplifizieren. Diese Amplifikationsmethode ist sehr stark auf den Zufall ausgerichtet. Es findet ein Verdau der zu amplifizierenden DNA statt, der die genomische DNA in kleine Stücke zerteilt. An diese Stücke werden schließlich degenerierte Primer angelagert mit deren Hilfe die DNA amplifiziert wird. Dadurch wird die Ausgangs-DNA zwar amplifiziert, aber eben auch zerkleinert (Kinzler and Vogelstein, 1989). Die angelagerten Primer bilden

2. Theoretische Grundlagen

an jedem DNA-Stück die gleiche Anfangs- und Endsequenz, die für die Amplifikation in der PCR genutzt werden kann (Abb. 16) (Hawkins et al., 2002).

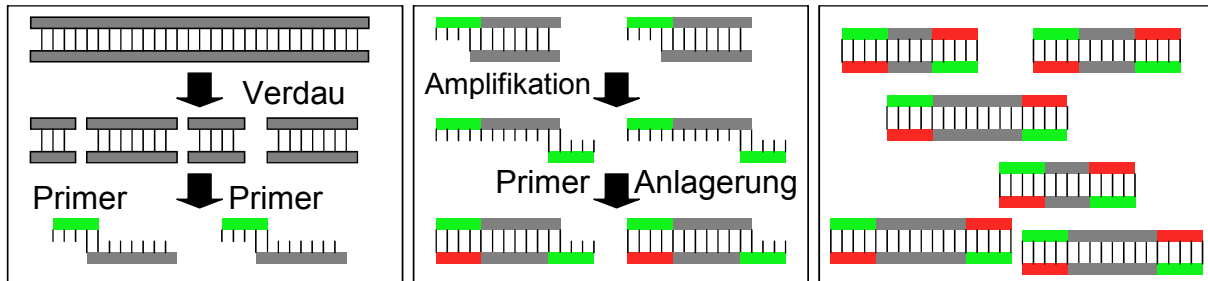


Abb. 16: Schema der *GenomPlex Whole Genome Amplification* (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).

2.9 Heterogene CL-DNA-Hybridisierungsassays

Ein Biosensor besteht aus einem Biorezeptor und einem Reportersystem. Als Biorezeptor dienen hauptsächlich Nukleinsäuren und Antikörper, aber auch Enzyme oder ganze Zellen können verwendet werden. Ist der Biorezeptor auf einer Oberfläche immobilisiert und der Analyt in Lösung, spricht man von einem heterogenen Assay. Das in dieser Arbeit verwendete Prinzip eines DNA-Mikroarrays ist ein solcher heterogener DNA-Hybridisierungsassay (Seidel and Niessner, 2008).

Ein DNA-Mikroarray ist ein analytisches Werkzeug zur orts aufgelösten Hybridisierung von DNA-Molekülen. DNA-Moleküle einer spezifischen Sequenz werden auf einem bestimmten Bereich kovalent fixiert (Spot). Als Träger dienen dazu zum Beispiel Glasoberflächen mit PEG-Oberflächenmodifikationen (Schlapak et al., 2006), wie in Abb. 17 schematisch dargestellt. Es können aber auch Träger aus Silizium oder Polymethylmethacrylat, Goldoberflächen, Filtermembranen, Glasfasern oder Polyacrylamidgele sein (Fixe et al., 2004). Schutzschichten gegen unspezifische Bindungen bestehen meist aus Aminodextranen (Kröger et al., 2002), Carboxydextranen (Masson et al., 2005) oder Polyethylenglykol (PEG) (Piehler et al.,

2000). Das an die Oberfläche des Mikroarrays gebundene Stück DNA dient als Fängersonde für die nachzuweisende Sequenz. Durch das hochspezifische Hybridisierungsereignis binden nur die gesuchten Sequenzen an der entsprechenden Stelle. Dieses Hybridisierungsereignis wird über ein Reportersystem in ein detektierbares Signal umgewandelt. Reportersysteme nutzen verschiedene physikalische und chemische Prinzipien wie die Chemilumineszenz, Fluoreszenz, Elektrochemilumineszenz oder Oberflächenplasmonenresonanz (Lemarchand et al., 2004; Loy and Bodrossy, 2006; Sassolas et al., 2008; Seidel and Niessner, 2008).

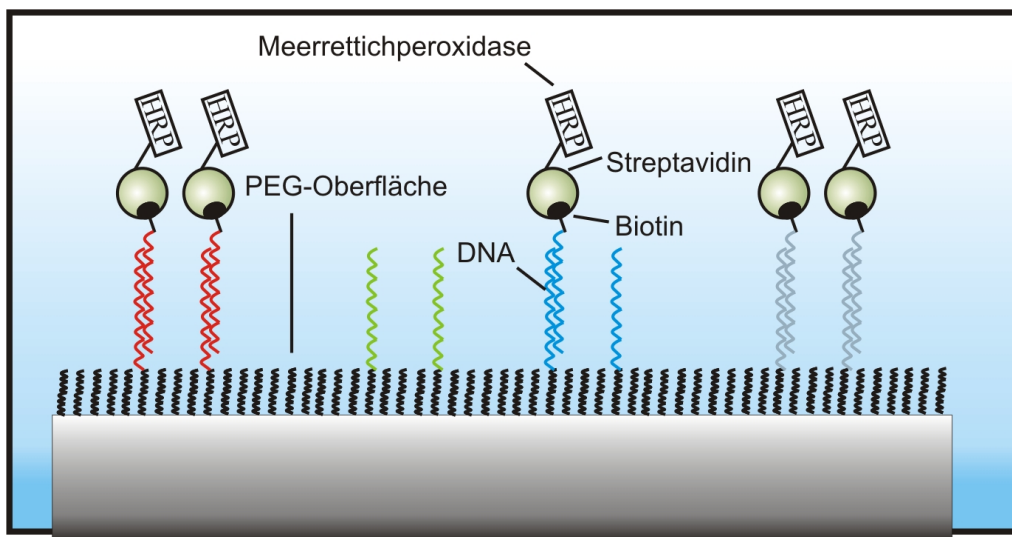


Abb. 17: Schematischer Aufbau eines DNA-Mikroarrays (Quelle: Grafiksammlung am Institut für Wasserchemie).

In Abb. 17 ist die nachzuweisende Sequenz bereits mit Biotin markiert. Das Reportersystem besteht aus einem Konjugat aus Streptavidin und Meerrettichperoxidase. Biotin und Streptavidin gehen eine starke nicht-kovalente Bindung ein (Florin et al., 1994). Die Peroxidase katalysiert mit ihren Substraten Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) und Wasserstoffperoxid eine lichterzeugende Reaktion (Chemilumineszenzreaktion), deren Emissionsspektrum bei 425 nm ein Maximum zeigt (Marquette and Blum, 2006). Das erzeugte Licht wird mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet und kann anschließend quantitativ

ausgewertet werden. Zur Auswertung des Reportersystems sind keine Lichtquelle, Filter, Spiegel oder sonstiger großer technischer Aufwand notwendig (Cao et al., 2011). Es genügt eine kompakte und günstige CCD-Kamera (Mallard et al., 2005). Das Fehlen einer Lichtquelle sorgt für sehr günstige Signal-Rausch-Verhältnisse, da nur ein sehr geringes Hintergrundsignal besteht (Hommatu et al., 2013).

Dieser Assayaufbau und Assayablauf mit einem Chemilumineszenzreportersystem wurde als Ausgangsprinzip für das hier beschriebene Projekt gewählt. Er diene dazu, die Oberflächenchemie zu testen, die Regenerationsmethode zu etablieren und die Amplifikationsmethode zu testen. Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, wurde dieser Aufbau weiterentwickelt, um auf dem Mikroarray direkt mit Einzelsträngen aus der PCR arbeiten zu können (Abb. 38).

Weitere Möglichkeiten zur kovalenten Bindung der DNA an die Mikroarrayoberfläche sind Thiolbindungen an Goldoberflächen oder die Kopplung von Aminogruppen durch Glutaraldehyd. Außer durch eine kovalente Bindung kann die DNA auch adsorbiert oder durch eine Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung gebunden werden. Bei der Adsorption findet eine Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen DNA-Rückgrat und einer positiv geladenen Sensoroberfläche statt. Die Sensoroberfläche kann eine Kohlenstoffoberfläche sein, oder ein kationisches Polymer wie Chitosan (Sassolas et al., 2008).

2.10 Vergleich der Mikroarrayreportersysteme

2.10.1 Chemilumineszenzreportersysteme

Die Chemilumineszenzreaktion mit Luminol ist oft sensitiver als Assays, die radioaktive Reportersysteme verwenden (Créton and Jaffe, 2001). Die Chemilumineszenzreaktion ist ein sehr einfach zu handhabendes und empfindliches Reportersystem, um Biomoleküle auf Mikroarrays nachzuweisen. Im Gegensatz zu Fluoreszenzmethoden ist die notwendige technische Ausstattung recht einfach und

es sind auch keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen wie etwa beim Einsatz von radioaktiven Markern notwendig.

Gegenwärtige Anwendungen dieses sensitiven Reportersystems gehen hin zu mobilen Auslesesystemen. Diese Systeme sind so ausgelegt, dass sie alle Schritte der Analyse durchführen können und dabei nur eine kleine Menge der Probe benötigen, wenige Reagenzien verbrauchen, die Analyse schnell durchgeführt wird und geringe Kosten entstehen (Mirasoli et al., 2013a). Die Miniaturisierung schreitet weiter fort. Zum Beispiel konnte die optische Linse durch eine Glasfaseroptik ersetzt werden, was einen kompakten Bau des CL-Mikroarray-Auslesegeräts erlaubte (Roda et al., 2011). Dieser Aufbau wurde für eine spezialisierte DNA-Analyse verwendet: Der entwickelte Mikroarray ermöglichte den Nachweis von Oligonukleotiden des Genotyps B19 zwischen 80 pmol/L und 650 pmol/L innerhalb von 30 Minuten. Die Integration der Probenvorbereitung und Nukleinsäureamplifikation war auch hier ein wichtiger Schritt. Die zukünftige Integration einer miniaturisierten PCR für die Amplifikation ist notwendig (Mirasoli et al., 2013b).

Chemilumineszenzreportersysteme bilden inzwischen eine sehr große und diversifizierte Methodenlandschaft. Es gibt unzählige Variationen dieser Reportersysteme, die auch in den nächsten Jahren noch die Möglichkeiten für weitere Verbesserungen der Analysesysteme bieten. Dabei handelt es sich zum Beispiel um den Einsatz von Nanopartikeln, Acridinestern, Enzymen und auf Luminol basierenden Chemilumineszenzassays (Fan et al., 2009; Natrajan et al., 2010).

Diese Systeme können durch verschiedene Verstärker noch sensitiver werden. Verstärkerradikale sorgen für eine schnellere Oxidation des Luminols zu seinem radikalischen Anion. Zu diesen Verstärkern zählen substituierte Phenole, substituierte Borsäuren, Indophenole und N-Alkyl-Phenothiazine, die als Elektronentransfermediatoren dienen. Auch durch die Zugabe von nukleophilen Katalysatoren der Acylierung zu den Substraten der Lichtreaktion wird eine bedeutende Steigerung der Lichtausbeute erzielt. Phenothiazine zeigten eine bis zu 10-fach stärkere Lichtausbeute. Die Nachweisgrenze für HRP konnte von 50 auf 8 amol verringert werden (Marzocchi et al., 2008). Auch die Luminol-Hypochlorit-

Reaktion konnte um den Faktor 10 verstärkt werden. Dazu wurde Phloxin B als Verstärker zugegeben (Song et al., 2013).

Sowohl der pH-Wert, als auch die Temperatur und das verwendete Lösungsmittel haben einen Einfluss auf die Lichtausbeute (Chandel et al., 2012).

Spezielle Nanomaterialien unterstützen die Chemilumineszenzreaktion und erhöhen die Sensitivität. So dienen beispielsweise Metalle oder Metalloxide als Katalysatoren in der Chemilumineszenzreaktion (Kong et al., 2011; Roda and Guardigli, 2011; Su et al., 2013).

2.10.2 Elektrochemilumineszenzreportersysteme (ECL)

Elektrochemilumineszenz bedeutet, dass an einer Elektrode aus stabilen Edukten sehr reaktive Reaktanten erzeugt werden. Elektrische Energie löst eine chemische, lichterzeugende Reaktion aus. Diese Technologie hat gegenüber anderen Reportersystemen erhebliche Vorteile: die Nachweisgrenzen sind extrem niedrig (200 fmol/L), der dynamische Signalbereich reicht dabei über sechs Dekaden und die Marker sind im Vergleich zu anderen Chemilumineszenzsystemen extrem stabil. Die Marker sind kleine Moleküle (~1000 Da), die an Haptene oder auch große Moleküle gebunden werden können. An größere Moleküle wie Proteine oder Oligonukleotide können sogar mehrere dieser Marker angebracht werden, ohne die Immunreaktivität, die Löslichkeit oder die Fähigkeit zur Hybridisierung zu beeinträchtigen. Der Nachweis ist einfach und benötigt nur ein paar Sekunden (Blackburn et al., 1991; Miao, 2008; Richter, 2004).

Sehr oft werden Tris-(2,2'-Bipyridyl)-Ruthenium(II)-Komplexe verwendet ($[\text{Ru}(\text{Bpy})_3]^{2+}$), diese emittieren ein Photon der Wellenlänge ~620 nm (Lee, 1997; Choi et al., 2003).

Zusätzliche Modifikationen, zum Beispiel mit Dendrimerstrukturen, haben zu einer Erhöhung der Sensitivität geführt (Li et al., 2013). Durch Modifikationen wurden Nachweisgrenzen für DNA von 1,0 fmol/L und 300 Zellen/mL erreicht (Miao and Bard, 2004; Jie et al., 2013). Es wurden sogar schon Nachweisgrenzen für DNA von 0,06 amol/L berichtet (Liu et al., 2013). Allen Veröffentlichungen gemein ist ein

großer dynamischer Nachweisbereich über mehrere Dekaden aus dem Femtomol-Bereich bis in den Pikomol-Bereich hinein (Zhang et al., 2013).

2.10.3 Fluoreszenzreportersysteme

Fluoreszenzreportersysteme finden v.a. in Laboranwendungen eine große Verbreitung. Sie lösten die problematischen radioaktiven Marker ab und bieten einen sensitiven Nachweis, sowohl in Mikroskopieanwendungen, als auch beim Einsatz in DNA-Mikroarrays. Die Methoden und ihre Anwendungen im Bereich der Mikroarrays werden ständig erweitert (Bok et al., 2013; Pierik et al., 2010).

Inzwischen ist es auch möglich handliche und günstige Fluoreszenzauslesegeräte zu bauen, was u.a. an den Fortschritten in der Diodenlasertechnologie liegt (Kozma et al., 2013; LaFratta et al., 2010; Bercovici et al., 2010). Fortschritte in der DVD-Technologie haben auch hier für eine Weiterentwicklung gesorgt (Pierik et al., 2012). Als Fluorophore werden sehr unterschiedliche Substanzen eingesetzt, die vom Infrarotspektrum bis zum UV-Spektrum reichen. Im UV-Bereich werden Quantum Dots (Nanopartikel) als Fluorophore eingesetzt (Algar and Krull, 2010).

Eine spezielle Version der Fluoreszenzreportersysteme ist die *total internal reflectance fluorescence* (TIRF). Dabei wird ein Lichtstrahl am Übergang zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex total reflektiert. An der Stelle der Reflektion entsteht ein evaneszentes Feld, das trotz der totalen Reflektion in das andere Medium reicht. Dort können dann entsprechende Fluorophore angeregt werden (Schumacher et al., 2012; Gauglitz, 2005).

Durch die Miniaturisierung bei CCD-Kameras, Dioden-Lasern und der Verfügbarkeit entsprechender Objektive, ist es möglich TIRF-Chips sehr kompakt und für tragbare Geräte zu bauen (Asanov et al., 2012). Es wurde mit TIRF eine Nachweisgrenze von 5 fmol erreicht. Die entwickelte Plattform konnte als guter Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung eines DNA-Chips dienen (Neumann et al., 2010). Bei Viren konnte eine Nachweisgrenze von 10 Genomkopien erreicht werden (Brandstetter et al., 2010).

2.10.4 Elektrochemische Reportersysteme

Im Allgemeinen kann Redoxcycling auf elektrochemischem, enzymatischem und chemischem Weg erreicht werden. Beim elektrochemischen Redoxcycling wird die elektroaktive Species an einer Elektrode oxidiert und an der zweiten Elektrode reduziert. Es sind also zwei Elektroden notwendig, was die Komplexität und die Kosten für einen DNA-Sensor in die Höhe treiben (Walter et al., 2011).

Für chemisches Redoxcycling wurde zum Beispiel p-Aminophenol an einer Indium-Zinnoxid-Elektrode (modifiziert mit Ferrocenyl-Dendrimern) oxidiert. Das oxidierte Produkt p-Chinonimin wurde durch Hydrazin zu p-Aminophenol reduziert. p-Aminophenol wurde dann wieder zu p-Chinonimin oxidiert, was zu einem Redoxcycling-Kreislauf führte (Das et al., 2007).

Eine einfache Methode des Redoxcyclings ist das enzymatische Redoxcycling, welches allerdings stark von der Enzymkinetik des verwendeten Enzyms abhängig ist. Enzyme haben meist eine hohe Umsatzrate und eine gute Selektivität. Die alkalische Phosphatase ist der am häufigsten verwendete enzymatische Marker in DNA-Hybridisierungsassays. Sie dephosphoryliert p-Aminophenylphosphat und erzeugt die elektroaktive Spezies p-Aminophenol, die amperometrisch an einer Elektrode nachgewiesen werden konnte (Walter et al., 2011).

Redoxcycling lässt sich direkt in Halbleiteranwendungen, wie zum Beispiel CMOS-Chips, einbinden (Frey et al., 2005). Zumeist werden diese Chips so entwickelt, dass sehr viele Analysen gleichzeitig durchgeführt werden können – typischer Weise sind es 384 Analysen. Das Prinzip des Redoxcyclings lässt sich für so verschiedene Analysen wie *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) oder DNA-Hybridisierungsassays verwenden (Ino et al., 2011). Die erzielbaren Nachweisgrenzen lagen für dieses Reportersystem für DNA schon im femtomolaren Bereich, ohne eine Amplifikation durch Redoxcycling (Neugebauer et al., 2009). *E. coli*-RNA wurde mit 0,5 ng/μL mit Redoxcycling nachgewiesen (Elsholz et al., 2006). In einem anderen Report wurde *E. coli*-DNA mit einer Nachweisgrenze von 1 pmol/L und die Bakterien selbst mit einer Konzentration von 250 CFU/μL (*colony forming unit*) bestimmt (Walter et al., 2011).

Es konnten aber auch andere elektroaktive Marker, wie zum Beispiel Methylenblau verwendet werden. Die Nachweisgrenze lag dann allerdings nur bei 10 nmol/L (Zhu et al., 2004).

2.10.5 Markierungsfreie Detektionssysteme

Ein besonderes Forschungsfeld sind markierungsfreie Detektionssysteme. Sie sollen eine vereinfachte Probenvorbereitung und eine kürzere Analysezeit ermöglichen. Beispielhaft werden hier einige Systeme besprochen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung einer Mikrowaage (Okahata et al., 1998).

Eine andere Methode nutzt einen Quarzkristall mit einer aufgetragenen Goldschicht. Durch eine Thiol/Dextran-Modifikation konnte Streptavidin gebunden werden. Die biotinylierten 23-mer DNA-Fängersonden banden an das Streptavidin. Fand eine Hybridisierung an der DNA-Fängersonde statt, ließ sich dies an der veränderten Resonanzfrequenz des Kristalls über den Piezoeffekt ablesen (Tombelli et al., 2000). Die Impedanz-Messung (Wechselstromwiderstand) kann ebenfalls für einen Mikroarray genutzt werden. Durch die Bindung von DNA-Molekülen auf der Elektrodenoberfläche fand eine detektierbare Impedanzänderung statt (Manickam et al., 2010).

Die Messnadel eines Rasterkraftmikroskops kann ebenfalls für einen DNA-Mikroarray genutzt werden. Bindet zum Beispiel mRNA an dort immobilisierte DNA-Sonden, verändert sich die Resonanzfrequenz. Diese Änderung konnte detektiert werden. Die erreichte Nachweisgrenze lag bei 10 amol und die Assayzeit betrug rund eine Stunde (Johnson and Mutharasan, 2012).

Technische Fortschritte erlauben es, das bisher ungenutzte Terahertz-Frequenzband für analytische Verfahren zu nutzen. Das Terahertz-Frequenzband liegt zwischen 0,3 THz und 10 THz im elektromagnetischen Spektrum, also zwischen Mikrowellen und dem Infrarotbereich. Die Strahlen sind für das menschliche Auge unsichtbar, im Gegensatz zu Röntgenstrahlen aber sicher, zerstörungsfrei und dringen nicht in den menschlichen Körper ein. Es gibt bereits unterschiedliche Anwendungen zum Beispiel in Ganzkörperscannern, aber auch als Reportersystem in analytischen

2. Theoretische Grundlagen

Systemen. Trotz einer kontinuierlichen Weiterentwicklung der Terahertz-Systeme gibt es bisher keinen Durchbruch für die Anwendung dieses Reportersystems in DNA-Mikroarraysystemen (Haring Bolívar et al., 2004; Janke et al., 2005; Pawar et al., 2013). In der PCR amplifizierte DNA ließ sich damit direkt in Lösung nachweisen. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 ng/μL in einem Volumen von 10 μL (Arora et al., 2012). Um an niedrigere Nachweisgrenzen zu gelangen musste die Technik aber noch verbessert werden und auf Oberflächen angewendet werden (Menikh et al., 2004). 20-mer Einzelstrang-DNA konnte mit einer Nachweisgrenze von 40 fmol analysiert werden (Nagel et al., 2003).

Weitere Reportersysteme lassen sich aus der direkten optischen Detektion in der heterogenen Phase ableiten. Gemessen werden kann zum Beispiel der Absorptionsgrad von reflektierter Strahlung, der Brechungsindex, die Interferenz oder die Änderung der evaneszenten Welle (Gauglitz, 2005).

a) *Dual polarization interferometry* (DPI)

DPI nutzt zwei sich überlagernde Laserstrahlen in einem Strahlenleiter. Auf dem Strahlenleiter werden die Fängermoleküle des Bioassays als biologische Schicht aufgebracht. Über ein Interferogramm können der Brechungsindex und die Dicke der biologischen Schicht auf dem Strahlenleiter bestimmt werden. Dadurch kann zum Beispiel ein Hybridisierungsereignis nachgewiesen werden. Erste Experimente mit Adenin-Homomeren zeigten, dass die duale Polarisationsinterferometrie einen Ansatzpunkt für einen DNA-Sensor bietet. Weitere Untersuchungen sind allerdings notwendig (Wang et al., 2012).

b) *Surface plasmon resonance* (SPR)

Ein Lichtstrahl regt die Oberflächenelektronen in einer Gold- oder Silberschicht an. Es gibt verschiedene Anregungs- und Detektionsmodi mit variierenden Einstrahl- und Nachweiswinkeln. Der Lichtstrahl trifft aber in jedem Fall auf die Goldoberfläche,

interagiert mit ihr und wird anschließend reflektiert. Auf der gegenüberliegenden Seite der Goldoberfläche sind die Bioassays angelegt. Eine DNA-Fängersonde ist zum Beispiel dort angebunden und es findet eine Hybridisierungsreaktion statt. Dadurch ändern sich die Reflektionswinkel an der Goldoberfläche massenabhängig und die Hybridisierung kann nachgewiesen werden (Gauglitz, 2005).

Mit normaler SPR wurden Nachweisgrenzen von 2-5 nmol/L für eine DNA-Hybridisierung erreicht (Okabe et al., 2012; Pillet et al., 2010). Die Nachweisgrenzen sind aber auch stark von der Länge, sprich der Masse der Ziel-DNA, abhängig. Je schwerer das Molekül, desto leichter der Nachweis, da das SPR-Signal direkt abhängig von der Masse ist. Die Nachweisgrenze in solchen Experimenten lag dann bei 0,5 ng/ μ L (Kick et al., 2010).

Durch Modifikationen der Chip-Oberfläche wurden in weiteren Experimenten für 23-mer Einzelstrang-DNA Nachweisgrenzen von 100 pmol/L erreicht (Piliarik et al., 2007). Eine Kombination aus SPR mit *phase imaging* und Signalverstärkung durch Silika-Nanopartikeln ergab eine Nachweisgrenze von 25 fmol/L für 38-mer Einzelstrang-DNA (Zhou et al., 2012).

c) *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS)

Der Raman-Effekt basiert auf der inelastischen Streuung eines Photons. Dieser Effekt kann durch verschiedene Oberflächenmodifikationen verstärkt werden. Meist werden Goldoberflächen verwendet und es werden Verstärkungsfaktoren von 10^7 bis 10^8 erzielt. Dadurch konnte DNA mit einer Nachweisgrenze von 1 ng/mL detektiert werden. Das SERS-Signal konnte dabei zwischen einem Basenpaar-Mismatch unterscheiden (Green et al., 2006; Bi et al., 2013). Die Kombination aus einem Goldarray und Silbernanopartikeln ermöglichte auch Nachweisgrenzen niedriger als 1 pmol/L (Lo et al., 2011).

Zur verbesserten Anwendung wurde das SERS-Reportersystem mit einer Mikrofluidik kombiniert und zum Nachweis von DNA-Oligonukleotiden genutzt. Allerdings waren die Analytmoleküle in diesem Versuch markiert, also nicht

markierungsfrei (Strelau et al., 2010; Hering et al., 2008). Konfokale SERS benötigte zwar auch einen Marker am DNA-Molekül, erreichte aber eine Nachweisgrenze von 10 pmol/L (Park et al., 2005).

2.11 Fortschritte in der Mikrofluidik und Chiptechnik

Die Mikrofluidik hat das Ziel alle notwendigen Schritte im Labor zu miniaturisieren und in ein Gerät zu verlagern. Dabei wurden in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt und neue Anwendungsbereiche erschlossen (Kim et al., 2010; Sekhon and Kamboj, 2010).

Eine der Verbesserungen war die Miniaturisierung der PCR und eine mögliche direkte fluidische Anbindung an einen Mikroarray. Das PCR-Volumen wurde dabei auf 1 μ L reduziert und 40 Amplifikationszyklen benötigten nur noch 40 Minuten (Cho et al., 2006).

Die Fortschritte in der Mikrofluidik sind darauf ausgerichtet, möglichst kurze Assayzeiten zu erreichen und den manuellen Aufwand zu minimieren. Assays können dann schon innerhalb weniger Minuten (15 Minuten) durchgeführt werden. Die Einfachheit und Robustheit dieser neuen Geräte erlaubt eine Bedienung durch nur gering ausgebildetes Personal und eine Nutzung auch außerhalb des Labors (Schumacher et al., 2012).

In mikrofluidischen Umgebungen ist es immer eine Herausforderung, wie kleine Volumina oder gar einzelne Moleküle gezielt bewegt werden können. Eine interessante Entwicklung ist die Elektrokinetik. Sie erlaubt die Manipulation von DNA-Molekülen, um eine höhere Sensitivität der Mikroarrays zu erreichen, sie kann aber auch zur Regeneration der Chips verwendet werden (Mir et al., 2011). Da in kleinen Volumina die Diffusion dominiert, ist eine konvektive Durchmischung schwierig. Dies führt zu langen Assayzeiten. Es gibt aber die Möglichkeit den Piezoeffekt für einen Kavitationsmischer zu nutzen, wodurch sich die Hybridisierung bereits nach kurzer Zeit

im Gleichgewichtszustand befindet. Dadurch verkürzte sich die Assayzeit in den Minutenbereich und erlaubte in einem SPR-System eine Nachweisgrenze von 5 nmol/L DNA (Okabe et al., 2012).

Vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten bieten auch nanostrukturierte Glasfaserarrays. Sie dienen zum Beispiel als Lichtleiter für SERS-Plattformen. Sie bieten außerdem die Möglichkeit über verschiedene Oberflächentechniken (chemisches Ätzen) Nanostrukturen zu generieren, die als Nanowells verwendet werden können (Deiss et al., 2010).

2.12 Vergleich der verschiedenen Testverfahren

In dieser Arbeit wurde ein DNA-Hybridisierungsassay entwickelt. Die Basis bildet dabei eine Oberflächenchemie, die über mehrere Einsätze hinweg ein stabiles Signalbild abgibt. Der Assay weist mit verschiedenen Analyten eine hohe Sensitivität auf, was auf die entwickelte Amplifikationsmethode und den Strangvereinzelnungsassay zurückzuführen ist. Mit dem Assay konnte direkt in Zellen/mL quantifiziert werden, was einen Einsatz für die Trinkwasseranalytik ermöglicht. Die Gesamtdauer für diesen Assay lag bei 3,5 Stunden und die erreichten Nachweisgrenzen lagen zwischen 10 und 100 Zellen pro Milliliter. Im Vergleich zu anderen Assays wurden eine hohe Sensitivität und eine kurze Assaydauer erreicht. Außerdem ist dieser Assay für eine absolute Quantifizierung geeignet.

Der Hauptkonkurrent des in dieser Arbeit entwickelten Systems sind die Immunoassays. Ein Überblick dazu findet sich in Tabelle 14. Die Immunoassays basieren auf der Antigenerkennung durch Antikörper. Es wurden Nachweisgrenzen von 5 - 10 Zellen pro Milliliter und Assayzeiten von einigen Stunden erreicht (Wang et al., 2011; Zhu et al., 2005, 2011). Wurde die Zeit erheblich verkürzt (z.B. auf 15 Minuten), konnte sich an den Antikörpern aufgrund der Diffusionslimitation kein Bindungsgleichgewicht einstellen und die Sensitivität reduzierte sich auf 10^3 bis

2. Theoretische Grundlagen

10^7 Zellen/mL (Karsunke et al., 2009; Wolter et al., 2008). Für Viren ließen sich bei voller Sensitivität auch Reaktionszeiten von 5 Minuten erreichen, da die Diffusionsgeschwindigkeit für Viren größer ist als für Bakterien und dies auf die Gleichgewichtseinstellung einen erheblichen Einfluss hat (García-Aljaro et al., 2010). Lebende *E. coli*-Zellen konnten durch eine *stopped-flow* Methode in 67 Minuten bei einer Nachweisgrenze von 4×10^5 Zellen/mL nachgewiesen werden. Die *stopped-flow* Methode ersetzte ein mechanisches Mischen und machte den Assay weniger abhängig von der Diffusion (Langer et al., 2011).

Für die auf Immunoassays basierenden Mikroarrays sind sehr unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten denkbar. Sie lassen sich mit der entsprechenden Voranreicherungsmethode auch für die Analyse von Bakterien in Aerosolen verwenden, oder aber zur Selektion von Antikörpern (Langer et al., 2012; Wutz et al., 2013).

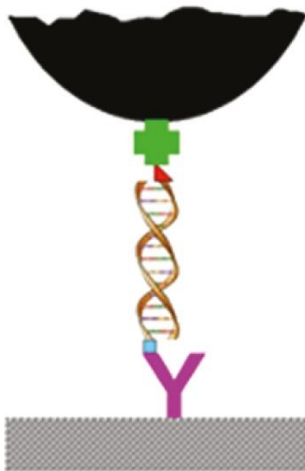


Abb. 18 Assayschema für den Nachweis doppelsträngiger DNA (Noguera et al., 2011).

Noguera et al. konnten doppelsträngige DNA ohne Strangvereinzelung auf einem Mikroarray nachweisen (Abb. 18). Dazu wurde das gesuchte Gen in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsprimer waren markiert. Die Vorwärtsprimer waren mit unterschiedlichen Markierungen, spezifisch für ein Gen versehen. Der Rückwärtsprimer war immer mit Biotin markiert. Auf der

Mikroarrayoberfläche wurden Antikörper gespottet, die spezifisch die Markierungen am Vorwärtsprimer erkannten. Das doppelsträngige PCR-Produkt band an die gespotteten Antikörper. Als Nachweis band ein Kohlenstoffnanopartikel mit Avidinmarkierung an das Biotin. Die Kohlenstoffnanopartikel wurden über einen handelsüblichen Scanner ausgewertet. Auf diesem Weg konnte die Strangvereinzelung umgangen werden. Die Multiplexfähigkeit wurde allerdings durch die limitierte Zahl der verfügbaren Markierungen begrenzt. Außerdem hat jede Markierung-Antikörper-Kombination ihre spezifische Bindungskonstante und somit ergeben sich unterschiedliche Nachweisgrenzen allein aus dieser Interaktion. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 10^4 und 10^5 Zellen/mL, bei einer Assayzeit von 1,5 Stunden (Noguera et al., 2011).

DNA-Mikroarrays haben zwei Vorteile gegenüber Immunoassays. Erstens sind das Design und die Herstellung der DNA-Sonden im Vergleich zur Antikörperherstellung sehr einfach und schnell. Ist eine neue DNA-Sequenz durch Sequenzierung erkannt, kann eine entsprechende Sonde innerhalb weniger Stunden synthetisiert werden (Beaucage and Iyer, 1992). Die Entwicklung von DNA-Sonden kann mit der schnellen Mutation der Erreger mithalten (Li et al., 2012).

Der zweite Vorteil der DNA-Mikroarrays gegenüber Immunoassays ist die Möglichkeit der DNA-Amplifikation und somit einer deutlich höheren Sensitivität. Mit Chemilumineszenz-DNA-Mikroarrays konnten zum Beispiel extrem sensitive Nachweise geführt werden, die eine Nachweisgrenze bei 0,26 fmol/L haben (Dong et al., 2013). Diese erfordern aber noch manuelle Arbeitsschritte. In einer automatisierten, mikrofluidischen Umgebung ließ sich die Assayzeit auf 30 Minuten verkürzen. Die Nachweisgrenze lag allerdings bei 80 pmol/L (Mirasoli et al., 2013b). In einem anderen Report wurde *E. coli*-DNA mit einer Nachweisgrenze von 1 pmol/L und die Bakterien selbst mit einer Konzentration von 250 CFU/ μ L bestimmt (Walter et al., 2011). Meist haben die Assays eine gute Nachweisgrenze, wenn einzelsträngige, synthetische DNA vorliegt. Der Nachweis ganzer Bakterienzellen ohne Strangvereinzelung ergibt schlechtere Nachweisgrenzen.

2. Theoretische Grundlagen

Ziel ist es also möglichst viele Schritte in einer automatisierten Umgebung zu vereinen und dabei die analytische Fragestellung genau im Auge zu behalten. Auf diesem Weg sind noch einige Fragen zu beantworten. Zum Beispiel die Frage nach der besten Methodik zur Probenvorbereitung, die ideale Lagerung der Reagenzien, die Stromversorgung und wie sich eine weitere Miniaturisierung umsetzen lässt. Dabei soll aber immer eine möglichst hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit bei kurzer Assayzeit erreicht werden (Yoon and Kim, 2012).

Tabelle 14: Vergleich zwischen Immunoassays und DNA-Assays.

	Assaydauer	Nachweisgrenze	Fängersonde (Herstellung)
Antikörper-Assay (ohne GGW-einstellung) (Wolter et al., 2008)	15 Minuten	10^3 Zellen/mL	Antikörperproduktion ist relativ aufwendig
Antikörper-Assay (mit GGW-einstellung) (Zhu et al., 2011)	Unter 3 Stunden	10 Zellen/mL	Antikörperproduktion ist relativ aufwendig
Synth. DNA-Assay (25mer Oligonukleotid) (Donhauser et al., 2009)	15 Minuten	10^2 Kopien/mL	Einfaches Design und Herstellung
Doppelstrang DNA-Assay (PCR-Produkt) (Donhauser et al., 2009)	7 Stunden	10^6 Kopien/mL	Einfaches Design und Herstellung
Einzelstrang DNA-Assay mit Strangvereinzellung (PCR-Produkt) (Donhauser et al., 2011)	3,5 Stunden	10 Zellen/mL	Einfaches Design und Herstellung

Neben dem Munich Chip Reader 3 gibt es weitere Projekte, die an automatisierten Mikroarrays arbeiten. Die Fraunhofer-Institute haben eine Plattform namens "Fraunhofer ivD-Plattform" entwickelt. Sie hat zum Ziel, kostengünstige Analysen

direkt am Patienten vor Ort durchführen zu können. Es wurde ein vollautomatisches System entwickelt, das Nukleinsäuren oder Proteine in 15 Minuten nachweisen kann. Zur Anwendung kommt das Redoxcycling oder TIRF. Auch eine Probenvorbereitung in Form von einer *PCR-on-chip* ist integriert (Elsholz et al., 2006; Schumacher et al., 2012). Bei *S. aureus* wurde eine Nachweisgrenze von 250 pg genomische DNA erreicht, bei *N. gonorrhoeae* 1 ng genomische DNA (Andresen et al., 2009). Weitere automatisierte Mikroarrayplattformen sind RIANA, AWACCS, NRL oder eMicroLISA (Seidel and Niessner, 2008).

Es wurde in der vorliegenden Arbeit ein sehr sensitives Nachweissystem entwickelt, das aber noch Potential für eine Verkürzung der Assayzeit durch weitere Automatisierung bietet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Oberflächenchemie

Die Oberflächenchemie ist der entscheidende Punkt, um sensitive DNA-Mikroarrays mit reproduzierbaren Ergebnissen zu erhalten. Dies wird durch eine hohe Bindungskapazität mit sehr niedrigen unspezifischen Bindungen erreicht. Idealerweise sollten die Mikroarrays nicht nur einmal, sondern des Öfteren verwendet werden können. Zur Erfüllung dieser Anforderungen bedarf es einer speziell entwickelten Oberflächenchemie und einer dazu abgestimmten Regenerationsmethode.

Mikroarrays, die für optische Auslesesysteme bestimmt sind, werden zumeist auf Objektträgern aus Glas aufgebaut. *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Oberflächen sind mögliche Modifikationen für Glasträger (Blixt et al., 2004). Schutzschichten gegen unspezifische Bindungen bestehen meist aus Aminodextranen (Kröger et al., 2002), Carboxydextranen (Masson et al., 2005) oder Polyethylenglykol (PEG) (Piehler et al., 2000). Diese Schichten sind daraufhin optimiert möglichst wenige unspezifische Bindungen zu ermöglichen. PEG-Oberflächen sind bereits dafür bekannt, dass sie unspezifische Bindungen von Biopolymeren reduzieren (Kannan et al., 2006; Kingshott et al., 2002; Prime and Whitesides, 1993). Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid-Triblockkopolymere werden häufig in der biotechnologischen und pharmazeutischen Industrie aufgrund ihrer Grenzflächenaktivität eingesetzt (Huang et al., 2002).

3.1.1 Entwicklung der Oberflächenchemie und der Spotting-Bedingungen

Als Testassay wurde eine 25 Nukleotide lange Sonde des *16S rRNA*-Gens aus *R. planticola* verwendet. Mittels einer Amino-Gruppe am 5'-Ende wurde sie kovalent auf einem Glasobjektträger gebunden. Der exakte Gegenstrang mit einer Biotin-

Markierung am 5'-Ende diente als Analyt. Die Biotinmarkierung konnte durch ein Streptavidin-HRP-Konjugat für eine CL-Detektion genutzt werden. Mit diesem Aufbau wurden die folgenden Evaluierungen durchgeführt.

Zunächst wurde die optimale Kombination aus Oberflächenchemie, Mikrodosierpuffer und DNA-Sonden-Konzentration entwickelt. Es konnte auf eine bereits bestehende Oberflächenchemie aus Diamino-PEG mit NHS-Aktivierung zurückgegriffen werden (Wolter et al., 2007). Als Mikrodosierpuffer wurde Wasser verwendet. Die höchsten CL-Werte wurden mit 10 mg/mL DNA-Konzentration im Mikrodosierpuffer erreicht ($6,1 \times 10^5$ a.u.) (Abb. 19).

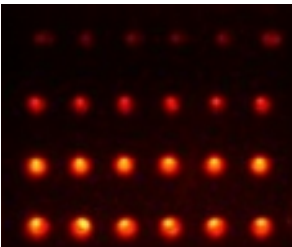
	Konzentration der DNA-Sonde	CL-Summensignal Mittelwert in [a.u.]	Signal-Rausch-Verhältnis
	0,01 mg/mL	$0,4 \times 10^5$ (SD: 27 %)	37 (SD: 6 %)
	0,1 mg/mL	$1,6 \times 10^5$ (SD: 9 %)	196 (SD: 8 %)
	1 mg/mL	$5,3 \times 10^5$ (SD: 3 %)	426 (SD: 8 %)
	10 mg/mL	$6,1 \times 10^5$ (SD: 9 %)	500 (SD: 8 %)

Abb. 19: Vergleich verschiedener Konzentrationen der *R. planticola* (Gen: 16S rRNA) Sonde in Wasser auf einer Diamino-PEG-Oberfläche (10, 1, 0,1, 0,01 mg/mL). Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10^{-3} mg/mL eingesetzt.

3.1.2 Regenerationsmethoden

DNA-Einzelstränge sind unter bestimmten Umständen in der Lage Doppelstränge zu bilden. Es paaren sich dabei die Basen Adenin mit Thymin, sowie Guanin mit Cytosin. Die Basenpaarung ist abhängig von der richtigen Salzkonzentration, der richtigen Temperatur und dem richtigen pH-Wert. Wenn die passende Kombination dieser Bedingungen erreicht wird, hybridisieren die Analytmoleküle mit den Sonden auf der Mikroarrayoberfläche. Um die Basenpaarung wieder zu trennen und die

3. Ergebnisse und Diskussion

Mikroarrayoberfläche zu regenerieren, müssen folglich davon abweichende Bedingungen eingestellt werden. Dazu kann zum Beispiel die Temperatur erhöht werden oder ein veränderter pH-Wert (kann sowohl erhöht als auch erniedrigt werden, s.u.) eingestellt werden. Eine Verringerung der Salzkonzentration sorgt ebenfalls für eine Auftrennung der Doppelstränge. Die Ionen entlang der DNA-Stränge werden abgezogen, die Ladungen des Phosphatrückgrats werden nicht mehr abgeschirmt und die Stränge stoßen sich gegenseitig ab.

Eine erhöhte Temperatur führt zu einem Aufschmelzen der Doppelstränge. Die Wasserstoffbrückenbindungen werden aufgrund der Energiezufuhr getrennt. Ein hoher pH-Wert führt zur Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Deprotonierung der Basen, wodurch die Basen negativ geladen werden und sich die beiden Stränge gegenseitig abstoßen. Ein niedriger pH-Wert sorgt im Gegensatz dazu für eine Protonierung der Basen, also für eine positive Ladung auf den Basen, was aber ebenfalls zu einer gegenseitigen Abstoßung der Stränge führt. Sowohl ein hoher als auch ein niedriger pH-Wert führen also zu einer Auftrennung des Doppelstranges. Theoretisch führen also alle drei Methoden, wie die Erhöhung der Temperatur oder die Erhöhung/Verringerung des pH-Wertes (Rice and Doty, 1957; Brabec, 1979; Mandel and Marmur, 1968; Ageno et al., 1969; Hermann and Fredericq, 1977) zu einer Strangauftrennung und somit zu einer Regenerierung der Mikroarrayoberfläche. Um dies in der Praxis umzusetzen, müssen diese Methoden im Zusammenhang mit der optimalen Oberflächenchemie getestet werden. Dazu wurden Regenerationsexperimente mit bis zu 22 Regenerationen analysiert. Dabei wurde nach der Regeneration Nummer 2 nur alle fünf Regenerationen eine CL-Reaktion durchgeführt.

Nach der Entwicklung der Oberflächenchemie und der Findung des richtigen Mikrodosierpuffers wurde die passende Regenerationsmethode entwickelt. Als erstes wurde die bei DNA naheliegende Methode, das Aufschmelzen des Doppelstranges mittels Hitze, getestet. Ein elektrisches Widerstandsheizelement wurde auf einem Aluminiumblock befestigt. Der Aluminiumblock hatte eine konstante Temperatur von 102 °C. Zur Durchführung der Regeneration wurde der Aluminiumblock auf den

Mikroarray aufgelegt und die Flusszelle wurde mit 7 x 400 μL PBS/Casein-Puffer gespült (20 μL pro Sekunde = Gesamtdauer der Regeneration drei Minuten). Nach der Regeneration wurde der Aluminiumblock wieder von der Flusszelle entfernt. In einem vorhergehenden Test wurde die gleiche Routine verwendet, die Temperatur aber auf 94 $^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Dies war nicht ausreichend, um die Basenpaarung vollständig zu lösen. Das Aufheizen des Mikroarrays mit 102 $^{\circ}\text{C}$ sorgte dagegen für ein Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge. Das Signal ging auf 9 % des Ausgangssignals vor der Regeneration zurück. Alle Analytstränge wurden von den Sonden auf der Oberfläche abgelöst. Durch wiederholte Regeneration wurde allerdings die Oberflächenchemie geschädigt und somit die Signalstärke verringert. Bereits nach 12 bis 17 Regenerationen war ein stabiles, aber sehr niedriges absolutes Signal erreicht (Abb. 20). Das Endsignal betrug noch 12 % des Anfangssignals.

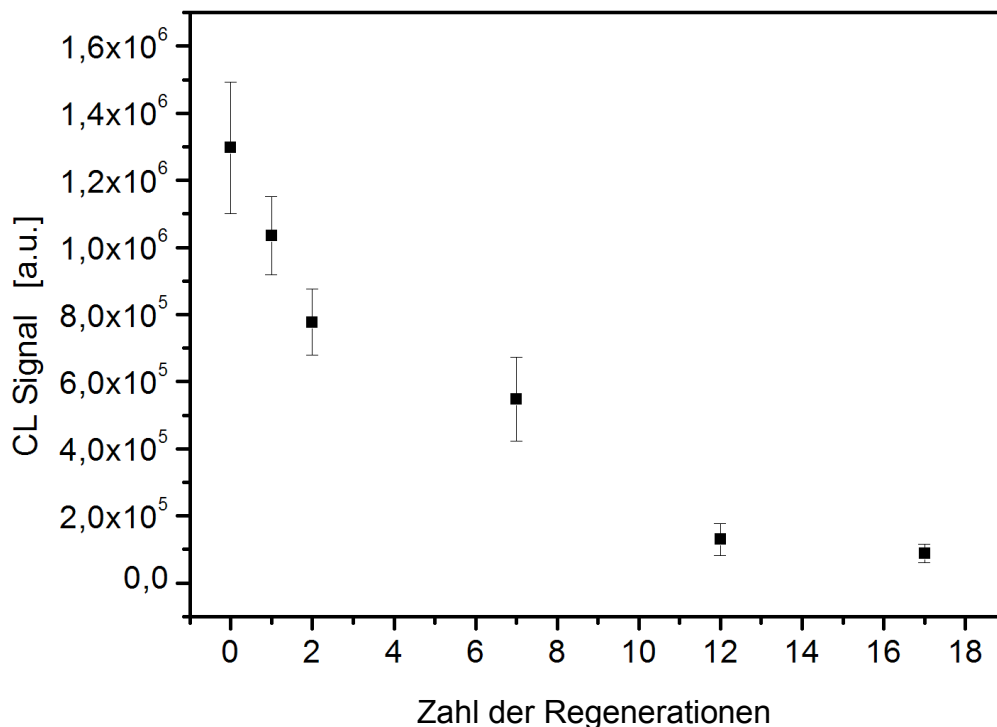


Abb. 20: Aufschmelzen von doppelsträngiger *R. planticola* (Gen: 16S rRNA) DNA, um die Regenerierbarkeit zu testen (die Sonde wurde mit einer Konzentration von 10 mg/mL in Wasser auf einer Diamino-PEG-Oberfläche gespottet). Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10⁻³ mg/mL eingesetzt (n = 6, m = 6).

3. Ergebnisse und Diskussion

Bei einer weiteren Verfeinerung des Regenerationsprozesses mittels Temperaturerhöhung lässt sich das Prinzip in den MCR3 integrieren. Dort ist eine Heizung mit integrierten Peltierelementen bereits verwirklicht. Die Temperatur sollte dabei in der Flusszelle 95 °C erreichen, wie es auch bei einer PCR eingesetzt wird. Allerdings sollte die Temperatur auch nicht viel höher liegen, da sonst der Puffer in der Flusszelle verdampft und den Mikroarrayglaschip zerstört.

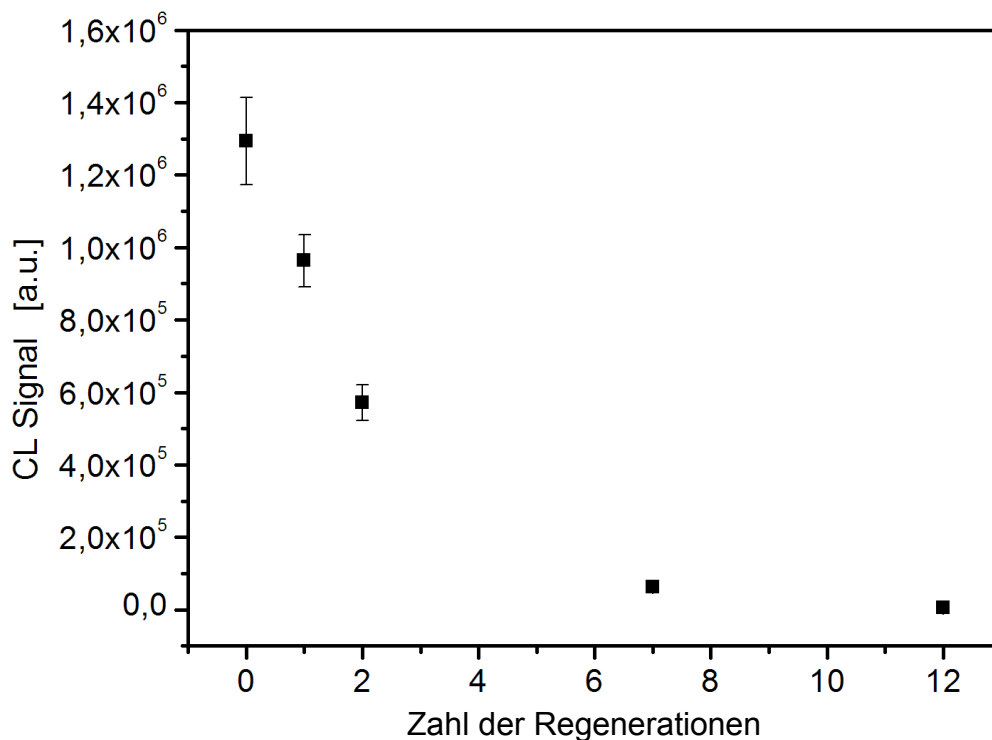


Abb. 21: Alkalische Regeneration von *R. planticola* (Gen: 16S rRNA) DNA-Doppelsträngen (10 mg/mL in Wasser auf einer Diamino-PEG-Oberfläche). Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10⁻³ mg/mL eingesetzt (n = 5, m = 6).

Als nächste Option wurde eine Erhöhung des pH-Wertes getestet. Zur Anwendung kam ein alkalischer Puffer mit Natriumhydroxid (pH 13), der mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat versetzt war. Der alkalische Puffer sorgte für eine Regeneration der Mikroarrayoberfläche. Das Signal ging auf 6 % des Ausgangssignals vor der Regeneration zurück. Allerdings war der Puffer für die Oberflächenchemie zu aggressiv. Er beschädigte die Oberfläche des Mikroarrays stärker als das Aufheizen.

Nach 12 Regenerationen war kein Signal mehr vorhanden (Abb. 21). Das Endsignal betrug noch 0,15 % des Anfangssignals.

Die saure Regeneration trennte die DNA-Doppelstränge des Mikroarrays ebenfalls auf. Das Signal ging auf 7 % des Ausgangssignals vor der Regeneration zurück. Es wurde eine Kochsalzlösung (100 mM) mit Glycin (100 mM) versetzt, der pH-Wert mit Salzsäure auf 3 eingestellt und die Lösung als Regenerationspuffer verwendet. Allerdings war es mit einer Konzentration von 10 mg/mL der Sonden-DNA nicht möglich, das Signal über 22 Regenerationen zu stabilisieren. Das bedeutet, dass durch die hohe Konzentration an DNA (10 mg/mL) sehr viele DNA-Sonden auf den Mikroarray aufgebracht wurden, davon aber nur wenige Sonden kovalent an die Mikroarrayoberfläche gebunden haben. Diese ungebundenen DNA-Sonden waren aber auch nach 22 Regenerationen noch nicht vollständig von der Oberfläche abgewaschen. Zu erkennen ist dies in Tabelle 15. Das Chemilumineszenz-Summensignal war nach 22 Regenerationen für 10 mg/mL DNA-Sondenkonzentration in der gleichen Größenordnung, wie das Anfangssignal bei 1 mg/mL DNA-Sondenkonzentration.

Tabelle 15: Vergleich der sauren Regeneration bei 1 mg/mL und 10 mg/mL DNA-Sondenkonzentration.

Zahl der Regenerationen	1 mg/mL DNA-Sonde CL-Summensignal [a.u.]	10 mg/mL DNA-Sonde CL-Summensignal [a.u.]
0	$1,5 \times 10^5$ (SD: 13 %)	$4,0 \times 10^5$ (SD: 5 %)
22	$1,0 \times 10^5$ (SD: 12 %)	$1,5 \times 10^5$ (SD: 9 %)

Nur durch eine Verringerung der DNA-Konzentration auf 1 mg/mL im Mikrodosierpuffer wurde ein konstantes Signal erreicht. Es wurden dadurch weniger

3. Ergebnisse und Diskussion

Sonden aufgebracht. Die nicht kovalent gebundenen Sonden wurden recht zügig abgewaschen. Am Beginn des Experimentes fiel das Signal auf 2/3 des Ausgangssignals, stabilisierte sich auf diesem Niveau aber nach zwei Regenerationszyklen. Danach blieb das absolute Signal stabil bis Zyklus 22 (Abb. 22). Dies wurde durch einen linearen Fit überprüft, wird hier aber nicht gezeigt.

In Abb. 22 und Tabelle 16 ist zu erkennen, dass eine hohe Standardabweichung nach wie vor ein Problem für die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit ist. Der Regenerationspuffer, ähnlich wie die anderen Reaktionschemikalien, scheint nicht gleichmäßig in der Flusszelle verteilt zu sein, was dann zu unterschiedlichen Inkubationszeiten je Spot führte. Eine weitere Erklärung ist die ungleichmäßige Belegung der Spots mit DNA-Sonden.

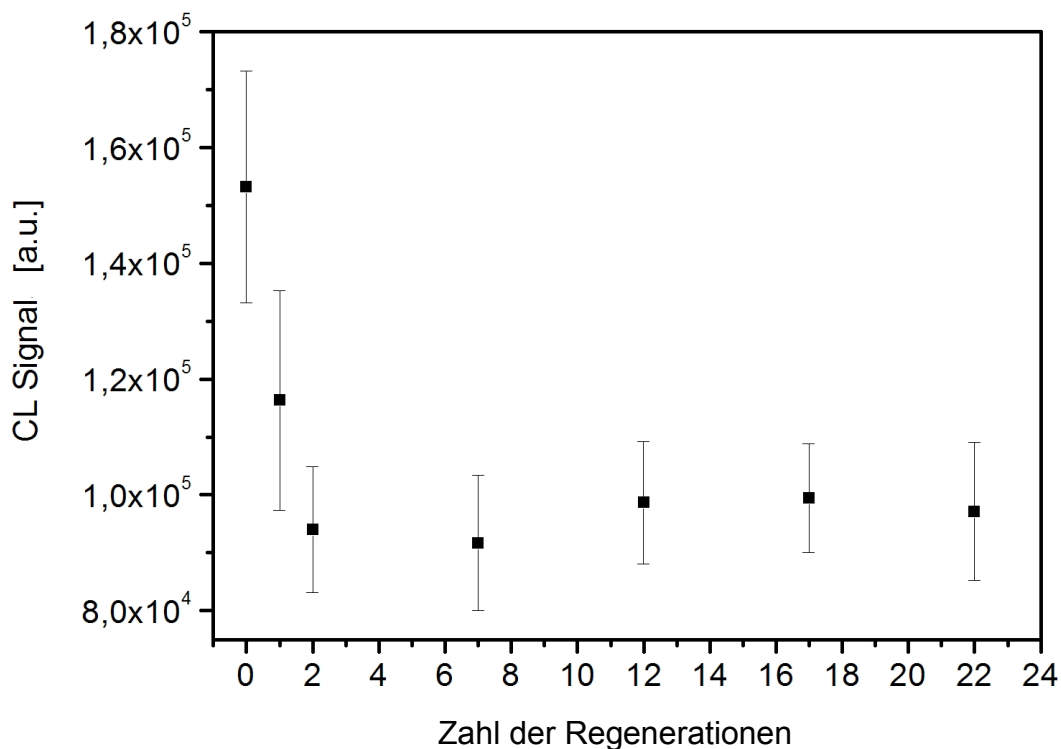


Abb. 22: Saure Regeneration von *R. planticola* (Gen: 16S rRNA) DNA-Doppelsträngen (1 mg/mL in Wasser auf einer Diamino-PEG-Oberfläche). Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10^{-3} mg/mL eingesetzt ($n = 7$, $m = 6$).

Tabelle 16: Reproduzierbarkeit von Regenerationsversuchen mit DNA-Mikroarrays und der sauren Regenerationsmethode (Vergleiche Abb. 22).

Zahl der Regenerationen	CL-Summensignal Mittelwert [a.u.]	Standardabweichung [%]
0	$1,5 \times 10^5$	13
1	$1,1 \times 10^5$	16
2	$0,9 \times 10^5$	12
7	$0,9 \times 10^5$	13
12	$1,0 \times 10^5$	11
17	$1,0 \times 10^5$	9
22	$1,0 \times 10^5$	12

3.1.3 Verbesserung der Regenerierbarkeit

Ziel der Regenerationsversuche war es, einen regenerierbaren DNA-Mikroarray mit einem sehr guten Signal-Rauschverhältnis zu entwickeln. Für ein hohes Signal reichte eine DNA-Sondenkonzentration von 1 mg/mL im Mikrodosierpuffer nicht aus. Alle Messungen ab Kapitel 3.2 wurden ausschließlich mit einer Konzentration von 10 mg/mL Sonden-DNA im Mikrodosierpuffer durchgeführt. 10 mg/mL ergaben ein deutlich höheres Ausgangssignal (Tabelle 15), erreichten aber auch nach 22 Regenerationen noch kein stabiles Endsignal. Die Annahme war, dass die DNA-Sonden zwar in hoher Menge auf den Glaschip aufgebracht, aber dann nicht kovalent gebunden und während der Regeneration abgewaschen wurden. Es sollte also die Zeit für die Anbindereaktion verlängert werden. Die Anbindereaktion stoppte durch die Austrocknung des Spots recht schnell. Das Lagern in Wasser bewirkte eine Nachreaktion. Es wurden verschieden lange Zeiträume für diese Lagerung getestet (Tabelle 17). Eine weitere Möglichkeit die Anbindung zu verbessern ist, die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Temperaturerhöhung ($\Delta T = 10$ K, dann erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit um das 2- bis 4-Fache, vgl. RGT-Regel) (Holleman et al., 1995; Jung et al., 2001).

3. Ergebnisse und Diskussion

Abb. 23 zeigt im Vergleich zu den Ergebnissen aus Abb. 22 eine deutlich verbesserte Signalstabilität bei Regenerationsversuchen. Das maximale Signal-Rausch-Verhältnis lag bei 931 (SD: 2 %). Zwischen der ersten und zweiten Regeneration hatte sich das Signal stark verringert. Allerdings war das Signal nach der zweiten Regeneration bis zur Regeneration 17 stabil (Abb. 23). In den ersten Regenerationszyklen wurden vermutlich die nicht kovalent gebundenen Sonden abgewaschen und nur die kovalent gebundenen Sonden blieben bis Regenerationszyklus 17 auf dem Glasträger zurück.

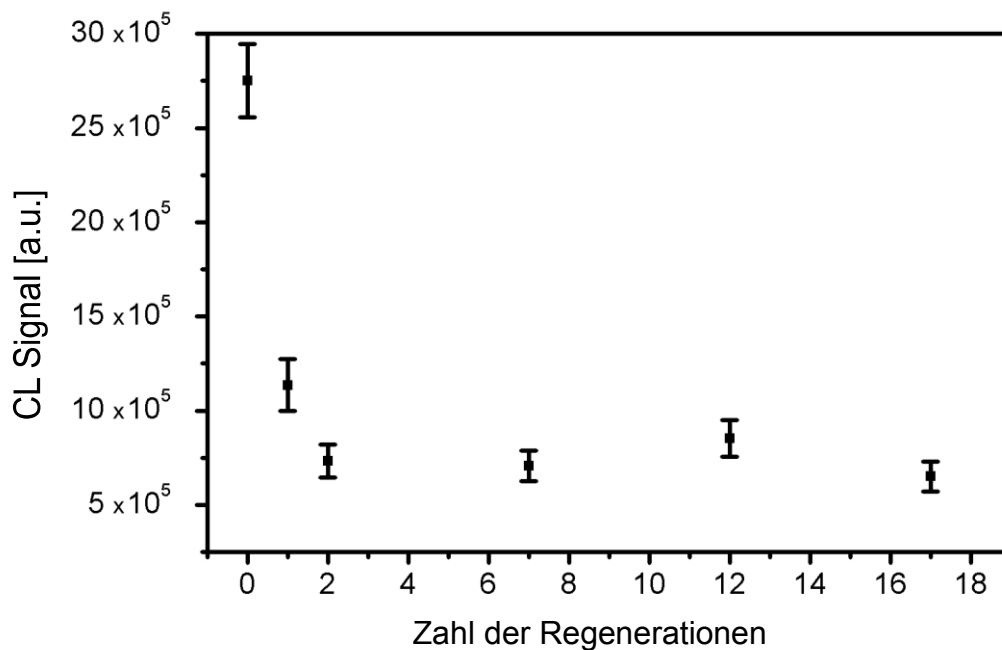


Abb. 23: Signalstabilität von *R. planticola* (Gen: 16S rRNA) DNA-Doppelsträngen auf einer Diamino-PEG-Oberfläche während saurer Regenerationen. Der Mikroarray wurde 17 Mal regeneriert. Die *R. planticola* DNA-Sonden wurden mit einer Konzentration von 10 mg/mL in Wasser auf den Mikroarray aufgetragen. Nach dem Mikrodosiervorgang wurde der Mikroarray bei 4 °C für einen Tag in Wasser gelagert. Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10⁻³ mg/mL eingesetzt (n = 6, m = 6).

In Tabelle 17 ist ein klares Optimum bei einer Lagerung von einem Tag in Wasser zu erkennen. Sowohl das Anfangssignal ist mit 27,5 x 10⁵ a.u. (SD 7 %) am höchsten,

aber auch nach 17 Regenerationen ist das Signal mit $6,5 \times 10^5$ a.u. (SD 12 %) am höchsten. Offensichtlich sorgte diese Lagerung für eine verbesserte Anbindung der *R. planticola* Sonden, sowie eine verbesserte sterische Zugänglichkeit, da auch das Anfangssignal erhöht war.

Tabelle 17: Signalveränderung durch Lagerung des *R. planticola*-Mikroarrays in Wasser bei 4 °C.

Lagerbedingungen	Zahl der Regenerationen	CL-Summensignal Mittelwert [a.u.]	Standardabweichung [%]
ohne Wasser	0	1×10^5	6
	17	$0,1 \times 10^5$	9
1 Tag in Wasser	0	$27,5 \times 10^5$	7
	17	$6,5 \times 10^5$	12
3 Tage in Wasser	0	$13,6 \times 10^5$	3
	17	$1,4 \times 10^5$	8
6 Tage in Wasser	0	$12,3 \times 10^5$	4
	17	1×10^5	5

3.1.4 Diskussion

Es wurden eine Oberflächenchemie und eine passende Regenerationsmethode entwickelt, die eine Wiederverwendung des Chips für bis zu 20 Messungen erlauben. Die Diamino-PEG-Oberflächenchemie war stabil und mit einem sauren Puffer regenerierbar.

3.2 Quantifizierung von synthetischen Oligonukleotiden

Der im vorhergehenden Kapitel optimierte Assay mit synthetischen Oligonukleotiden wurde auch in diesem Kapitel verwendet. In Kapitel 3.1 wurden der passende Mikrodosierpuffer, eine passende PEG-Oberfläche und eine passende Regenerationsmethode evaluiert. In diesem Kapitel erfolgte mit der Quantifizierung synthetischer Oligonukleotide der nächste Schritt.

3.2.1 Der Nachweis von DNA auf einem DNA-Mikroarraysystem

Für die Quantifizierung von DNA wurde ein CL-Hybridisierungs-Assay auf einer DNA-Mikroarrayoberfläche durchgeführt. Die Ziel-DNA-Sequenz muss dabei mit Biotin markiert sein. Dies passiert bei synthetischen Oligonukleotiden während der chemischen Synthese der eingesetzten Anti-Strand Oligonukleotide. Die Ziel-DNA wurde von einer spezifischen DNA-Sonde eingefangen. Diese Sonde wurde durch eine kovalente Bindung an die mit PEG-modifizierte Glasoberfläche des Objektträgers fixiert. Die Wechselwirkung zwischen der Ziel-DNA und der DNA-Sonde sorgte für die Spezifität des Assays. Alle Schritte des Assays, die Zugabe der mit Biotin markierten Einzelstrang-DNA (Abb. 24, 1) ebenso eingeschlossen, wie die Zugabe der mit Streptavidin markierten Meerrettichperoxidase (Abb. 24, 2) und der CL-Substrate (Abb. 24, 3), wurden auf einem Durchfluss-CL-Auslesegerät durchgeführt.

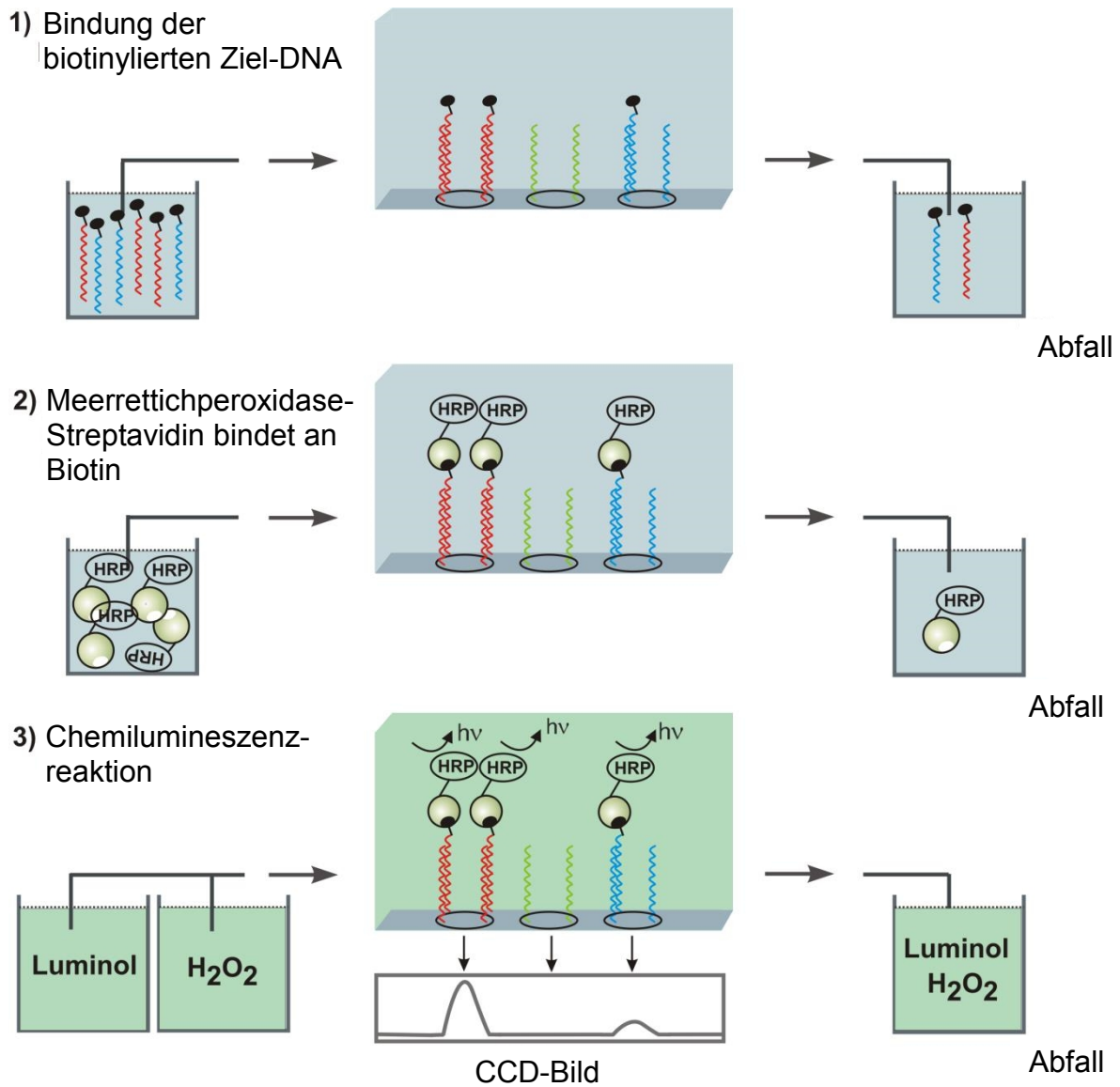


Abb. 24: Schema des Assayprinzips. Drei verschiedene Gene werden auf einem DNA-Mikroarray mittels Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen.

3. Ergebnisse und Diskussion

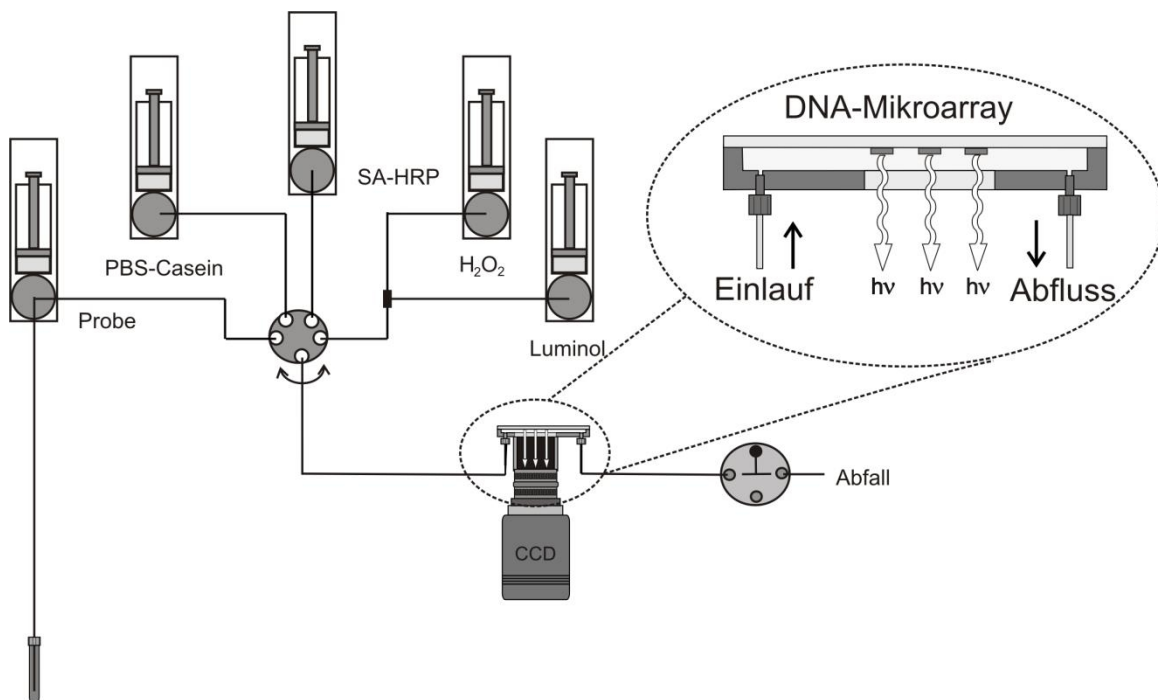


Abb. 25: Fluidikschema zum Nachweis biotinylierter, einzelsträngiger DNA.

Die Analyt-DNA wurde nur einmal über den Mikroarray gespült (Abb. 25). 600 μL wurden in Portionen zu je 20 μL auf den Mikroarray geleitet, wobei zwischen den Einheiten immer 20 Sekunden pausiert wurde (*stopped-flow*-Prinzip). Es wurde das folgende Protokoll verwendet:

600 μL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Messprobe (je 20 μL mit einer Inkubationspause von 20 Sekunden)

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Waschpuffer

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ SA-HRP-Lösung

4 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Waschpuffer

je 1 x 600 μL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Luminol und H_2O_2

90 Sekunden Aufnahme des Chemilumineszenzsignals

3.2.2 Kalibrierung des DNA-Mikroarrays mit synthetischen Oligonukleotiden

Die maximal erreichbare Sensitivität der CL-Oberflächenchemie zeigte sich im folgenden Experiment: eine Sequenz des *R. planticola* Gens 16S rRNA wurde als Sonde auf der Oberfläche und ein 25mer-Einzelstrang in antisense-Konfiguration als Analyt eingesetzt. Dieser Assay hatte eine Nachweisgrenze von 40 Kopien/mL, was 10 fmol entsprachen. Der Assay dauerte 15 Minuten und hatte eine analytische Spannweite zwischen 10^6 und 10^{16} Kopien/mL (Abb. 26). Das maximale Signal-Rausch-Verhältnis war 225:1. Bemerkenswert sind an dieser Stelle die große analytische Spannweite von 10 Dekaden und die sehr kurze Assayzeit. Normalerweise haben Hybridisierungsassays eine Inkubationszeit von mehreren Stunden.

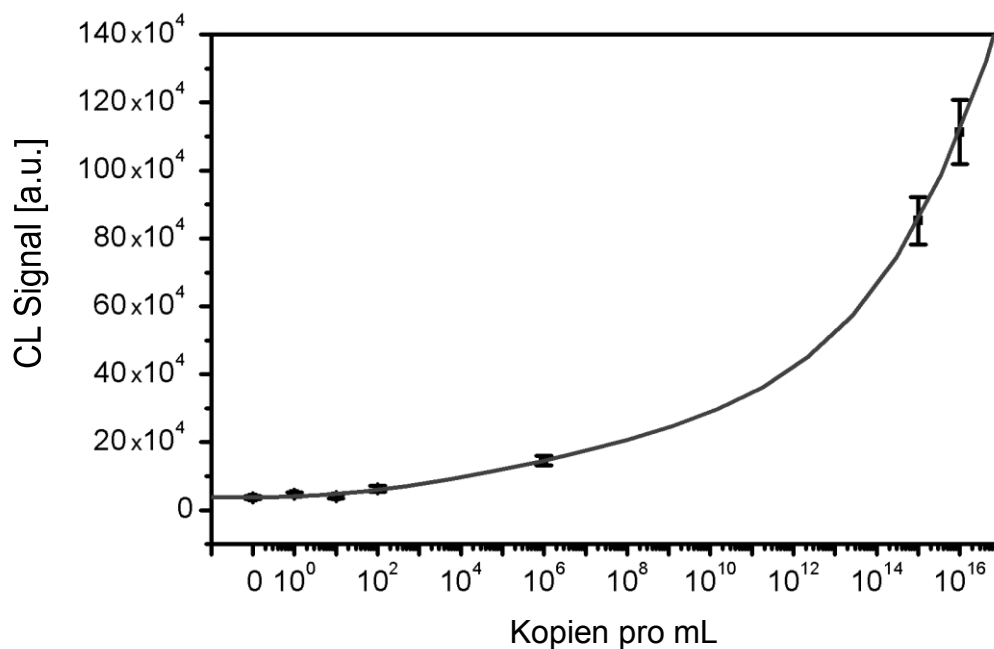


Abb. 26: Kalibrierkurve für das Gen 16S rRNA von *R. planticola* ($n = 7$, $m = 6$).

3.2.3 Diskussion

Mit einer 25mer-DNA lässt sich in einem Hybridisierungssassay deshalb eine kurze Assayzeit und eine niedrige Nachweisgrenze erreichen, da die Kürze der DNA-Stücke eine schnelle Diffusion ermöglicht. Durch die hohe Diffusionsgeschwindigkeit erreicht die Hybridisierung schnell die Gleichgewichtsphase, wodurch sich ein sensitiver Nachweis ergibt.

Die Nachweisgrenze liegt wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben bei 10 fmol. In Tabelle 18 findet sich zum Vergleich eine Liste mit quantitativen CL-DNA-Mikroarrays aus der Literatur.

Tabelle 18: Übersicht zu CL-DNA-Mikroarrays.

Nachweisgrenze	Stranglänge	Assay-Prinzip	Testzeit	Literatur
0,5 nM	15/16 nt	<i>on-chip</i> PCR + Hybridisation, Biotinmarker + SA-HRP	< 1h	(Hatakeyama et al., 2009)
80 pmol/L	25 nt	PCR, Biotinmarker + SA-HRP	30 min	(Mirasoli et al., 2013b)
10 nM	24 nt	PCR/LDR, SA-Nanopartikel, ZIP-Code, CY5 + CL	1 h	(Homomatsu et al., 2013)
0,26 fM	29 nt	<i>ligation mediated rolling circle, DNAzyme</i> (HRP mimic)	4-5 h	(Dong et al., 2013)
250 aM	23 nt	<i>Microchannel array</i>	3 h	(Cheek et al., 2001)

3.3 Gegenüberstellung der Amplifikationsmethoden

Im bisherigen Verlauf dieser Arbeit konnte eine regenerierbare Mikroarray-Oberfläche entwickelt werden. Daran schloss sich eine erste Quantifizierung mit antisense-Oligonukleotiden an. Um nun Bakterien im Trinkwasser nachzuweisen, war eine geeignete Amplifikationsmethode zu wählen. Hierzu wurde eine vergleichende Studie mit verschiedenen Amplifikationsmethoden durchgeführt. Die Einsetzbarkeit der untersuchten Methoden für einen quantitativen Nachweis von DNA auf einem DNA-Mikroarray wurde beurteilt. Zwei unspezifische Amplifikationsmethoden, die *Multiple Displacement Amplification* und die *GenomePlex Whole Genome Amplification*, wurden bewertet, aber auch spezifische Amplifikationsmethoden wie die Endpunkt-PCR und die neue Stopped-PCR konnten in den Vergleich einbezogen werden.

Der große Vorteil der unspezifischen Amplifikationsmethoden ist ihre Fähigkeit, das gesamte Genom sequenzunabhängig zu amplifizieren. Die *Multiple Displacement Amplification* benötigt während der Amplifikation auch kein *Thermocycling* vergleichbar der PCR. MDA lässt sich deshalb einfacher automatisieren, da keine aufwendige Heiz- und Kühlsteuerung notwendig ist.

3.3.1 Arbeitsablauf

Die genomische DNA wurde zunächst aus *E. coli*-Zellen mit Hilfe eines Aufreinigungskits extrahiert und anschließend auf verschiedenen Wegen amplifiziert (Abb. 27). Für die Quantifizierung der Amplifikationscharakteristiken dieser Methoden wurde die Realtime-PCR eingesetzt.

Um die verschiedenen Amplifikationsmethoden in einer quantitativen Realtime-PCR-Analyse vergleichen zu können, musste die amplifizierte DNA im Verhältnis 1:10.000 verdünnt werden, da das Signal sonst zu hoch wurde und außerhalb des messbaren Bereichs der PCR lag (Abb. 28).

3. Ergebnisse und Diskussion

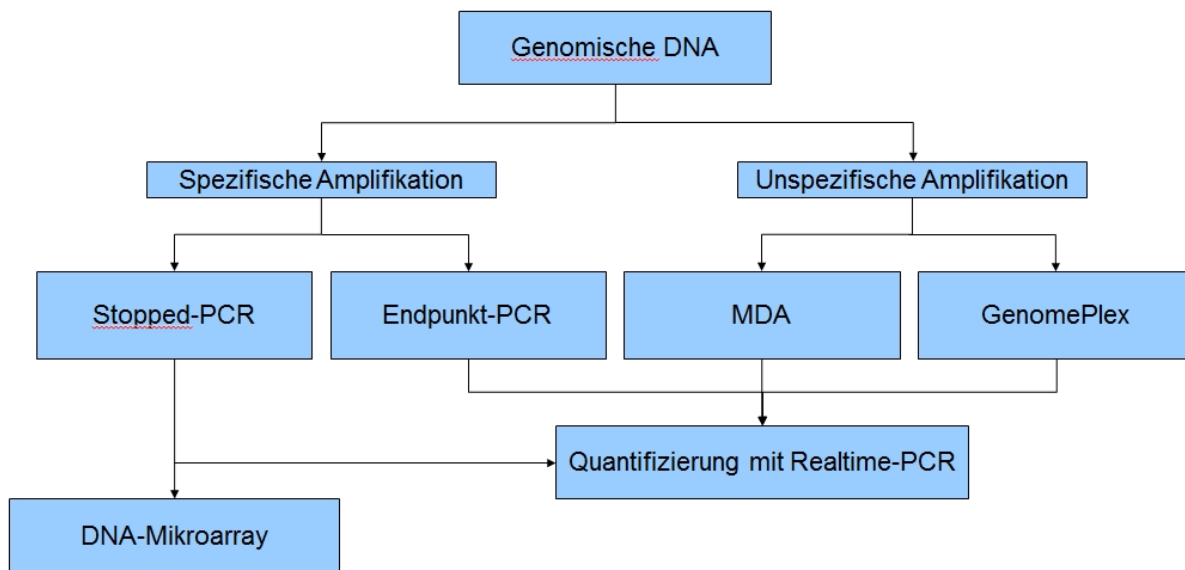


Abb. 27: Übersicht der eingesetzten Methoden zur Amplifikation der DNA von *E. coli* und *L. pneumophila*.

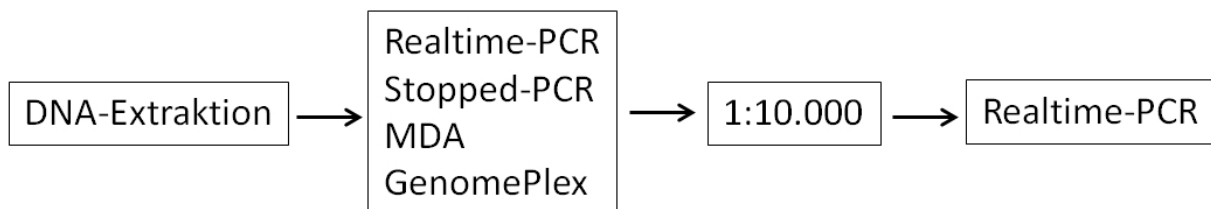


Abb. 28: 1:10.000 Verdünnung als Vorbereitung für eine Quantifizierung mit Realtime-PCR.

Mikroarrays bieten die Möglichkeit, eine große Anzahl von Analyten gleichzeitig zu bestimmen. Im Bereich der DNA-Analyse sind die Mikroarrays jedoch nicht ausreichend sensitiv und benötigen deshalb eine vorhergehende Amplifikation der DNA.

Das Ziel der folgenden Experimente war es, die Anforderungen an eine solche Amplifikationsmethode zu definieren und auch zu testen, ob die jeweilige Methode im Rahmen einer automatisierten DNA-Mikroarrayanalyse verwendet werden kann. Sechs Charakteristika standen dabei im Mittelpunkt:

- Die Stärke der Amplifikation (Amplifikationsfaktor).
- Der Amplifikationsfaktor ist über mehrere Dekaden an Ausgangsmaterial stabil.
- Die Gesamtzeit für den Assay.
- Die Möglichkeit einer späteren Automatisierbarkeit.
- Multiplexfähigkeit zum Einsatz im Mikroarray.
- Design der Primer.

3.3.2 Multiple Displacement Amplification

Die MDA ist eine isothermale Amplifikationsmethode. Die genomischen DNA-Stränge wurden vor der Amplifikation denaturiert, anschließend konnten sich kurze Hexamerprimer über das gesamte Genom verteilt anlagern. An diesen Primern begann die Polymerase mit der Amplifikation. Erreichte die Polymerase im Verlauf der Amplifikation einen bereits angelagerten Hexamerprimer, so wurde dieser und die ab seiner Position bereits amplifizierte DNA verdrängt. Die Amplifikation fand bei einer konstanten Temperatur statt.

Bei der MDA besteht eine lineare Korrelation zwischen der Ausgangskonzentration und der Endkonzentration an DNA nach der Amplifikation (Abb. 29). Dies wurde durch einen linearen Fit überprüft, wird hier aber nicht gezeigt. Diese Korrelation war allerdings nur im Bereich einer eingesetzten Konzentration zwischen $2,1 \times 10^5$ bis $2,1 \times 10^7$ Kopien/mL linear. Bei höheren Konzentrationen war die Amplifikation nahezu konstant, also nicht direkt abhängig von der Ausgangskonzentration.

Der Reaktionskit ist laut Hersteller für Konzentrationen $> 2,1 \times 10^8$ Kopien/mL optimiert. $2,1 \times 10^5$ Kopien/mL lag am unteren Ende. Da diese Korrelation am unteren Ende der Ausgangskonzentrationen lag, ist diese Methode zwar sensitiv, bei höheren Konzentrationen aber nur begrenzt verwendbar und somit unflexibel. Weitere Nachteile sind die in der Amplifikation entstehenden langen DNA-Produkte (2 - 100 kb), die zu hohen Diffusionszeiten auf dem DNA-Mikroarray führen können, sowie die fehlende Möglichkeit markierte Primer im Assay zu verwenden, da der Assay auf standardisierten Reagenzien aufbaute. Die Markierungsprobleme lassen sich nur durch einen eigens gefertigten Reaktionskit umgehen, der per Hand

3. Ergebnisse und Diskussion

angemischt werden muss. Zusätzlich müsste nach der Amplifikation die DNA mit einer DNase oder mit Ultraschall behandelt werden, um die DNA-Stücke für den Mikroarray zu kürzen. Dies führt zu einem erhöhten manuellen Aufwand und erhöht die Gesamtzeit für den Assay. Der Assay erreichte einen Amplifikationsfaktor von $10^2 - 10^4$ und hatte eine Dauer von zwei Stunden. Die Nachweisgrenze lag bei $6,5 \times 10^4$ Kopien/mL.

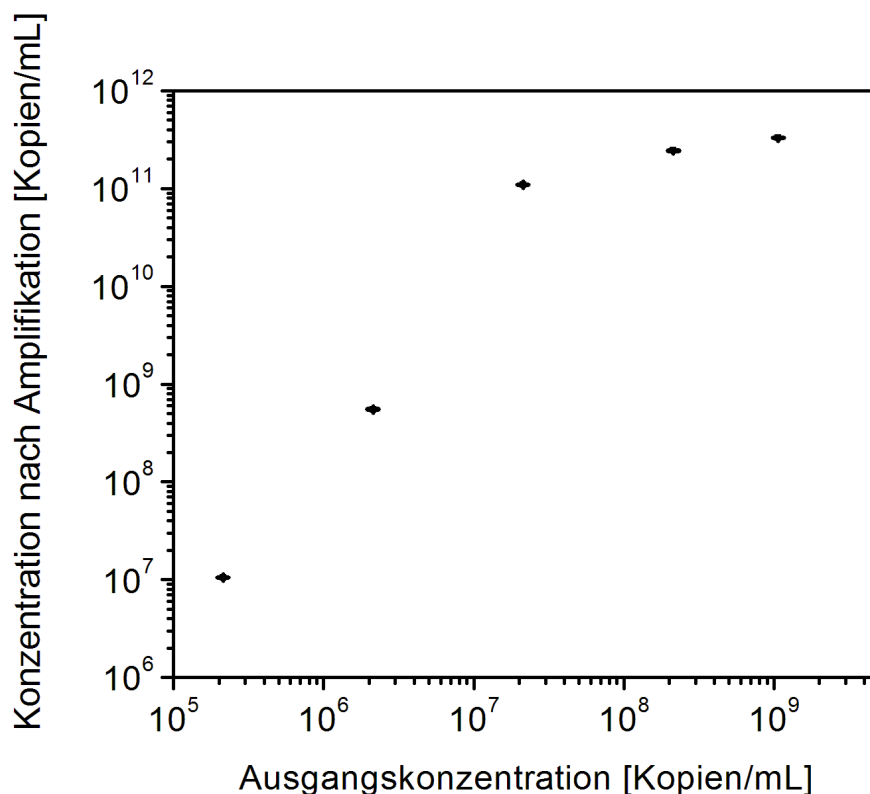


Abb. 29: *Multiple Displacement Amplification* von *E. coli*-DNA, die mit einer Realtime-PCR (Gen: *lacZ*) quantifiziert wurde ($n = 5$, $m = 3$).

Die Nachweisgrenze wurde durch das Kalibrierverfahren bestimmt. Beim Kalibrierverfahren wird die Nachweisgrenze als das 3,3-Fache der Verfahrensstandardabweichung angesehen. Die Verfahrensstandardabweichung ist der Quotient aus der Reststandardabweichung (s_y) und der Steigung der Geraden b (Steigung der Fit-Gerade) in der Nähe der Nachweisgrenze. (Der Hersteller hat den Reaktionskit auf > 10 ng optimiert, 1 - 10 ng sind für den Kit geringe Mengen DNA.)

Die eingesetzte DNA-Menge ist um den Faktor 100 unter den geringen Mengen. Annahme: Nähe zur Nachweisgrenze ist gegeben. 10^5 Kopien/mL Ausgangsmaterial entsprechen 0,01 ng DNA).

Der Vorteil der MDA lag darin, kein *Thermocycling* zu benötigen. Für die Amplifikation wurden konstant 30 °C für 1,5 Stunden genutzt und am Ende wurden 65 °C für drei Minuten zum Beenden der Reaktion verwendet.

3.3.3 GenomePlex Whole Genome Amplification

Die *GenomePlex Whole Genome Amplification* nutzte zuerst einen DNA-Verdau. Die dabei entstandenen kurzen DNA-Stücke wurden an den Enden mit Primern versehen und die kurzen DNA-Stücke wurden schließlich mit Hilfe der Primer in der PCR amplifiziert.

Bei der *GenomePlex Whole Genome Amplification* bestand eine lineare Korrelation zwischen der Ausgangskonzentration und der Endkonzentration an DNA nach der Amplifikation. Diese lineare Korrelation zeigte sich von $2,1 \times 10^5$ bis $2,1 \times 10^9$ Kopien/mL (Abb. 30). Die Korrelation verlief stabil über vier Log-Stufen.

Die Fragmentierung der DNA war sequenzunabhängig, also stochastisch verteilt, immer an unterschiedlichen Stellen der Sequenz. Dies führte zu einer Verteilungskurve der Größe der DNA-Stücke nach dem Verdau. Folglich waren auch die Endprodukte nach der Amplifikation von unterschiedlicher Länge. Dies bedeutet in der Theorie, dass es eine Variation der Diffusionszeiten auf dem Mikroarray gibt, es aber auch eine Variation der sterischen Hinderung der komplementären Stellen zur Anbindung an die Sonden auf der Mikroarrayoberfläche gibt. Wenn die Sequenz sehr nahe an einem Ende des DNA-Stückes liegt, entsteht deutlich weniger sterische Behinderung, als wenn die Sequenz inmitten eines recht langen Stückes liegt. Diese Tatsachen liegen im starken Kontrast zur PCR, bei der die Analyt-DNA reproduzierbar die gleiche Länge und somit Sequenz hat. Zusätzlich lassen sich auch hier Markierungen nur durch ein manuell gemischtes Amplifikationskit einbringen. Zusätzlich benötigte dieser Assay viele händische Schritte. Der Assay

3. Ergebnisse und Diskussion

erreichte einen Amplifikationsfaktor von $1,5 \times 10^3$ und hatte eine Dauer von 2,5 Stunden. Die Nachweisgrenze lag bei $1,8 \times 10^5$ Kopien/mL.

Die Nachweisgrenze wurde durch das Kalibrierverfahren bestimmt. Beim Kalibrierverfahren wird die Nachweisgrenze als das 3,3-Fache der Verfahrensstandardabweichung angesehen. Die Verfahrensstandardabweichung ist der Quotient aus der Reststandardabweichung (s_y) und der Steigung der Geraden b (Steigung der Fit-Gerade) in der Nähe der Nachweisgrenze. (Der Hersteller hat den Reaktionskit auf > 10 ng optimiert, 1 - 10 ng sind für den Kit geringe Mengen DNA. Die eingesetzte DNA-Menge ist um den Faktor 100 unter den geringen Mengen. Annahme: Nähe zur Nachweisgrenze ist gegeben. 10^5 Kopien/mL Ausgangsmaterial entsprechen 0,01 ng DNA).

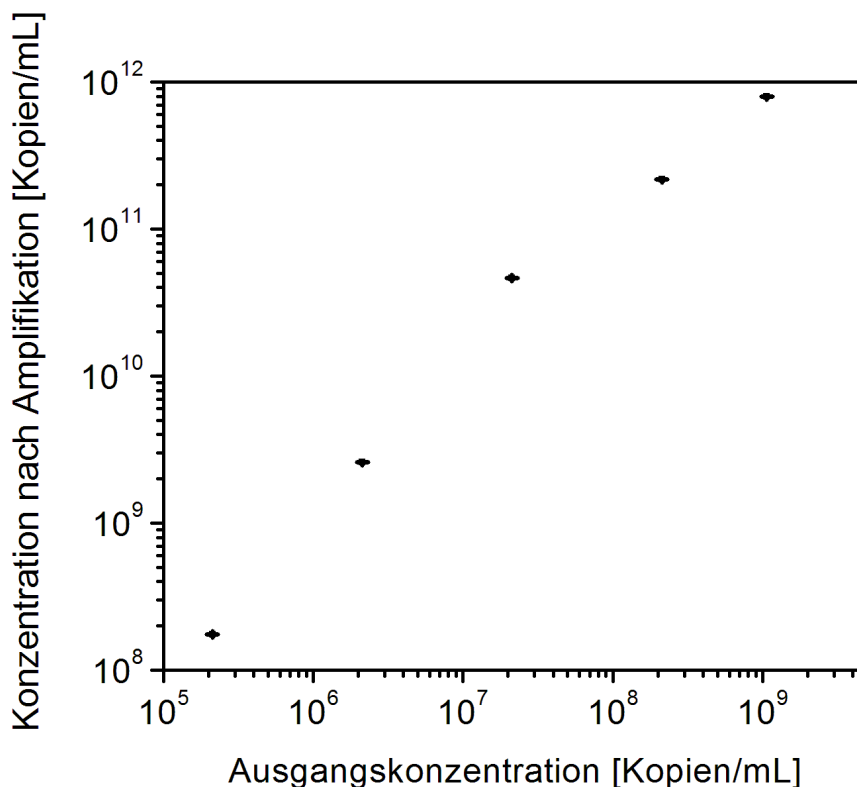


Abb. 30: GenomePlex Whole Genome Amplification von *E. coli*-DNA, die mit einer Realtime-PCR (Gen: *lacZ*) quantifiziert wurde (n = 5, m = 3).

3.3.4 Endpunkt-PCR

Die Endpunkt-PCR hat einen großen Nachteil für ihren Einsatz als Amplifikationsmethode für die DNA-Quantifizierung auf DNA-Mikroarrays. Nach der Amplifikation von einer eingesetzten DNA-Konzentration zwischen $2,1 \times 10^5$ und $1,1 \times 10^9$ Zellen/mL (Ausgangskonzentration) ergab sich eine konstante Endkonzentration von $7,7 \times 10^{14}$ Kopien/mL (SD: 20 %) (Abb. 32). Begründet ist dies dadurch, dass die Reaktion stoppt, allerdings nicht durch eine bewusste Unterbrechung des zyklischen Prozesses, sondern dadurch, dass die Reaktion aufgrund eines aufgebrauchten Reaktionspartners (z.B. Nukleotide) stoppt. Jedes PCR-Reaktionsgefäß enthielt die gleiche Menge Reaktionsmix (z.B. Nukleotide, Primer usw.). Der Stopp findet also nur statt, wenn in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an DNA (es war in allen Gefäßen die gleiche Menge Nukleotide verbraucht worden) aus den unterschiedlichen Ausgangsmengen produziert worden ist. Die Ausgangsmenge spielt aufgrund der starken Amplifikation keine Rolle mehr.

Die ideale Amplifikation für eine PCR läuft nach der folgenden Formel:

$$Y = X * 2^n$$

Y: Endmenge; X: Startmenge; n: Zyklusnummer

Normalerweise ist die PCR so eingestellt, dass die Wiederholung des PCR-Zyklus nach 40 - 50 Zyklen stoppt. Unter Verwendung der Formel wäre also ein konstanter Amplifikationsfaktor für alle Proben erwartet worden, unabhängig von der Ausgangsmenge. Stattdessen zeigte sich allerdings die typische sigmoidale Amplifikationskurve mit einer nicht sauber differenzierbaren DNA-Menge am Ende (Abb. 31).

3. Ergebnisse und Diskussion

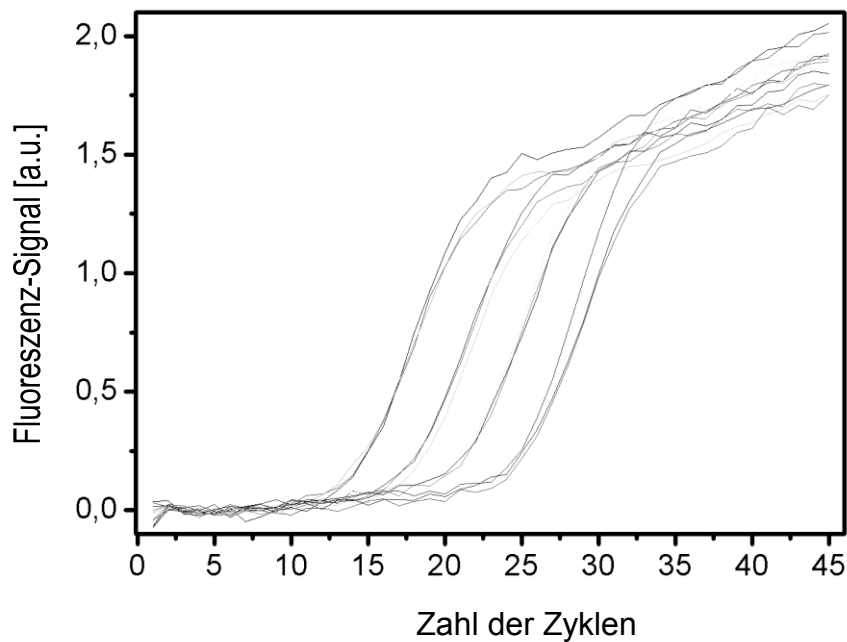


Abb. 31: Beobachtung einer Realtime-PCR-Amplifikation durch ein Fluoreszenzsignal aus einer Hydrolysesonde. Es sind Amplifikationskurven für die Konzentrationen von 10^6 bis 10^9 Kopien/mL der *uidA*-DNA aus *E. coli* dargestellt.

Die Endpunkt-PCR ist deshalb für die Quantifizierung auf einem DNA-Mikroarray nicht anwendbar. Obwohl es sehr einfach wäre die Länge und die Markierungen der Analyt-DNAs für diesen Zweck anzupassen. Der Assay erreichte einen Amplifikationsfaktor von 10^6 bis 10^{10} und hatte eine Dauer von 1,75 Stunden. Die Nachweisgrenze wurde hier nicht bestimmt.

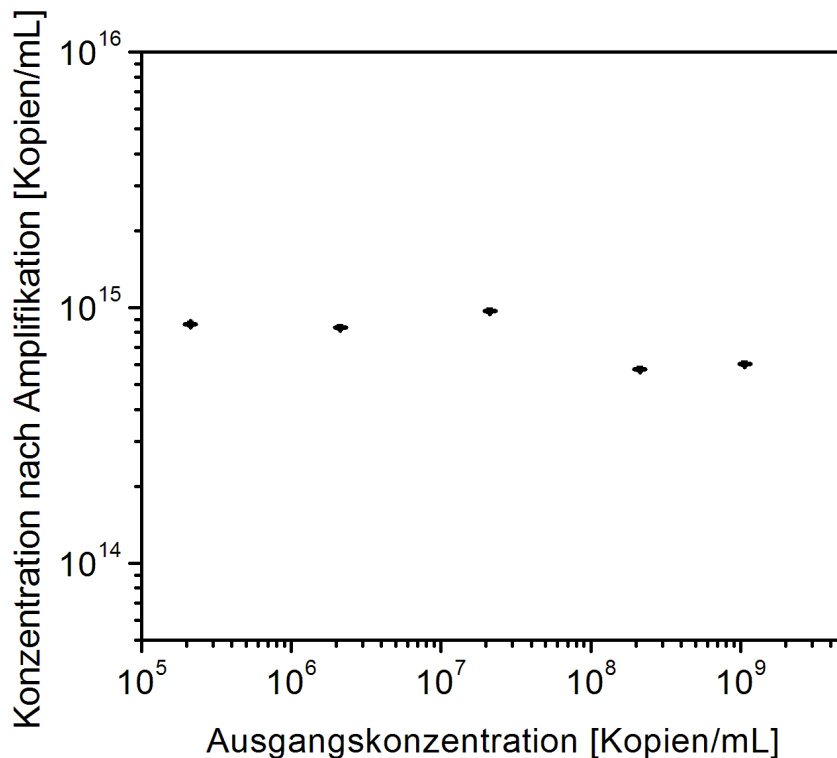


Abb. 32: Realtime-PCR von *E. coli*-DNA (Gen: *lacZ*), die mit einer Realtime-PCR (Gen: *lacZ*) quantifiziert wurde (n = 5, m = 3).

3.3.5 Stopped-PCR

Da die bisher getesteten Amplifikationsmethoden nicht die gewünschten Eigenschaften zeigten, wurde eine neue Methode adaptiert. Es handelt sich um die Stopped-PCR-Methode (Donhauser et al., 2009). Die Amplifikation wurde dabei an einem spezifischen Punkt gestoppt. An diesem Punkt war der Abstand des Signals zwischen den verschiedenen Ausgangsmengen maximal.

Mit der Stopped-PCR konnten die Nachteile beim Quantifizieren mit der Endpunkt-PCR umgangen werden, es konnten trotzdem alle Vorteile der Endpunkt-PCR genutzt werden. Die Stopped-PCR hatte einen linearen Bereich zwischen $2,1 \times 10^6$ und $2,1 \times 10^7$ Kopien/mL, war aber für die Quantifizierung über vier Log-Stufen einsetzbar (Abb. 33). Das beruhte darauf, dass die Amplifikationskurve eine vorhersehbare und reproduzierbare sigmoidale Kurve bildete. Außerdem ist diese

3. Ergebnisse und Diskussion

Methode je nach Stopp-Punkt anpassbar an die vorliegende Mikroorganismen-Konzentration. Wenn der Nachweis besonders sensitiv sein soll, kann die Amplifikation zu einem späteren Zeitpunkt gestoppt werden, oder auch früher. Dies hängt von den verwendeten Voranreicherungsstufen ab, aber auch von dem sich anschließenden Quantifizierungsassay. Die Stopped-PCR erreichte einen Amplifikationsfaktor von 10^4 bis 10^6 und hatte eine Dauer von 1,75 Stunden. Die Nachweisgrenze lag bei $1,2 \times 10^5$ Kopien/mL.

Die Nachteile der Stopped-PCR für die Nutzung in einer automatisierten fluidischen Umgebung waren die Notwendigkeit des Thermocycling und der manuelle Aufwand in der Vorbereitung des Assays.

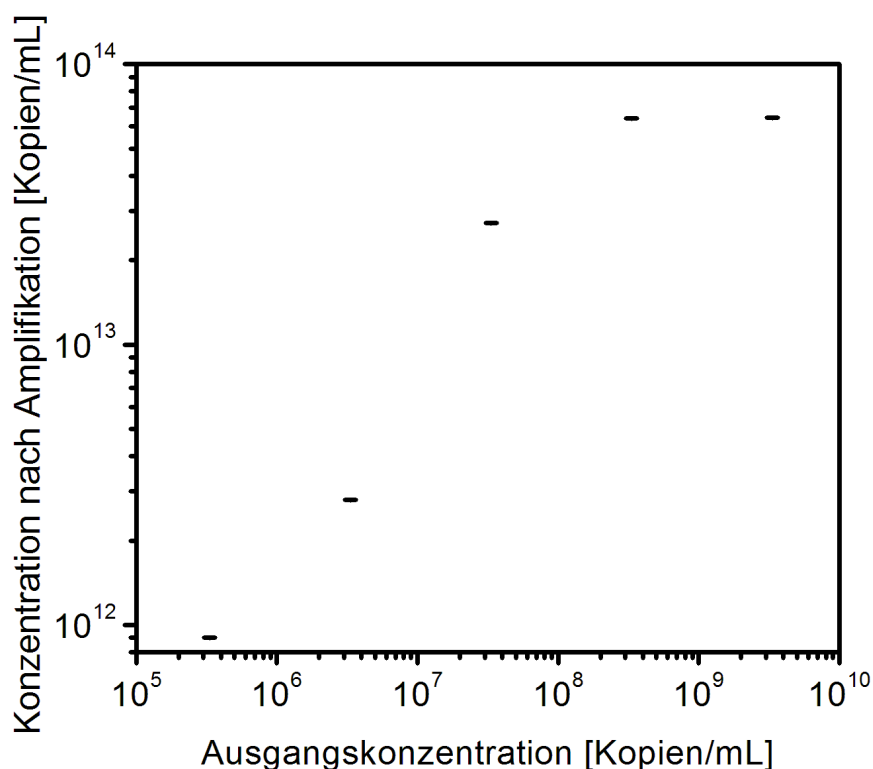


Abb. 33: Stopped-PCR (nach 30 Zyklen gestoppt) von *L. pneumophila*-DNA (Gen: *mip*), die mit einer Realtime-PCR (Gen: *mip*) quantifiziert wurde (n = 5, m = 3).

3.3.6 Diskussion

Kultivierungstechniken sind noch immer der Goldstandard für den Nachweis von Mikroorganismen. Sie sind allerdings recht zeitintensiv (24 - 48 Stunden; bei *Legionella* sind bis zu 10 Tage notwendig). Der erste kritische Parameter war die Gesamtassayzeit. Nur MDA und beide PCR-Methoden brauchten zwischen einer und zwei Stunden (Zeit für die Vorbereitung eingeschlossen). Der *GenomePlex*-Assay benötigte über zwei Stunden.

Der zweite kritische Parameter - die Amplifikationsstärke - zeigte, dass die Endpunkt-PCR den stärksten Amplifikationsfaktor besaß (bis zu 10^{10}). Die *GenomePlex*-Amplifikation war zwar ebenfalls an eine PCR gekoppelt, zeigte aber einen Amplifikationsfaktor von nur $1,5 \times 10^3$. MDA lieferte eine einigermaßen gute Amplifikationsstärke (10^2 bis 10^4), vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es nicht mit einer PCR gekoppelt war. Bei einer weiteren Umsetzung in einem vollautomatisierten Umfeld wäre eine relativ einfache technische Machbarkeit gegeben.

Tabelle 19: Überblick der relevanten Parameter und Zusammenfassung der Ergebnisse.

Eigenschaft	MDA	<i>GenomePlex</i>	Endpunkt-PCR	Stopped-PCR
DNA-Extraktion	Notwendig	Notwendig	Nicht notwendig	Nicht notwendig
Markierte Primer	Nein	Nein	Ja	Ja
Quantifizierung	Ja	Ja	Nein	Ja
Amplifikationsfaktor	10^2 - 10^4	$1,5 \times 10^3$	10^6 - 10^{10}	10^5
Amplifikationsprodukt	Sehr lang	Mittel	Kurz	Kurz
Automatisierung	Ja	Ja, sehr aufwendig	Ja	Ja
Assaydauer	2 Stunden	2,5 Stunden	1,75 Stunden	1,75 Stunden
LOD [Kopien/mL]	$6,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	N/A	$1,2 \times 10^5$

Die Stopped-PCR zeigte jedoch ihre Überlegenheit gegenüber allen anderen Methoden in den Bereichen, die für einen Nachweis mit einem DNA-Mikroarray von Bedeutung waren. Sowohl die benötigte Zeit, als auch die Amplifikationsstärke, sowie die Länge des Amplifikationsproduktes waren für einen DNA-Mikroarray hervorragend geeignet. Darüber hinaus ermöglichte die Stopped-PCR eine Quantifizierung und eine sehr einfache Markierung der verwendeten Primer und somit auch des Amplifikationsproduktes. Tabelle 19 zeigt einen Überblick der betrachteten Parameter.

Es stellte sich nun die Frage, wie sich die gewonnenen Erkenntnisse über die Amplifikationsmethoden mit dem DNA-Mikroarray kombinieren liessen.

3.4 Quantifizierung von PCR-Produkten

3.4.1 Nachweisprinzip

In den ersten Kapiteln wurde eine DNA-Mikroarray-Oberfläche entwickelt und die Sensitivität des DNA-Mikroarrays gezeigt. Danach wurde eine Amplifikationsmethode ausgewählt. Die Stopped-PCR zeigte eine hohe Amplifikation und ermöglichte eine spätere Quantifizierung der DNA auf einem DNA-Mikroarray.

In diesem Kapitel wurde diese DNA-Amplifikation nun mit einem Mikroarray kombiniert. Die entwickelte DNA-Amplifikation nutzte das Prinzip der PCR (Abb. 34a). Diese Reaktion wurde in der logarithmischen Phase gestoppt (Abb. 34b), was zu einer maximalen Aufspaltung der unterschiedlichen Signalkurven führte. Die amplifizierte DNA wurde anschließend auf einem DNA-Mikroarray quantifiziert (Abb. 34c).

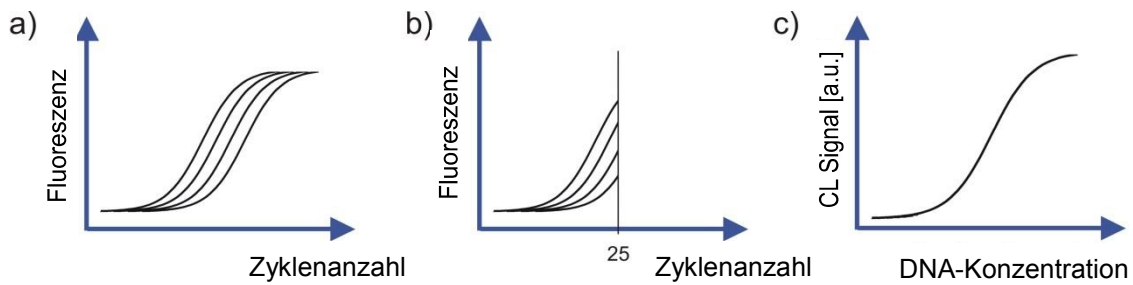


Abb. 34: Schema einer Realtime-PCR (a), Stopped-PCR (b), und die Quantifizierung von Amplikons nach einer Stopped-PCR auf einem DNA-Mikroarray (c).

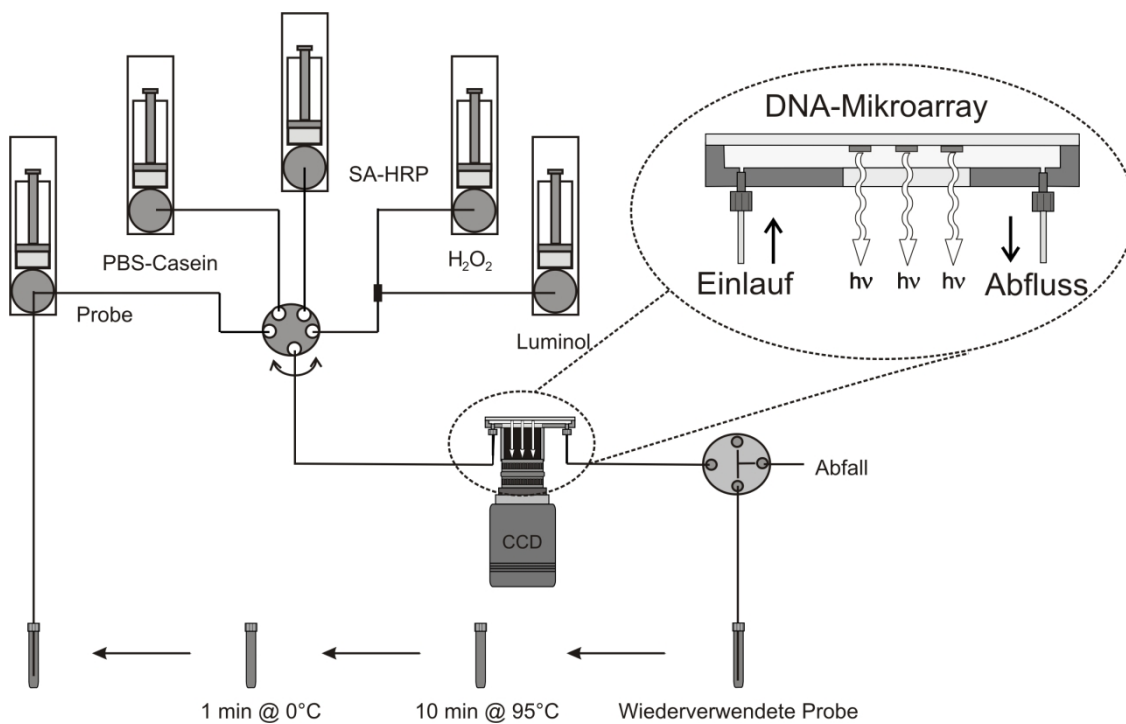


Abb. 35: Fließschema des Durchfluss-CL-Mikroarray-Auslesegeräts.

Die Quantifizierung der amplifizierten DNA erfolgte nach obigem Fluidikschema (Abb. 35). Die DNA wurde bei 95 °C denaturiert, kurz abgekühlt und über den DNA-Mikroarray geleitet. Das eingesetzte Durchfluss-CL-DNA-Mikroarray-Auslesegerät ermöglichte einen semiautomatischen Ablauf des Assays. Das Drehventil musste manuell bedient werden. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

3. Ergebnisse und Diskussion

20 x 500 μL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Messprobe (Die Probe wurde wiederholt über den Mikroarray gepumpt, außerdem wurde das *stopped-flow* Prinzip verwendet: je 20 μL mit einer Inkubationspause von drei Sekunden):

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Waschpuffer

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ SA-HRP-Lösung

4 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Waschpuffer

je 1 x 600 μL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Luminol und H_2O_2

90 Sekunden Aufnahme des Chemilumineszenzsignals

3.4.2 Das Prinzip der Quantifizierung

Im Stopped-PCR-Assay wurde die PCR-Amplifikation im Zyklus 25 unterbrochen (Abb. 34 b). Es muss nicht unbedingt bei Zyklus 25 gestoppt werden. Der Stopp-Zyklus muss nur in der Mitte des gewünschten Arbeitsbereiches liegen. Wird die Amplifikationsreaktion in der logarithmischen Phase abgebrochen, führt dies zu einem maximalen Unterschied im Signal zwischen den verschiedenen Ausgangskonzentrationen (Abb. 34 b). Diese Tatsache erlaubte nun eine Quantifizierung mittels DNA-Mikroarray, nach der PCR-Amplifikation.

Es wurde eine Kalibrierung der PCR-Produkte der Zielsequenz des Gens *uidA* aufgezeichnet. Ausgehend von verschiedenen Kopienzahlen der *uidA* DNA-Sequenz, wurde ein Teil des *uidA* Gens in der PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt denaturiert (Strangaufftrennung) und über den Mikroarray gespült. Nach der PCR-Amplifikation lag die Nachweisgrenze bei $1,1 \times 10^5$ Kopien/mL. Der Arbeitsbereich lag zwischen 10^6 und 10^9 Kopien/mL (Abb. 36). Das maximale Signal-Rausch-Verhältnis lag bei 354:1.

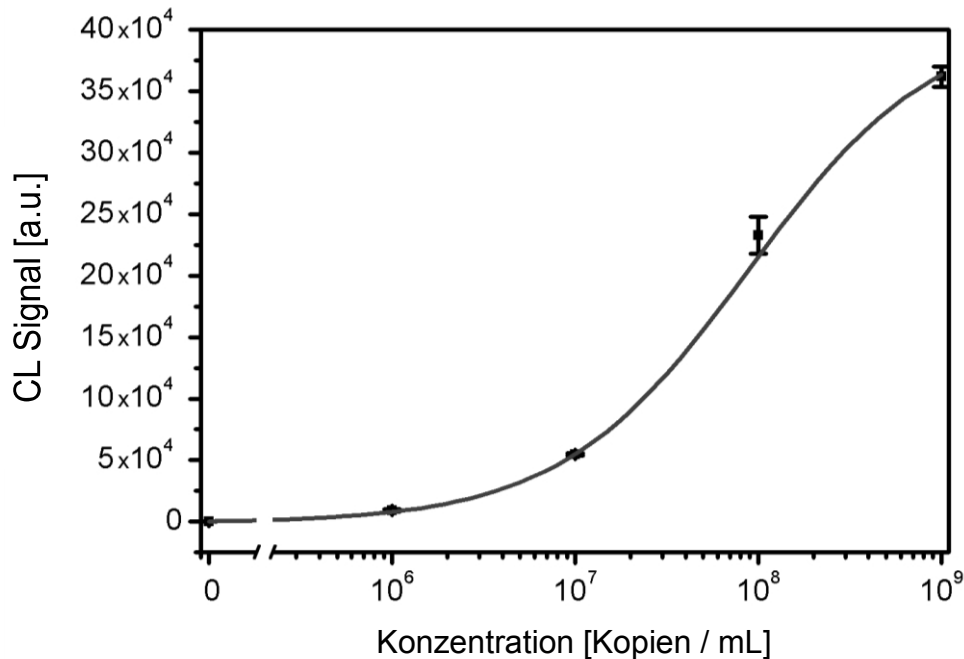


Abb. 36: Kalibrierkurve für *uidA* von *E. coli*. Die DNA wurde in einer Stopped-PCR-Reaktion amplifiziert und auf einem DNA-Mikroarray quantifiziert ($n = 5$, $m = 3$).

3.4.3 Diskussion

In diesem Kapitel wurde eine Methode beschrieben, die eine Amplifikation der Nukleinsäuren mittels PCR und einen Nachweis der DNA auf einem DNA-Mikroarray kombinierte. Die Nachweisgrenze lag bei $1,1 \times 10^5$ Kopien/mL, bei einer Assayzeit von sieben Stunden. Es war also nicht nur ein qualitativer Nachweis möglich, sondern auch ein Quantitativer.

Der CL-DNA-Mikroarray war eine sehr schnelle und empfindliche Methode, wenn einzelsträngige, biotinylierte Oligonukleotide (25mer) als Analyt verwendet wurden. Die Assayzeit betrug dann 15 Minuten und die Nachweisgrenze lag bei 40 Kopien/mL. Diese Fakten bedeuteten, dass die aus der PCR resultierenden doppelsträngigen PCR-Produkte vor dem Einsatz im Hybridisierungs-Assay zu Einzelsträngen aufgetrennt und ein Strang abgetrennt werden sollte.

Als Alternative zur weiter unten verwendeten Strangvereinzelung mittels magnetischer Nanopartikel, könnte auch die asymmetrische PCR genutzt werden

(Lai et al., 2006). Die asymmetrische PCR erzeugt Einzelstränge während der Amplifikation. Die Primer werden nicht in einem Verhältnis von 1:1 dem PCR-Mix beigefügt, sondern ein Primer wird in einem deutlichen Überschuss zugegeben. Dadurch wird ein Strang stärker amplifiziert als sein Gegenstrang. Es entstehen Einzelstränge, die Amplifikation ist aber nicht so hoch wie in einer symmetrischen PCR und wurde deshalb hier nicht getestet (Innis et al., 1988).

3.5 Quantifizierung von pathogenen Bakterien

3.5.1 Weitere Optimierung

Nachdem die Stopped-PCR bereits als geeignet für eine Quantifizierung auf einem DNA-Mikroarray befunden wurde, konnte in diesem Kapitel auf eine weitere Verbesserung des Assays hingearbeitet werden. In diesem Kapitel wurde eine Einzelstrangabtrennung entwickelt, sowie eine Vorgehensweise definiert, um eine Quantifizierung in Zellen pro Milliliter zu ermöglichen.

Der genaue Prozessablauf ist in Abb. 37 beschrieben. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe hitzeinaktivierter Bakterienzellen in Wasser hergestellt. Die Konzentration der Bakterien wurde vor der Hitzeinaktivierung mit Hilfe von Kultivierungsverfahren bestimmt. Ausgehend von der Stammlösung wurde die Verdünnungsreihe in Eppendorfreaktionsgefäßen vorbereitet. Aus dem jeweils erhaltenen Milliliter wurden 9,6 µL für die PCR verwendet. Diese Zelllösung wurde mit der PCR-Mixlösung gemischt und in Form von Triplikaten vervielfältigt. Die Zelllyse wurde dabei direkt vor der PCR im PCR-Gerät durch eine Erhitzung auf 95 °C für 15 Minuten durchgeführt. Die DNA aus den lysierten Zellen wurde direkt ohne weitere Aufreinigung mit der Stopped-PCR-Methode vervielfältigt (Donhauser et al., 2009). Die PCR-Amplifikation wurde an einem definierten Punkt gestoppt, an dem die Konzentration mit einem DNA-Mikroarray bestimmt werden konnte und die zu bestimmende Konzentration in direkter Abhängigkeit zur Ausgangskonzentration

stand. Mit Hilfe der PCR wurden zwei verschiedene Markierungen in die DNA eingebracht. Der Vorwärtsprimer war mit Digoxigenin markiert. Dies diente der Detektion durch eine Chemilumineszenzreaktion, da an Digoxigenin ein Antikörper binden konnte, der mit HRP gekoppelt war. Der Rückwärtsprimer war mit Biotin markiert. Diese Markierung diente dazu, DNA-Einzelstränge zu generieren. Die Biotin-Markierung band hierbei an magnetische Nanopartikel, die mit Streptavidin überzogen waren. Biotin und Streptavidin gehen eine sehr starke Bindung ein. Die Nanopartikel wurden auf einer magnetischen Säule zurückgehalten und der DNA-Doppelstrang durch Hitze (kochender PBS-Puffer) aufgetrennt. Ein Strang floss mit dem Eluat von der Säule, der mit Biotin markierte Strang blieb an den Nanopartikeln gebunden auf der Säule zurück. Das Eluat enthielt nun DNA-Einzelstränge (siehe auch Abb. 37) (Miltényi Biotec (Hrsg.), 2006). Nach einer 30-minütigen Auftrennung wurden die eluierten Einzelstränge direkt in das Durchfluss-CL-DNA-Mikroarray-Auslesegerät eingebracht.

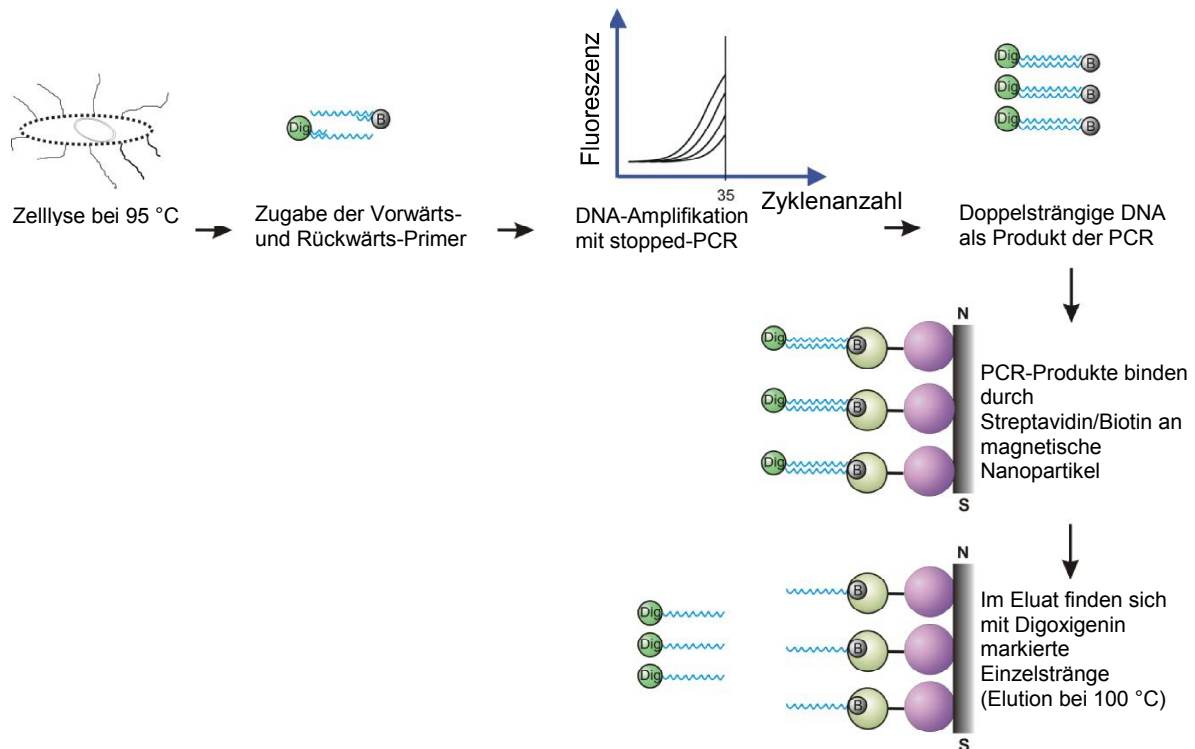


Abb. 37: Ablaufschema von der genomischen DNA bis zu den markierten Einzelsträngen.

3. Ergebnisse und Diskussion

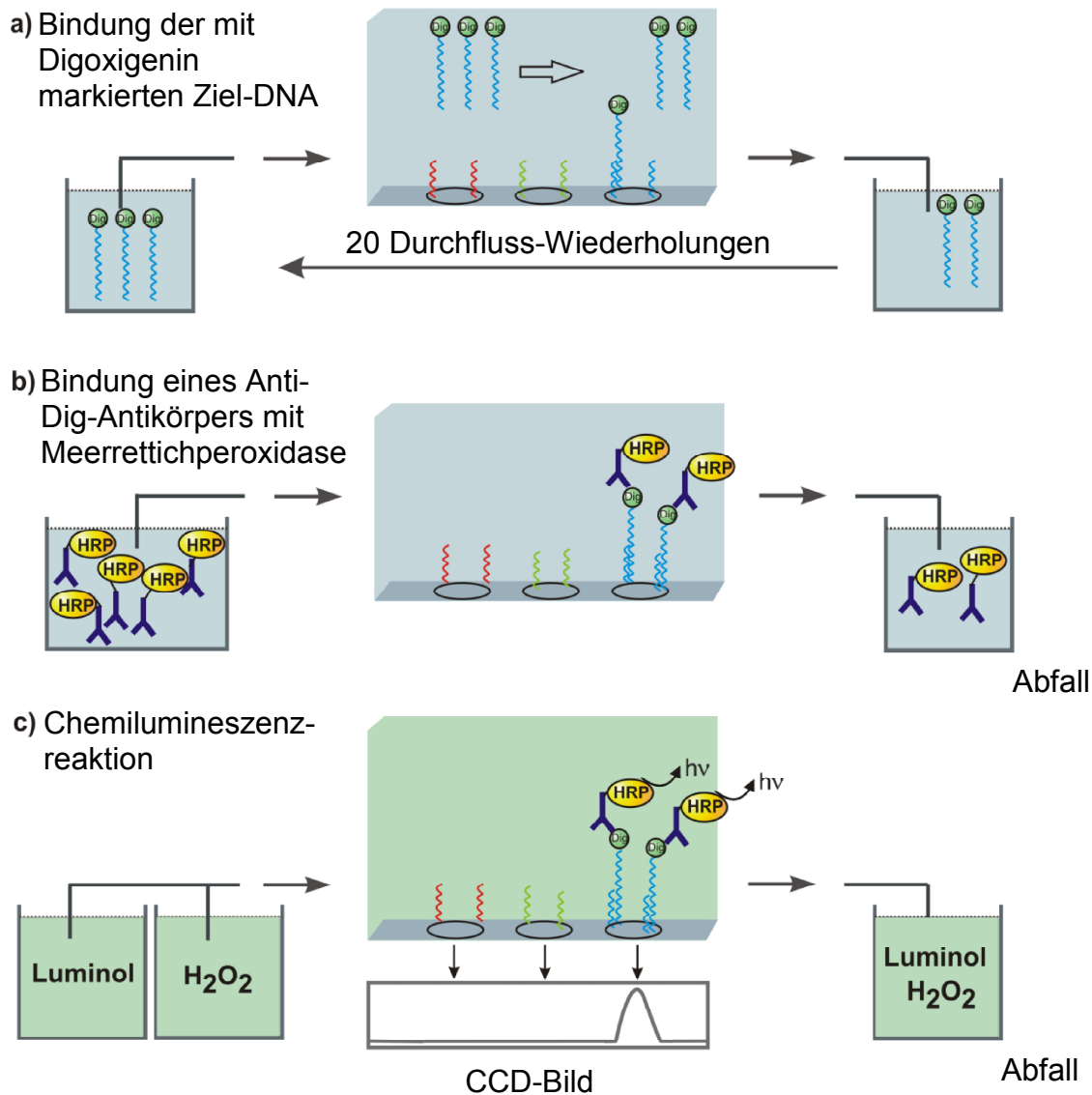


Abb. 38: CL-Assay zum Nachweis humanpathogener Bakterien, basierend auf einem Hybridisierungsereignis und einer Antikörpererkennung der Digoxigenin-Markierung.

Dieses semiautomatische Auslesegerät wurde für die folgenden drei Schritte verwendet: die Hybridisierung der Digoxigenin-markierten Einzelstränge (Abb. 38a), die Anbindung des Anti-Digoxigenin Antikörpers-HRP-Konjugats (Abb. 38b), sowie die Auftragung des Chemilumineszenzsubstrats (Abb. 38c) (Donhauser et al., 2009). Die Ziel-DNA wurde hierbei von spezifischen DNA-Sonden eingefangen. Diese DNA-Sonden waren kovalent an die modifizierte Glasoberfläche gebunden. Die

Doppelstrangbildung der Ziel-DNA und der DNA-Sonden war dabei für die Spezifität des Assays verantwortlich. Aus diesem Grund wurde die Vorwärtsprimersequenz auch als DNA-Sonde auf der Oberfläche verwendet, um sicherzustellen, dass nur die Sequenz der Ziel-DNA erkannt wird und nicht etwa eventuell noch vorhandene Rückwärtsprimer.

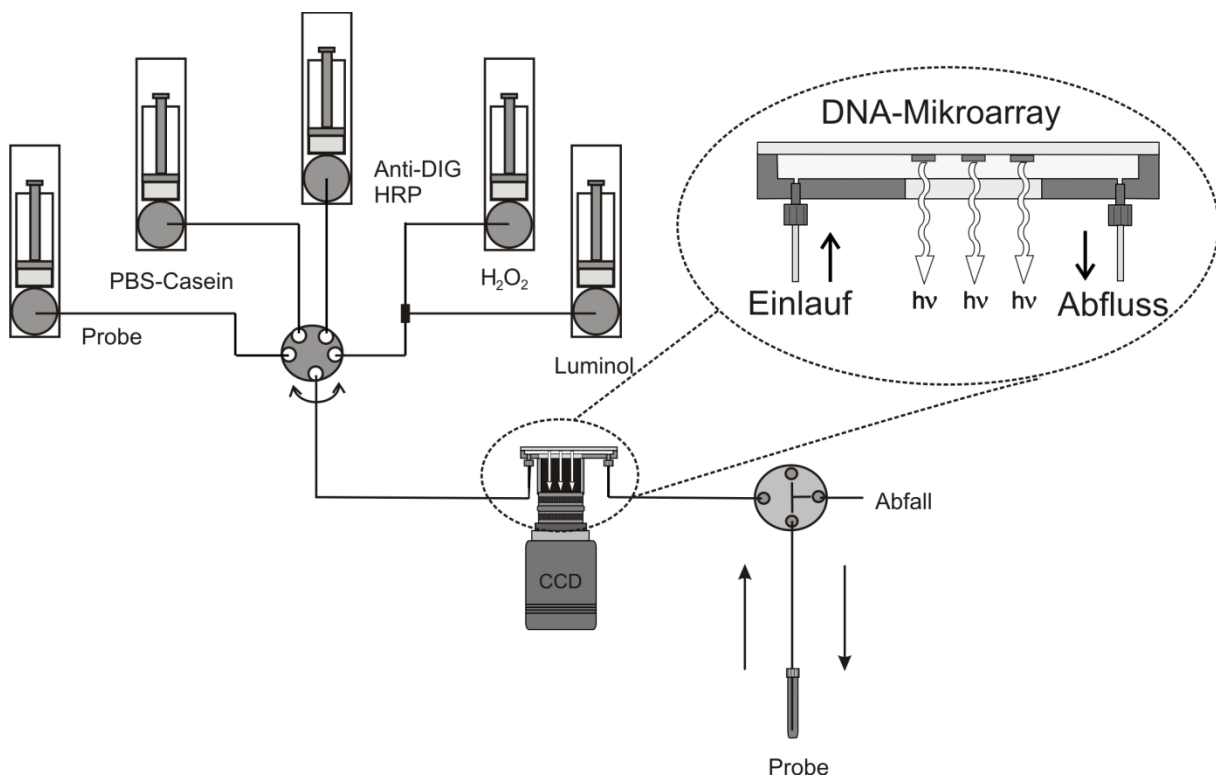


Abb. 39: Fluidik zum Nachweis humanpathogener Bakterien auf einem DNA-Mikroarray.

Abb. 39 zeigt die zum Nachweis verwendete Fluidik. Es wurde dabei das folgende Protokoll verwendet:

20 x 735 μL mit 20 $\mu\text{L}/\text{s}$ Messprobe (Die Probe wurde wiederholt über den Mikroarray gepumpt, außerdem wurde das *stopped-flow* Prinzip verwendet: je 20 μL mit einer Inkubationspause von fünf Sekunden)

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L}/\text{s}$ Waschpuffer

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L}/\text{s}$ SA-HRP-Lösung/Anti-Dig-Antikörper-HRP-Konjugatlösung

3. Ergebnisse und Diskussion

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Waschpuffer

je 1 x 600 μL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Luminol und H_2O_2

90 Sekunden Aufnahme des Chemilumineszenzsignals

3.5.2 Einzelstrangabtrennung

Da die Konzentration der magnetischen Nanopartikel in ihrer Stammlösung nicht bekannt war, wurde in einem Titrationsexperiment die optimale Menge an Nanopartikeln bestimmt, die für die größtmögliche Ausbeute an DNA-Einzelsträngen sorgte. Für diese Experimente wurde eine Endpunkt-PCR verwendet. Diese liefert im Vergleich zur später verwendeten Stopped-PCR ein Maximum an zu erwartender DNA-Konzentration. Es wurden verschiedene Konzentrationen an Streptavidin-markierten, magnetischen Nanopartikeln im Abtrennassay verwendet. Dabei wurde dann das Signal auf dem Chip ausgewertet, um die maximale Bindungskapazität zu bestimmen. Das Maximalsignal wurde mit 100 μL magnetischer Nanopartikel-suspension erreicht (Abb. 40).

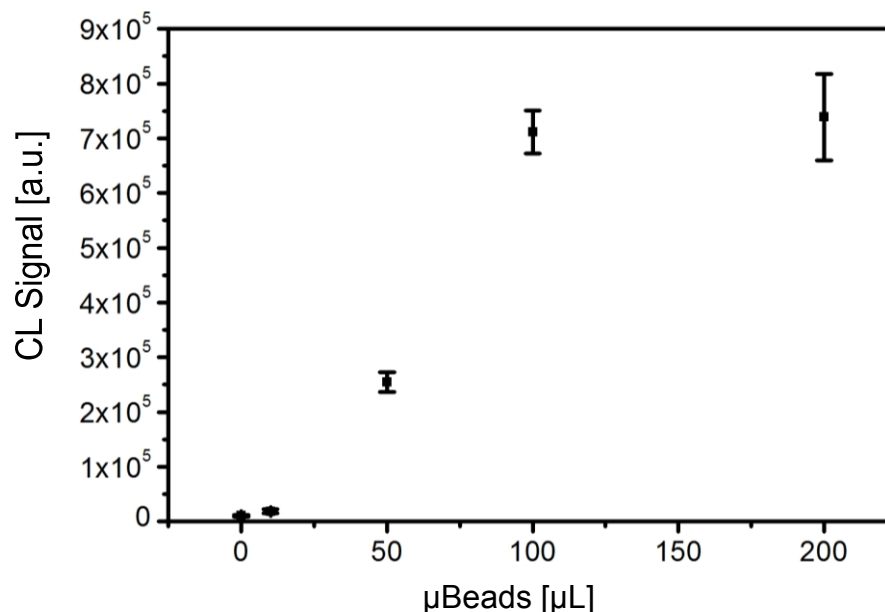


Abb. 40: Zusammenhang zwischen der Menge eingesetzter Mikropartikel aufgetragen gegen das erreichte CL-Signal ($n = 5$, $m = 6$).

3.5.3 Parameterbestimmung im Auslesegerät

Der nächste Schritt bestand in der Optimierung der Hybridisierung auf dem DNA-Mikroarray. Dies geschah durch wiederholte Pumpvorgänge der DNA-Einzelstränge über den Chip, wobei eine möglichst niedrige Pumpgeschwindigkeit gefahren wurde, um eine Anbindung der DNA-Stränge zu ermöglichen. Ein Anstieg der Wiederholungen von 5 auf 10 führte zu einem 2,5-fachen Anstieg des CL-Signals. Die maximale Hybridisierung wurde schließlich bei 20 Wiederholungen erreicht, was schließlich zu einer Reaktionszeit von 1 Stunde und 15 Minuten führte (Abb. 41). 10 Wiederholungen hätten auch ausgereicht, allerdings hätte dies eine geringere Sensitivität bedeutet. Dafür wäre dann der Assay schneller gewesen. Um den Assay mit maximaler Sensitivität zu betreiben, wurden 20 Wiederholungen gewählt.

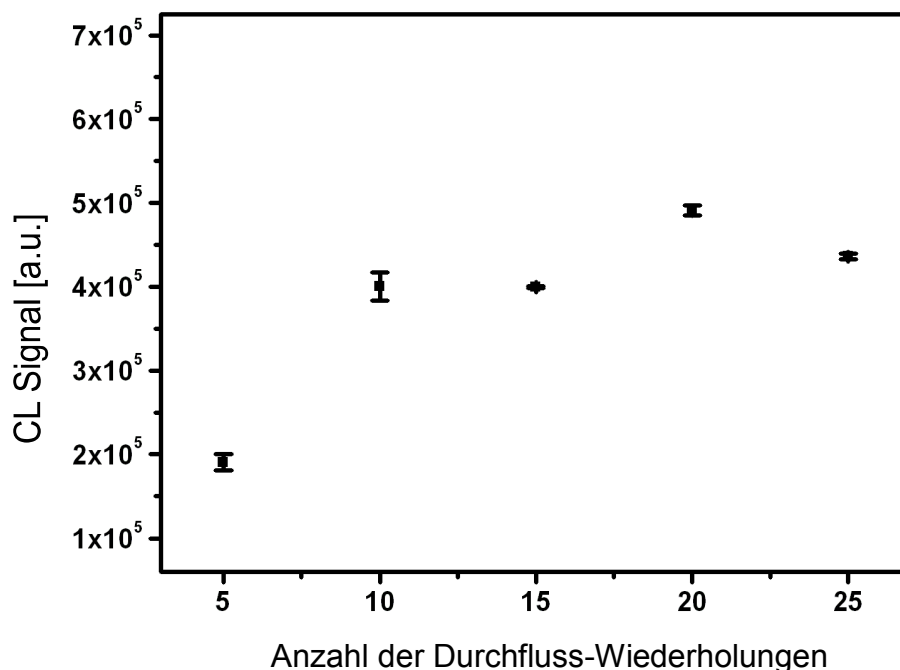


Abb. 41: Die Zahl der Probendurchflüsse durch die Inkubationskammer aufgetragen gegen das CL-Signal ($n = 5$, $m = 6$).

Die Reaktionszeit unter Durchflussbedingungen weicht generell stark von den Reaktionszeiten statischer Hybridisierungskammern ab. Dort dauerte die maximale

3. Ergebnisse und Diskussion

Ausbildung der Hybridisierung unter statischen Bedingungen zwischen 6 und 20 Stunden (Mocanu et al., 2008). Der Massentransport der Ziel-DNA-Stränge zu einer DNA-Sonde, die auf einem Mikroarray-Punkt immobilisiert ist, ist unter Durchfluss-Bedingungen deutlich effektiver und ist deshalb einer der großen Vorteile des hier gezeigten Durchfluss-CL-DNA-Mikroarray.

3.5.4 Quantifizierung mit einem DNA-Mikroarray in Zellen pro Milliliter

Die folgenden Experimente dienten dazu, die richtigen Parameter für das analytische Zusammenwirken der Stopped-PCR und der Durchfluss-CL-DNA-Mikroarray-Analyse zu finden und eine quantitative Analyse zu ermöglichen. Zunächst wurde steriles Wasser mit Hitze-inaktivierten *E. coli* O157:H7 versetzt. Es wurden Konzentrationen zwischen 10^1 und 10^7 Zellen pro Milliliter verwendet. Alle Konzentrationen niedriger als 35 Zellen pro Milliliter können hierbei als Nullkontrolle betrachtet werden, da hier nur noch DNA anderer Spezies vorhanden sein kann.

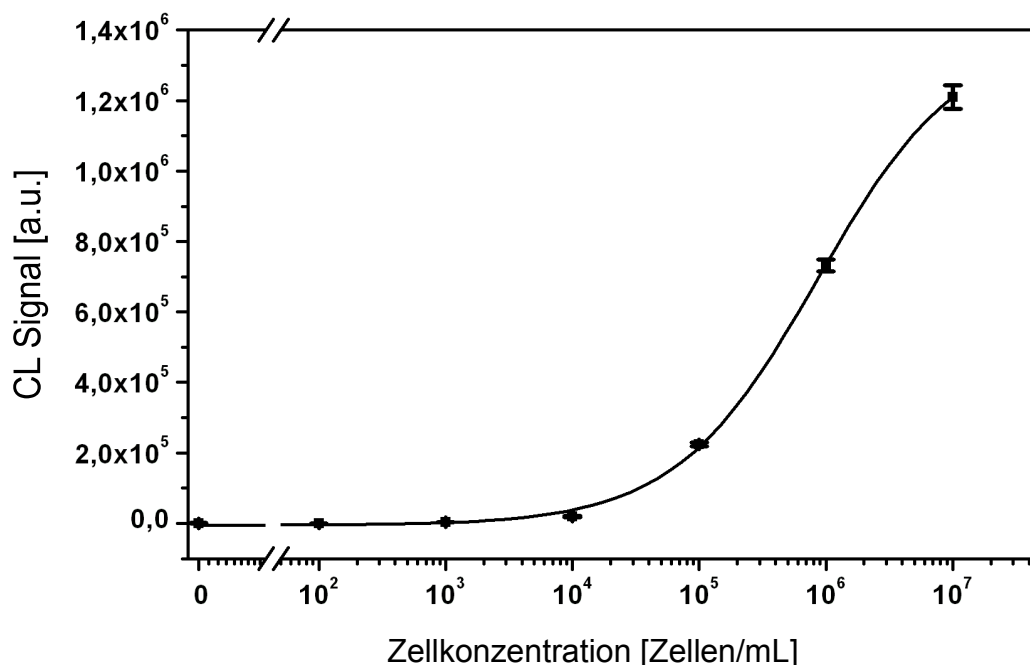


Abb. 42: Kalibrierkurve für das Gen *stx1* aus *E. coli* O157:H7. Die Stopped-PCR wurde nach 30 Zyklen gestoppt und auf einem DNA-Mikroarray quantifiziert (n = 7, m = 6).

Die Konzentration an *E. coli*-Zellen ist so niedrig, dass keine ganze Zelle mehr im PCR-Mix sein kann. Die PCR wurde nach 30 Zyklen gestoppt, was einem Testmittelpunkt von $8,6 \times 10^5$ Zellen/mL und einem Detektionslimit von 4000 Zellen/mL entspricht. Diese Werte wurden aufgrund der sigmoidalen Kurve des Durchfluss-CL-DNA-Mikroarrayassays in Abb. 42 errechnet. *E. coli* konnte im linearen Arbeitsbereich des Assays zwischen 10^5 und 10^7 Zellen/mL quantifiziert werden. Dieser Arbeitsbereich konnte mit Studien zur Reproduzierbarkeit verifiziert werden (Tabelle 20).

Die Intra-Assay-Variabilität wurde aus den sechs wiederholt aufgetragenen Spots in einer Reihe des Mikroarrays errechnet. Die Intra-Assay-Variabilität wurde durch eine Erhöhung der DNA-Konzentration verringert. Das lässt auf eine ungleichmäßige Verteilung der DNA-Stränge im Mikrofluidikkanal bei einer niedrigen DNA-Konzentration schließen. Nichtsdestotrotz konnte eine sehr niedrige Nachweisgrenze, die 4000 Zellen/mL entspricht, erreicht werden. Ein Grund dafür war das geringe Signal der CL-Nullkontrolle und ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3390. Die Inter-Assay-Variabilität war bei 10^6 Zellen/mL am geringsten und lag bei 9 %. Dabei war die Summe der Reproduzierbarkeiten der folgenden Schritte von Bedeutung: Zellyse, PCR-Amplifikation, DNA-Strangvereinzelung und abschließend der DNA-Hybridisierungsassay. Die niedrigen Reproduzierbarkeiten bei niedrigeren Zellkonzentrationen können auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass das Hybridisierungsassay-Protokoll bisher nur halbautomatisch durchgeführt werden konnte. Die Positionen des Drehventils mussten noch manuell gewählt werden. Dadurch können die einzelnen Inkubationszeiten leicht voneinander abweichen, was zu höheren oder niedrigeren CL-Signalen führt. Deshalb sollte die Einbindung des Drehventils in eine vollautomatisierte Umgebung zu einer erhöhten Reproduzierbarkeit führen. Allerdings ist auch die Zellyse während der PCR-Reaktion eine Quelle von Ungenauigkeiten/Signalvariationen. Eine Automatisierung der DNA-Strangvereinzelung mit Hilfe der magnetischen Nanopartikel würde ebenfalls zu einer Verringerung der Varianz führen. Und schließlich würde eine temperierte Flußzelle die Reproduzierbarkeit erhöhen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 20: Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von *E. coli* O157:H7 unter Verwendung einer Stopped-PCR und eines Durchfluss-CL-DNA-Mikroarray-Auslesegeräts (die PCR wurde nach 30 Zyklen gestoppt).

Zellen/mL	CL-Summensignal [a.u.] und Standardabweichung [%]	
	Inter-Assay	Intra-Assay
10^1	$0,4 \times 10^3$ a.u. (SD: 76 %)	1×10^3 a.u. (SD: 31 %)
10^2	1×10^3 a.u. (SD: 58 %)	$0,4 \times 10^3$ a.u. (SD: 19 %)
10^3	2×10^3 a.u. (SD: 70 %)	4×10^3 a.u. (SD: 10 %)
10^4	$0,2 \times 10^5$ a.u. (SD: 48 %)	$0,2 \times 10^5$ a.u. (SD: 8 %)
10^5	$1,9 \times 10^5$ a.u. (SD: 34 %)	$2,2 \times 10^5$ a.u. (SD: 2 %)
10^6	$6,5 \times 10^5$ a.u. (SD: 9 %)	$7,3 \times 10^5$ a.u. (SD: 3 %)
10^7	N/A	$12,1 \times 10^5$ a.u. (SD: 3 %)

Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde die Anzahl der Zyklen während der PCR-Amplifikation erhöht. Die Benutzung von 35 statt 30 Amplifikationszyklen führte zu einer Verschiebung der Kalibrierkurve bei *E. coli* O157:H7 in Richtung niedrigerer Konzentrationen (Abb. 43). Basierend auf den Daten in Abb. 43 ist die Nachweisgrenze bei 136 Zellen/mL, was vier Zellen pro PCR-Mix entsprach. Bei 10^4 Zellen/mL war das CL-Signal um den Faktor 12 erhöht. Der Testmittelpunkt der sigmoidalen Kurve wurde mit 4×10^4 Zellen/mL bestimmt. Der lineare Bereich der Kurve lag zwischen 10^2 und 10^4 Zellen/mL. Dies war zwei Dekaden niedriger als im Vergleich zur Verwendung von 30 Amplifikationszyklen in der Stopped-PCR. Eine längere Amplifikation führte zu einer erhöhten Anzahl DNA-Stränge und somit zu einer erhöhten Sensitivität. Das maximale CL-Signal wurde bei 10^6 Zellen/mL erreicht.

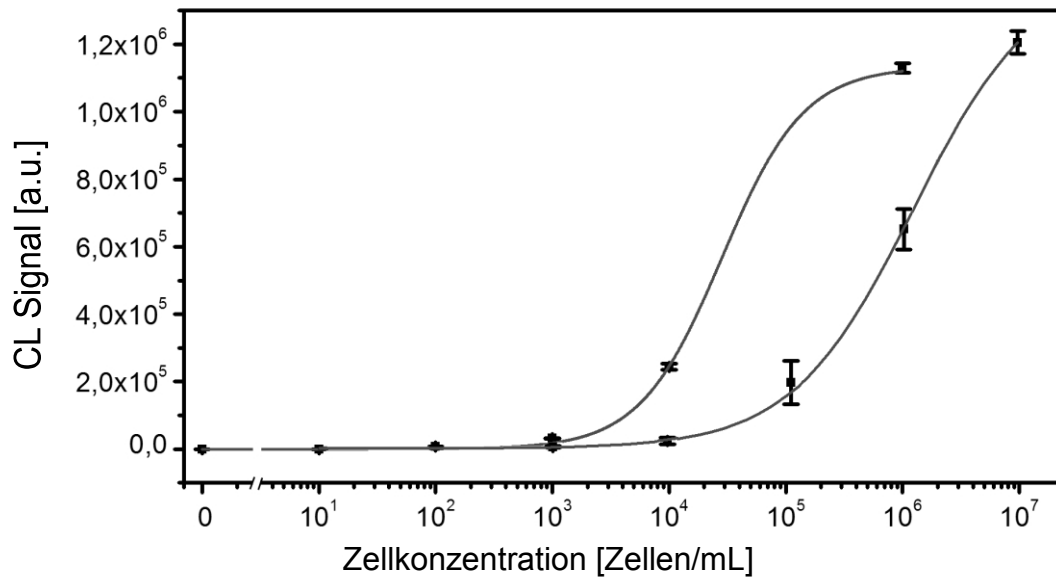


Abb. 43: Kalibrierkurve von *E. coli* O157:H7 (Gen: *stx1*) in einem CL-DNA-Mikroarrayassay, der die Amplifikationsprodukte quantifiziert. Die PCR wurde nach 35 und 30 Zyklen gestoppt ($n = 13$, $m = 3 - 18$).

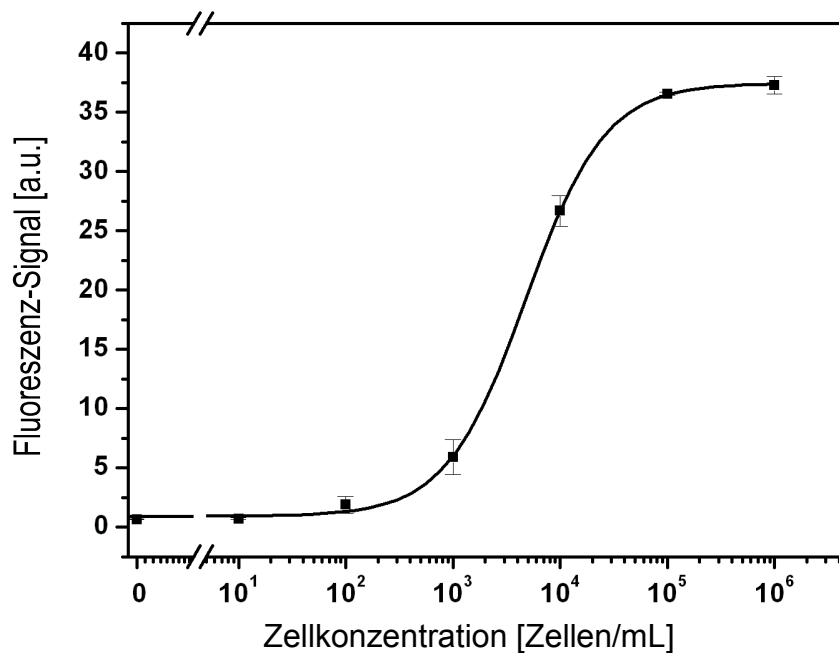


Abb. 44: Kalibrierkurve von PCR-Produkten aus *E. coli* O157:H7 (Gen: *stx1*). Auftragung des Fluoreszenzsignals der Stopped-PCR nach 35 Zyklen gegen die Zellkonzentration ($n = 7$, $m = 3$).

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Stopped-PCR-Reaktion mit einem Stopp bei Zyklus 35 wurde genauer analysiert, und zwar mit Hilfe einer Auftragung der Fluoreszenz-Signale aus der Stopped-PCR gegen die Zellkonzentration in der Ausgangslösung (Abb. 44). Die Nachweisgrenze war mit 160 Zellen/mL leicht höher als mit dem Durchfluss-CL-Assay. Diese Ergebnisse zeigten die Möglichkeiten der Stopped-PCR-Methode beim Einsatz in Kombination mit der DNA-Mikroarray-Analyse. Ob nun die jeweilige Mikroorganismenkonzentration hoch oder niedrig ist, ob es eine starke oder schwache Voramplifikation gab, der Assay konnte so angepasst werden, dass er den richtigen Bereich der notwendigen Amplifikation zur Verfügung stellte. Der CL-DNA-Hybridisierungs-Assay zeigte für *E. coli* O157:H7 das höchste in dieser Arbeit gemessene Signal-Rausch-Verhältnis von mehr als 9000. Dies war höher als bei einem Stopp der PCR bei Zyklus 30. Dies deutete darauf hin, dass mit einer Erhöhung der Zyklenzahl auf 35 nicht nur die Sensitivität, sondern auch die Selektivität erhöht wurde.

Für Multianalyt-Analysen muss die Stopped-PCR an einem festgelegten Punkt gestoppt werden. Deshalb wurden die nun folgenden Analysen für *S. Typhimurium* und *C. jejuni* bei 35 Zyklen gestoppt. Der *SYBR Green*-Assay in der Realtime-PCR zeigte Nachweisgrenzen von 360 Zellen/mL (Abb. 47) und drei Zellen/mL (Abb. 48), was im gleichen Bereich lag, wie die Nachweisgrenzen von 500 Zellen/mL (Abb. 45) und einer Zelle/mL (Abb. 46), die mit dem Durchfluss-CL-DNA-Mikroarrayassay gemessen wurden. Die Kalibrierkurve für *S. Typhimurium* hatte einen Arbeitsbereich von drei Dekaden und hatte einen linearen Bereich zwischen 10 und 10⁴ Zellen/mL. *C. jejuni* konnte zwischen einer und 100 Zellen/mL quantifiziert werden.

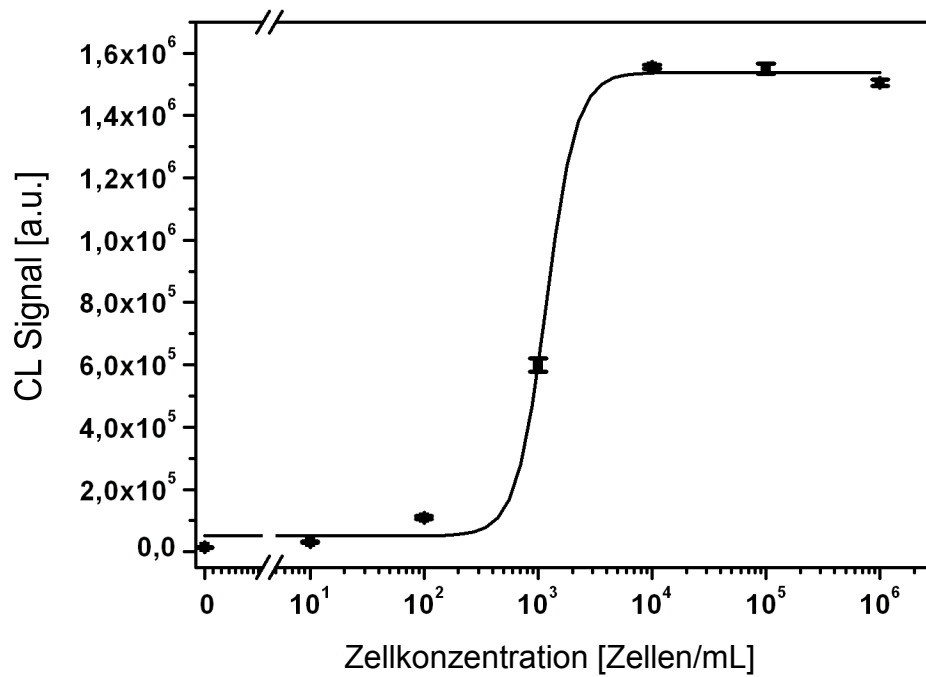


Abb. 45 Kalibrierkurve von *S. Typhimurium* (Gen: *hilA*), die mit einer CL-DNA-Mikroarrayanalyse quantifiziert wurde (n = 7, m = 6).

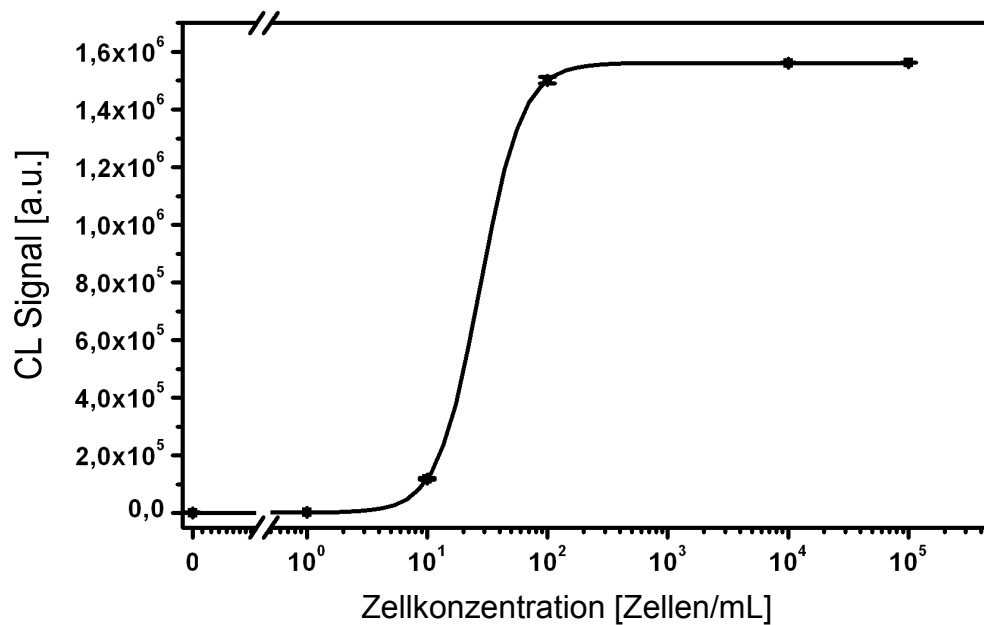


Abb. 46: Kalibrierkurve von *C. jejuni* (Gen: *hipO*), die mit einer CL-DNA-Mikroarrayanalyse quantifiziert wurde (n = 6, m = 6).

3. Ergebnisse und Diskussion

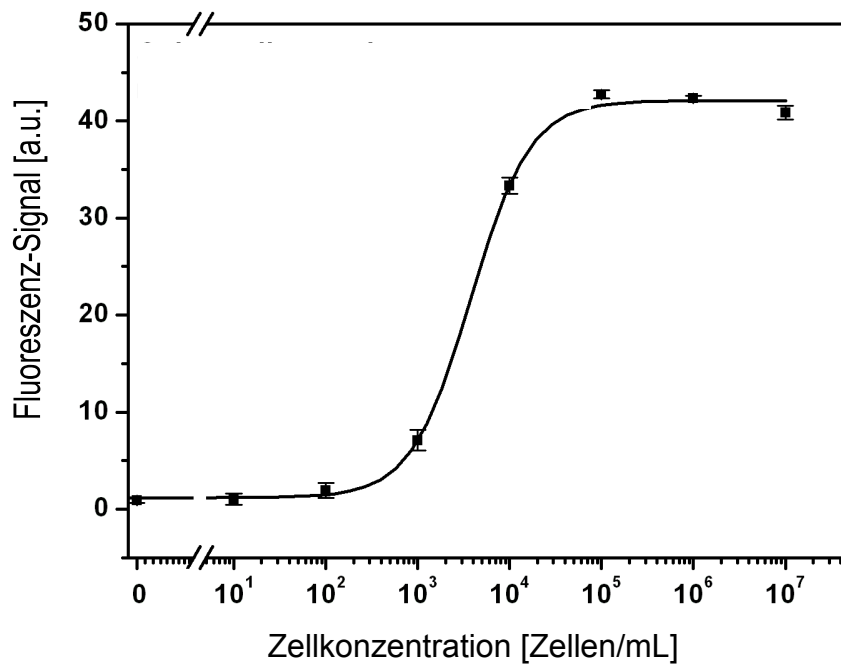


Abb. 47: Kalibrierkurve von PCR-Produkten aus *S. Typhimurium* (Gen: *hilA*). Auftragung des Fluoreszenzsignals der Stopped-PCR nach 35 Zyklen gegen die Zellkonzentration ($n = 8$, $m = 3$).

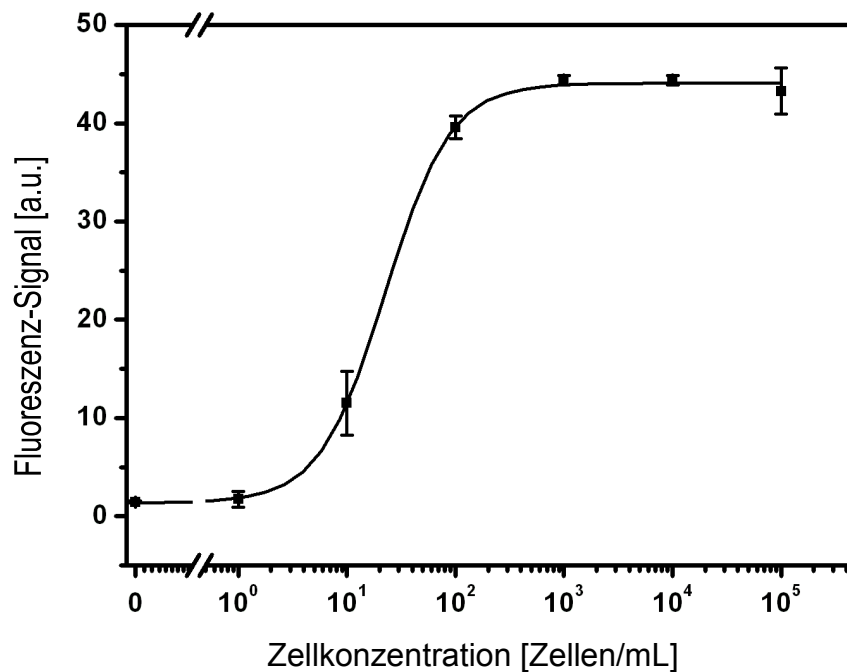


Abb. 48: Kalibrierkurve von PCR-Produkten aus *C. jejuni* (Gen: *hipO*). Auftragung des Fluoreszenzsignals der Stopped-PCR nach 35 Zyklen gegen die Zellkonzentration ($n = 7$, $m = 3$).

Abb. 49 zeigt eine Kalibrierkurve für *L. pneumophila*. Auch hier wurden hitzeinaktivierte Bakterienzellen mit der Stopped-PCR amplifiziert. Wenn die PCR nach Zyklus 30 gestoppt wurde, lag die Nachweisgrenze bei 3800 Zellen/mL.

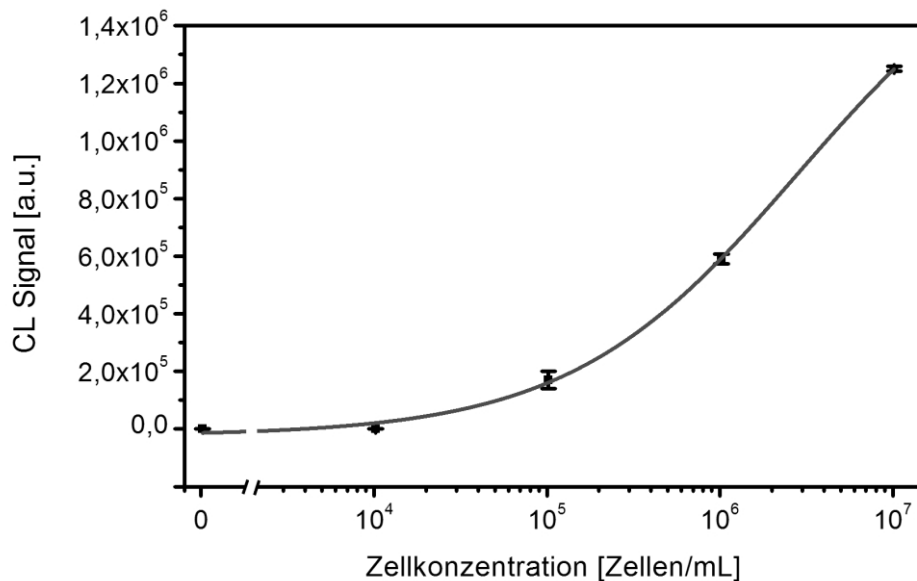


Abb. 49: Kalibrierkurve von *L. pneumophila* (Gen: *mip*), die mit einer CL-DNA-Mikroarrayanalyse quantifiziert wurde (n = 5, m = 6).

Die theoretische Nachweisgrenze für die hier beschriebenen Assays lag bei 35 Zellen/mL, wenn die Zell-Stammlösung mit den 9,6 μ L der PCR-Reaktion gemischt wurde. Das bedeutete dann genau eine Zelle pro PCR-Reaktionsmix. Eine Nachweisgrenze kleiner als eine Zelle pro Probe bedeutete, dass mehr als nur eine DNA-Kopie der Zielsequenz pro Bakterienzelle in der Lösung enthalten sein musste. Es ist allerdings auch möglich, dass die kommerziell erhältlichen Zell-Standards in den Kultivierungsassays nicht exakt bestimmt worden waren. Da die Realtime-PCR-Assays eine Nachweisgrenze von drei Zellen/mL haben und die Fluoreszenzsignale zwischen einer und 1000 Zellen/mL in den gleichen PCR-Reaktionsmixes anstiegen (Abb. 48), muss angenommen werden, dass die Standards ungenau waren.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 21: Überblick über die Leistungsfähigkeit dieses quantitativen DNA-Mikroarrayassays.

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>
Stoppzyklus	30	35	35
LOD [Zellen/mL]	4000	136	500
TMP [Zellen/mL]	$8,6 \times 10^5$	4×10^4	1180
S/N _{max}	3390	8940	110
Arbeitsbereich [Zellen/mL]	$10^5 - 10^7$	$100 - 10^4$	$10 - 10^4$
LOD PCR [Zellen/mL]	N/A	160	360
Arbeitsbereich PCR [Z./mL]	N/A	$100 - 10^5$	$100 - 10^5$

	<i>C. jejuni</i>	<i>L. pneumophila</i>
Stoppzyklus	35	30
LOD [Zellen/mL]	1	3800
TMP [Zellen/mL]	27	10^6
S/N _{max}	910	400
Arbeitsbereich [Zellen/mL]	1 - 100	$10^4 - 10^7$
LOD PCR [Zellen/mL]	3	N/A
Arbeitsbereich PCR [Z./mL]	$1 - 10^3$	N/A

Die Nachweisgrenze für Bakterien hängt von der Wahl der DNA-Primer und Ziel-DNA-Sequenz, sowie vom Volumen der PCR ab. Da die meisten PCR-Reaktionen auf sehr geringe Volumina optimiert sind, müssen Voranreicherungsverfahren, wie

die immunomagnetische Auftrennung, auf Endvolumina zwischen einem und 100 µL hin optimiert sein. Wie aus der Übersicht in Tabelle 21 hervorgeht, wurde eine quantitative Methode zum Nachweis von pathogenen Bakterien in geringen Zellzahlen entwickelt. Diese Methode kann somit in Lebensmittel- und Wasseranalysen verwendet werden, wo sehr geringe Nachweisgrenzen gefordert werden.

3.5.5 Kreuzreaktivitäten

Die Sonden für die vier Virulenzgene aus *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *C. jejuni* und *L. pneumophila* wurden als Gesamtkonzept entwickelt und es wurde folglich bei der Entwicklung der Sonden bereits auf eine möglichst geringe Kreuzreaktivität geachtet. Beispielhaft wurde hier die Kreuzreaktivität der *Salmonella*-DNA mit den drei anderen DNA-Sonden untersucht. Nur bei *Legionella* und einem Einsatz von 10 ng genomischer DNA sowie bei *E. coli* und einem Einsatz von 0,01 ng waren nennenswerte Kreuzreaktivitäten aufgetreten (Tabelle 22).

Tabelle 22: Kreuzreaktivitäten der Analyt-DNA aus *S. Typhimurium* mit anderen DNA-Sonden.

<i>S. Typhimurium</i>	10 ng	1 ng	0,1 ng	0,01 ng
<i>E. coli</i>	1,41 %	0,31 %	1,05 %	7,34 %
<i>C. jejuni</i>	1,70 %	0,36 %	1,04 %	1,68 %
<i>L. pneumophila</i>	6,75 %	0,52 %	0,89 %	1,21 %

3.5.6 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass pathogene Bakterien durch DNA-Mikroarrays quantifiziert und in geringen Zellkonzentrationen nachgewiesen werden konnten. Die Gesamtdauer des Assays lag bei 3,5 Stunden: 1,5 Stunden für die Vorbereitung und die PCR, 0,5 Stunden für den Strangauffrennungsassay und 1,5 Stunden für den Hybridisierungsassay. Dies erlaubt einen schnellen und verlässlichen Nachweis von für den Menschen relevanten Pathogenen. Die hohe Sensitivität des Systems wurde durch die Benutzung der Stopped-PCR für die spezifische Amplifikation der DNA-Sequenzen erreicht. Die Nachweisgrenze des DNA-Mikroarrays lag im gleichen Bereich wie für die Realtime-PCR, also zwischen 10^1 und 10^2 Zellen/mL. Antikörper-Mikroarrays haben höhere Nachweisgrenzen zwischen 10^3 und 10^5 Zellen/mL (Gehring et al., 2006; Langer et al., 2011). Genau deshalb hat die Durchfluss-CL-DNA-Mikroarrayanalyse im Bereich der humanpathogenen Bakterien eine Chance im Trinkwasserhygiene-Management eingesetzt zu werden. Jedoch ist dies nur möglich, wenn sich die Bakterienzellen auf ein notwendiges Maß voranreichern lassen und anschließend in einer PCR-Reaktion weiter vervielfältigt werden können. Dies kann nur durch eine Kombination von Methoden wie der Mikrofiltration, der immunomagnetischen Anreicherung oder der Affinitätschromatographie mit der DNA-Mikroarrayanalyse erreicht werden (Pappert et al., 2009; Peskoller et al., 2009a, 2009b). Die Reproduzierbarkeit lag im gleichen Rahmen wie bei anderen bioanalytischen Assays, könnte aber durch eine Einbettung des gesamten Assays in eine vollständig automatisierte Mikroarray-Analyseplattform wie dem Munich Chip Reader 3, erheblich verbessert werden (Kloth et al., 2009).

Diese Analysen wurden nicht als Multiplex-Anwendungen durchgeführt. Jeder pathogene Mikroorganismus wurde in einem separaten Experiment nachgewiesen. Für die Analyse von Trinkwasser wäre es natürlich von Vorteil, mehrere Mikroorganismen gleichzeitig nachweisen zu können. Die hier verwendeten Primer sind bereits für eine Multiplex-PCR ausgelegt und die Kreuzreaktivitäten wurden bereits überprüft. Es traten dabei Abweichungen auf, die im Multiplexformat berücksichtigt werden müssen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die schnelle Analyse pathogener Bakterien in Lebensmitteln und Trinkwasser ist die Grundlage zum Erhalt der öffentlichen Gesundheit. Im Moment benötigen die eingesetzten Tests viel Zeit. Diese Dissertation hatte zum Ziel, einen Beitrag zu einem Nachweissystem zu leisten, das innerhalb weniger Stunden ein Analyseergebnis liefert. Das Nachweissystem bestand aus drei Teilen: einer Crossflow-Mikrofiltration, einer immunomagnetischen Auftrennung und einer DNA-Amplifikation gefolgt von einem DNA-Nachweis auf einem DNA-Mikroarray. Die beiden erstgenannten Teile wurden in zwei weiteren Dissertationen am Institut für Wasserchemie bearbeitet. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Entwicklung der DNA-Amplifikation und der DNA-Mikroarray-Analyse.

Der erste Schritt war die Entwicklung der Mikroarrayoberflächenchemie. PEG-Oberflächen könnten eine vorteilhafte Ausgangsbasis mit guten Signal-Rausch-Verhältnissen sein. Eine effektive Schrittfolge für den Aufbau der Oberflächenchemie wurde dabei am Institut für Wasserchemie durch Anne Wolter entwickelt (Wolter et al., 2007). Diese Oberflächenchemie wurde nun für einen DNA-Mikroarray angepasst. Das Ziel war es, ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen und den Mikroarray, mehrmals wieder zu verwenden. Ein Polyethylenglykoldiamin 2000 (Diamino-PEG, 2000 g/mol) -Film wurde auf silanisierte Glasobjektträger aufgebracht. 25mer Oligonukleotide wurden anschließend mittels eines Mikrokontaktrobotersystems auf diese Oberfläche aufgebracht. Zunächst wurde die optimale Mikrodosierpuffer/Oberflächenchemie-Kombination ermittelt. 12 verschiedene Mikrodosierpuffer wurden getestet, mit dem Ergebnis, dass Wasser alleine bereits die besten Signale und Spotgrößen auf der Diamino-PEG-Oberfläche ergaben. Die Qualität des DNA-Mikroarrays wurde durch eine Chemilumineszenzreaktion charakterisiert. Das Signal wurde mit einem Chemilumineszenzauslesegerät und einem Meerrettich-peroxidase/Luminol-Reportersystem ausgewertet.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Nachdem die optimale Oberflächenchemie und der optimale Mikrodosierpuffer gefunden wurden, wurde die Regenerierbarkeit optimiert. Hitzeregeneration, alkalische und saure Regeneration wurden getestet. Nur die saure Regeneration war mit der DNA/Diamino-PEG/Wasser-Kombination anwendbar. Der entwickelte DNA-Mikroarray zeigte bei bis zu 22 Regenerationen ein stabiles Signal an 5 Messpunkten. Auch blieb die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit über 22 Regenerationszyklen stabil.

Der zweite Schritt war ein Assay mit Oligonukleotiden (Gen: *16S rRNA* von *R. planticola*). Der Assay hatte eine Dauer von 15 Minuten und erreichte eine Nachweisgrenze von 40 Kopien / mL.

Der dritte Schritt war die Evaluierung verschiedener Methoden zur Amplifikation von DNA. Es wurden die Anforderungen an diese Methoden diskutiert, um die amplifizierte DNA schließlich quantitativ auf einem DNA-Mikroarray bestimmen zu können. Zum einen wurden zwei unspezifische Amplifikationsmethoden untersucht, die *Multiple Displacement Amplification* (MDA) und die *GenomePlex Whole Genome Amplification*. Zum anderen wurden spezifische Amplifikationsmethoden untersucht, die Endpunkt-PCR und die neuentwickelte Stopped-PCR. Die erste zu beantwortende Frage war die nach der Quantifizierbarkeit der DNA nach der Amplifikation. Die ersten drei genannten Methoden zeigten hier erhebliche Nachteile. Dies führte schließlich zur Verwendung und weiteren Anpassung der Stopped-PCR. Diese Methode hatte die notwendigen Charakteristiken für einen Einsatz zur Quantifizierung auf einem DNA-Mikroarray. Die neue Methode wurde zur Quantifizierung von *Escherichia coli* (Gen: *uidA*) eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag bei $1,1 \times 10^5$ Kopien/mL.

Der vierte Schritt war die Entwicklung eines Chemilumineszenz Durchfluss-DNA-Mikroarray-Assays für die schnelle und sensitive Quantifizierung der pathogenen Bakterien *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter jejuni* und *Legionella pneumophila* in Wasser. Unter Verwendung der Stopped-PCR Strategie konnte dabei eine starke Korrelation zwischen der Menge der quantifizierten Ziel-DNA und der Ausgangsmenge an Zellen aufgezeigt werden.

Dabei wurde die Amplifikation der DNA in der logarithmischen Phase der PCR gestoppt, um die DNA anschließend auf dem DNA-Mikroarray zu quantifizieren. Die Generierung von DNA-Einzelsträngen ist dabei essentiell für DNA-Hybridisierungsassays auf Mikroarrays. Deshalb wurden die PCR-Produkte mittels eines Assays aufgetrennt, der eine Kombination aus Biotin/Streptavidin und magnetischen Nanopartikeln verwendet.

Dieser Assay verwendete eine Biotinmarkierung, die durch einen entsprechenden Rückwärtsprimer eingebracht wurde. Der Vorwärtsprimer war mit einer Digoxigeninmarkierung versehen, die für den Chemilumineszenzassay wichtig war. Ein Konjugat aus einem Anti-Digoxigenin-Antikörper und dem Enzym Meerrettichperoxidase erkennt den mit Digoxigenin markierten Antistrang, der an die Sonden auf der Mikroarrayoberfläche gebunden war. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Reaktion zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid. Die dabei entstandene Lichtemission wurde von einer empfindlichen CCD-Kamera aufgezeichnet.

In dieser Dissertation wurde die Quantifizierung von bakterieller DNA durch ein Durchfluss-CL-Mikroarray-Auslesegerät durchgeführt. Die DNA-Mikroarrays basierten auf einem mit NHS-aktivierten und mit PEG-modifizierten Glasobjektträger. Die DNA-Sonden, welche die gleiche Sequenz wie der Rückwärtsprimer hatten, wurden auf der Glasoberfläche immobilisiert. Der vollständige Assay wurde dann durch Kalibrierstandards mit hitzeinaktivierten Bakterien in Wasser evaluiert. Die Gesamtassayzeit betrug am Ende 3,5 Stunden, und die Nachweisgrenzen waren für *E. coli* O157:H7 136 Zellen/mL, für *S. Typhimurium* 500 Zellen/mL, für *C. jejuni* 1 Zelle/mL und für *L. pneumophila* 3800 Zellen/mL. Die Ergebnisse des DNA-Mikroarrays waren vergleichbar mit den Ergebnissen eines *SYBR Green*-Assays in der PCR. Die Vorteile des neu entwickelten DNA-Mikroarraysystems sind dabei die zukünftige Anwendung in einem Multiplexing-Umfeld, die hohe Spezifität der Hybridisierung auf einem DNA-Mikroarray und die Möglichkeit, quantitative Ergebnisse auf einem automatisierten CL-Durchfluss-Mikroarray-System zu erhalten.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Weitere Entwicklungsmöglichkeiten liegen somit in einer Ausnutzung der geringen Kreuzreaktivitäten für Multiplexanwendungen und einer weiteren Automatisierung im Munich Chip Reader 3.

5. Summary and Outlook

Rapid analysis of pathogenic bacteria in food and water is essential to preserve public health. The test methods currently used are time consuming. This thesis had the aim of contributing to the development of a detection system providing results within a few hours. The detection system consisted of three components: cross flow filtration, immunomagnetic separation, and DNA amplification followed by DNA microarray detection. The first two parts were investigated in two other PhD theses at our institute. This thesis dealt with DNA amplification and the development of the DNA microarray analysis.

The first step was the development of the microarray surface chemistry. PEG surfaces could be a smart functional platform with high signal-to-noise ratios. An effective step-by-step chemistry was developed at our institute for uniform presentation of terminal functional groups at each monolayer. This surface chemistry was adapted to DNA in this work. The goal was to achieve a strong signal-to-noise ratio and to reuse the microarray several times. A poly-(ethylene glycol diamine) 2000 (diamino-PEG, 2000 g/mol) film was prepared onto silanized glass slides. 25mer oligonucleotides are brought to the slide surface by means of a microcontact robot system. First, additives for an optimal spotting buffer in combination with an optimal surface chemistry are studied. 12 different spotting buffers were evaluated with the result that water alone gave the best signal and spot size in combination with the diamino-PEG surface chemistry. The quality of the DNA microarray is characterized by a chemiluminescence reaction using a chemiluminescence microarray reader and a horseradish peroxidase (HRP)/luminol reporter system.

Following the determination of an optimal surface chemistry, the regeneration methods were evaluated. Heat regeneration, alkaline and acidic regeneration were tested. Only the acidic regeneration was compatible with the DNA/diamino-PEG/water combination. Our DNA microarray delivers a stable signal up to regeneration cycle 22. The intra-assay reproducibility stayed constant over

5. Summary and Outlook

22 regeneration cycles performing the DNA hybridisation assay for 5 times after 5 regeneration steps.

The second step was the development of an assay with oligonucleotides (16S rRNA of *R. planticola*). The assay took about 15 minutes and reached a limit of detection of 40 copies/mL.

The third step was the evaluation of nucleic acid amplification methods. The requirements for these methods as preparation for a quantitative DNA detection on a DNA microarray were discussed and examined. Two random amplification methods, the multiple displacement amplification (MDA) and the GenomePlex whole genome amplification were evaluated. Furthermore specific amplification was explored, endpoint-PCR and the adapted stopped-PCR. First, the characteristics of these methods were evaluated in the context of the possibility to quantify the DNA on a DNA microarray after the amplification. The first three methods showed considerable drawbacks. This led to the second step, the adaptation of the stopped-PCR. This method showed the characteristics required for valid DNA quantification on a DNA microarray. The new method allowed the quantification of *Escherichia coli* (gene *uidA*) with a limit of detection of 1.1×10^5 copies/mL.

The fourth step was the development of a chemiluminescence (CL) flow-through DNA microarray assay for the rapid and sensitive quantification of the pathogenic bacteria *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter jejuni* and *L. pneumophila* in water. Using the stopped polymerase chain reaction (PCR) strategy, the amount of amplified target DNA was strongly dependent on the applied cell concentration. The DNA amplification was stopped in the logarithmic phase of the PCR to quantify the DNA products on the DNA microarray chip. The generation of single stranded DNA sequences was essential for DNA hybridization assays on microarrays. Therefore, the DNA strands of the PCR products were separated by streptavidin-conjugated magnetic nanoparticles. This was achieved by introducing a reverse primer labelled with biotin together with a digoxigenin-labeled forward primer for chemiluminescence (CL) microarray imaging. A conjugate of an anti-digoxigenin antibody and horseradish peroxidase recognized the digoxigenin-labeled anti-strands

bound to the probes on the microarray surface and catalysed the reaction of luminol and hydrogen peroxide. The generated light emission was recorded by a sensitive CCD camera.

Summing all this up, the DNA quantification was conducted by a flow-through CL microarray readout system. The DNA microarrays were based on a NHS-activated poly(ethylene glycol)-modified glass substrate. The DNA probes which have the same DNA sequence as the reverse primer were immobilized on this surface. The full assay was characterized by spiking experiments with heat-inactivated bacteria in water. The total assay time was 3.5 h and the detection limits determined on CL microarrays were for *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *C. jejuni* and *L. pneumophila* 136 cells/mL, 500 cells/mL, 1 cell/mL and 3.800 cells/mL, respectively. The results of the DNA microarray assay were comparable to the SYBR Green-based assays analysed with a realtime-PCR device. The advantage of the new microarray analysis method is seen in the ability of a high multiplex degree on DNA microarrays, the high specificity of DNA hybridization on DNA microarrays, and the possibility to get quantitative results on an automated CL flow-through microarray analysis system.

6. Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien

Anti-DIG-Meerrettichperoxidase-Konjugat (ABcam, Cambridge, United Kingdom)

Casein aus Kuhmilch (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Polyethylenglykoldiamin 2000 Da (Huntsman Holland, Rozenburg, Holland)

Di-Kaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Di(N-succinimidyl) carbonat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Dimethylaminopyridin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Dimethylformamid wasserfrei (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Ethanol absolut (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Genomeplex Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (Fluka/Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz)

Glycin (Fluka/Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz)

Hellmanex II (Hellma, Müllheim, Deutschland)

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Kaliumhydrogenphosphat

LB-Medium (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

LightCycler MasterMix (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

LightCycler Nuklease free Water (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

LightCycler SYBR Green Master I Mix (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumcitrat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumchlorid NaCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumdihydrogencarbonat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumdodecylsulfat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Primerpaare der Gene *lacZ*, *uidA*, *stx2A*, *mip*, *hilA*, *hipO*, *stx1A* (Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland und FRIZ Biochem, Neuried, Deutschland)
REPLI-g Ultra Fast Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
Salzsäure HCl 37 %-ig (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Schwefelsäure H₂SO₄ 99 %-ig (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Axxora, Lörrach, Deutschland)
Streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland)
SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Kit (Pierce, Rockford, USA)
Triethylamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
tris(Hydroxymethyl)aminoethan (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Universal ProbeLibrary Sonden (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

6.2 Puffer

Alkalischer Regenerationspuffer (pH 13):

200 mM NaOH
1 % w/v Natriumdodecylsulfat
Ad deionisiertes Wasser

Äquilibrierpuffer

210 µL 10 %-ige Natriumdodecylsulfat-Lösung
4,20 mL deionisiertes Wasser

6. Experimenteller Teil

Carbonatpuffer (pH 9,6):

15 mM Na₂CO₃

35 mM NaHCO₃

3 mM NaN₃

Ad deionisiertes Wasser

Natriumcitratpuffer (Saline Sodium Citrate, SSC):

150 mM NaCl

15 mM Natriumcitrat

Ad deionisiertes Wasser

Phosphat-Kochsalz-Puffer (PBS, pH 7,6):

10 mM KH₂PO₄

70 mM K₂HPO₄

145 mM NaCl

Ad deionisiertes Wasser

Saurer Regenerationspuffer (pH 3)

100 mM NaCl

100 mM Glycin

0,1 % w/v Natriumdodecylsulfat

Ad deionisiertes Wasser

pH-Wert wird mit HCl auf 3 eingestellt

Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung (SA-HRP-Lösung)

30 mL Waschpuffer

3 µL SA-HRP

Tris-HCl (3 M, pH 8,5)

3 M Tris

Ad deionisiertes Wasser

pH-Wert wird mit HCl auf 8,5 eingestellt

Waschpuffer (pH 7,6)

0,5 L PBS

0,5 % w/v Casein

6.3 Bakterien

Campylobacter jejuni, KPL, Gaithersburg, USA

Hitzeinaktiviert, 1×10^8 Zellen/mL

Escherichia coli DSM 1116, DSM, Germany

Escherichia coli O157:H7, KPL, Gaithersburg, USA

Hitzeinaktiviert, 3×10^9 Zellen/mL

Legionella pneumophila, InvivoGen, San Diego, USA

Hitzeinaktiviert, 1×10^9 Zellen/mL

Raoultella planticola DSM 3046, DSM, Germany

Salmonella Typhimurium, KPL, Gaithersburg, USA

Hitzeinaktiviert, 5×10^9 Zellen/mL

6.4 Geräte

Brutschrank C24KC (Edison, New York, USA)

CCD-Kamera Starlight Xpress M916 (Starlight Xpress Ltd., Holyport, Großbritannien)

Chemilumineszenz-Mikroarray-Auslesegerät, modifizierter PASA-Aufbau (Attotec GmbH, Siegen)

Drehventil, LabPROTM, 10- Position- Valve (PR700-107-101, Rheodyne, Alsbach)

Klebefolie, ARcare® 8890 (Adhesives Research Inc., Glen Rock, PA, USA)

Millipore Milli-Qplus 185 (Millipore, Billerica, USA)

NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

PCR LightCycler 480 (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Spottingnadel Stealth Solid Pin SNS 9 (ArrayIt, Sunnyvale, USA)

Ultraschallbad Sonorex RK 102 Transistor (Bandelin GmbH & Co. KG; Berlin)

UV-Vis-Spektrometer DU 650 (Beckmann Instruments, Fullerton, USA)

Vortexer TopMix FB 15024 (Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland)

Waage 770 Kern (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

6.5 Bakterienanzucht

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in 100-mL-Schottflaschen. Es wurden 50 mL einer Lösung bestehend aus 20 g/L LB-Medium in Wasser verwendet. Diese Lösung wurde in den Flaschen mit halb geöffneten Deckeln autoklaviert. Das Animpfen erfolgte mit Roti-store Glaskügelchen mit *E. coli* oder *R. planticola*. Danach wurden die Flaschen bei 100 rpm und 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Der Deckel war dabei halb geöffnet, um einen Luftaustausch zu ermöglichen.

Die Kultivierung von pathogenen Bakterien war wegen fehlender Einstufung der Labore (Bio 2) nicht möglich, weswegen hitzeinaktivierte pathogene Bakterien als

Kalibrierstandards verwendet wurden. Die Konzentrationsangaben der Hersteller wurden übernommen, da eine nachträgliche Konzentrationsbestimmung nicht möglich war.

6.6 Konzentrationsbestimmung der Bakteriensuspension

Die Konzentrationsbestimmung der Bakteriensuspension (*E. coli* und *R. planticola*) erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm. Zunächst wurde 1 mL der Übernachtskultur zehn Minuten bei 4500 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Bakterienpellet im gleichen Volumen PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde 1:10 verdünnt und im Photometer die optische Dichte bestimmt. Als Richtwert für *E. coli* diente ein OD₅₇₈-Wert von 1,0, dies entsprach einer Konzentration von ca. 1×10^9 Zellen/mL (Bast, 2012)

6.7 DNA-Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung

Für die DNA-Aufreinigung aus Bakterienzellen, sowohl lebend als auch bereits hitzeinaktiviert, wurde der DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen verwendet (Qiagen (Hrsg.), 2006b). Ab Kapitel 3.4 wurden ausschließlich die kommerziellen Kalibrierstandards verwendet. Die DNA wurde nicht mehr separat aufgereinigt, sondern die hitzeinaktivierten Bakterienzellen durch eine weitere Hitzebehandlung in der PCR aufgeschlossen und somit die DNA zugänglich gemacht.

Die DNA-Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Hierfür war es zunächst notwendig, den Puffer AW1 mit 15 mL und den Puffer AW2 mit 30 mL Ethanol aufzufüllen.

Ca. 10^9 Zellen aus der Zellsuspension wurden in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert (10 Minuten, 5000 x g). Der Überstand konnte verworfen werden und

das Pellet in 180 μL ATL-Puffer resuspendiert werden. Die Zugabe von 20 μL Proteinase K sorgte für einen Verdau der Proteine in der Bakterienzellwand (3 Stunden, 56 $^{\circ}\text{C}$). Während des Verdau und auch im Anschluss wurde die Suspension im Reaktionsgefäß wiederholt für 15 Sekunden durchmischt (Vortexer). Zur letzten Wiederholung erfolgte eine Zugabe von je 200 μL Puffer AL und Ethanol. Diese Mischung wurde dann auf DNeasy Mini Zentrifugensäulen mit Sammelröhrchen übertragen (1 Minute bei 6000 x g). Der Durchfluss im Sammelröhrchen wurde verworfen. Die Säule wurde anschließend mit 500 μL Puffer AW1 gewaschen (1 Minute, 6000 x g) und der Durchfluss erneut verworfen. 500 μL von Puffer AW2 dienen einer weiteren Reinigung (3 Minuten, 18.400 x g). 200 μL Puffer AE wurden für eine Minute auf der Säule inkubiert und dienen anschließend zur Elution der DNA von der Säule in ein frisches Sammelröhrchen (1 Minute, 6000 x g). Die Elution mit AE-Puffer konnte wiederholt werden, um eine bessere Ausbeute zu erzielen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Eluat 1:100 mit AE-Puffer verdünnt und im Photometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Ein OD_{260} -Wert von 1 entspricht 50 ng/mL DNA (Lottspeich and Engels, 2012). Zur Konzentrationsbestimmung wurde entweder ein reguläres Photometer benutzt oder ein NanoDrop 1000.

6.8 Sondendesign

Es gibt zwei verschiedene prinzipielle Ansätze:

- 1.) Zur Identifikation einer Bakterienspezies kann eine phylogenetische Untersuchung durchgeführt werden. Für Bakterien gibt es einen Stammbaum, der sich aus den Sequenzen der 16S rRNA des Bakterienribosoms ableiten lässt (Abb. 50). Anhand der Sequenz kann ein Bakterium in diesen Stammbaum eingeordnet werden und somit bestimmt werden, um welches

und ob es sich um ein humanpathogenes Bakterium handelt (Abb. 51) (Ludwig et al., 2004).

- 2.) Der zweite Ansatz nutzt die DNA-Sequenz pathogenitätsrelevanter Proteine, um eine Humanpathogenität in einer Probe nachzuweisen. Aufgrund horizontalen Gentransfers ist es zweitrangig, um welche Bakterienspezies es sich handelt. Entscheidend ist, ob sie aktive Pathogenitätsfaktoren besitzt oder nicht. Horizontaler Gentransfer kann Sequenzen von Pathogenitätsfaktoren auch auf Spezies übertragen, die bislang nicht humanpathogen waren (Dobrindt and Hacker, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Varianten betrachtet, schließlich aber die zweite Variante verwendet, da diese eine gezielte Suche nach Pathogenitätsfaktoren ermöglicht.

6. Experimenteller Teil

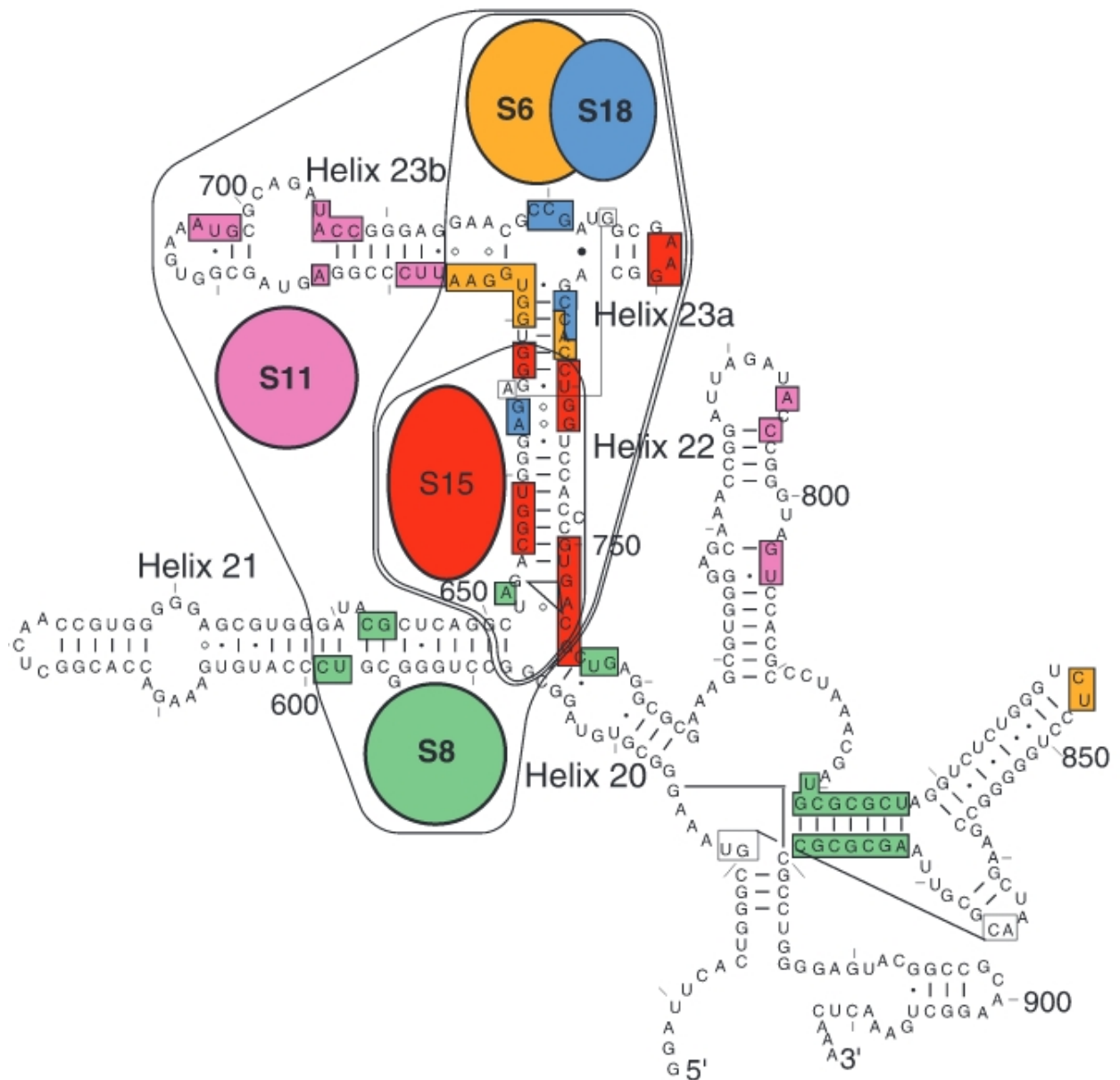


Abb. 50: 16S rRNA aus *T. thermophilus* mit den angelagerten 30S-Untereinheit-Proteinen des Ribosoms (Agalarov et al., 2000).

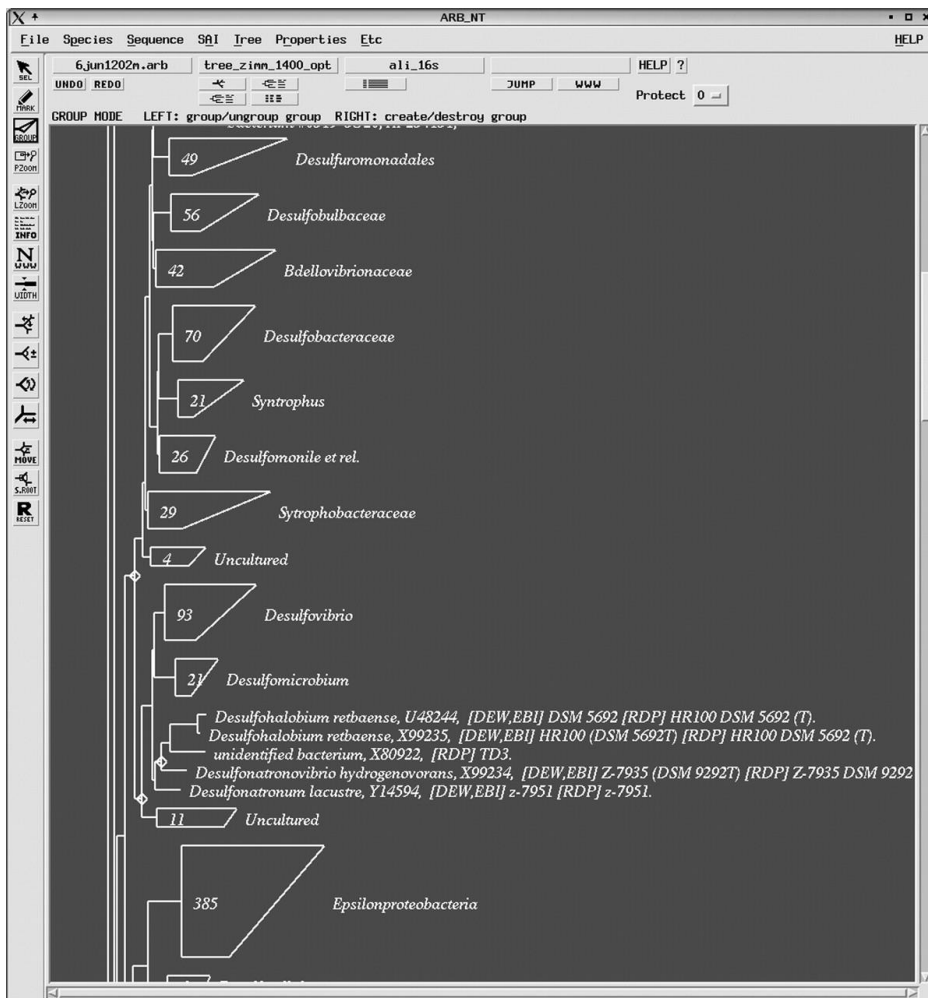


Abb. 51: Visualisierung eines Stammbaumes basierend auf 16S rRNA-Sequenzen (Ludwig et al., 2004).

Um geeignete Zielsequenzen zu identifizieren, konnte auf die freizugängliche Literatur zugegriffen werden. Mit Hilfe von Sequenzalignmentprogrammen wie ARB (Ludwig et al., 2004) oder der Universal Probe Library von Roche (www.universalprobelibrary.com) konnten schließlich die Detektionssonden und Primer genau bestimmt werden (Roche Diagnostics (Hrsg.), 2013b). Diese Programme ermöglichten auch die Berücksichtigung von potentiellen, sequenzbedingten Sekundärstrukturen innerhalb der einzelnen Sonde (Abb. 52). Sekundärstrukturen sind unerwünscht, da sie die Bindung der Analytmoleküle an die Sonde verhindern. Die richtige Wahl der Sondensequenz und eine stringente

6.9 Realtime-PCR mit Hydrolysesonde

Als erste PCR-Methode wurde eine PCR mit Hydrolysesonde verwendet. Die ersten Analysen basierten auf etablierten Nachweissystemen in der Trinkwasseranalytik. Hier wurden die beiden Enzyme β -D-Galactosidase (Gen: *lacZ*) und das Enzym β -D-Glucuronidase (Gen: *uidA1*) als Zielstrukturen verwendet. Außerdem sollte eine Analyse des humanpathogenen *E. coli* O157:H7 ermöglicht werden, indem das Protein Shiga-like Toxin 2 (Gen: *stx2A*) nachgewiesen wurde. Für die Durchführung der späteren Analyse auf einem Chemilumineszenz-Mikroarray wurden die Rückwärtsprimer am 5'-Ende biotinyliert. Das Konjugat aus Meerrettichperoxidase und Streptavidin band an das Biotin und lieferte somit ein ortsabhängiges Signal. Die Primer-Sequenzen können aus Tabelle 23 abgelesen werden.

Tabelle 23: Primersequenzen der ausgewählten Gene.

Zielgen	Primersequenz
<i>lacZ</i> FWD	5'-CTGGAATTCCGCCGATACT-3'
<i>lacZ</i> REV	5'-Biotin-TTTCCATATGGGGATTGGTG-3'
<i>uidA1</i> FWD	5'-CGGTTTCGTTGGCAATACTC-3'
<i>uidA1</i> REV	5'-Biotin-CTGATAGCGCGTGACAAAAA-3'
<i>stx2A</i> FWD	5'-GCAATGTGCTTCCGGAGTAT-3'
<i>stx2A</i> REV	5'-Biotin-GCAATGTGCTTCCGGAGTAT-3'

Die ausgewählten Sonden sind in Tabelle 24 zu sehen.

6. Experimenteller Teil

Tabelle 24: Sequenzen der ausgewählten Sonden.

Hydrolysesonde	Sequenz
Sonde für <i>lacZ</i>	5'-FRET-Donor-GCTCCAGT-FRET-Akzeptor-3'
Sonde für <i>uidA1</i>	5'-FRET-Donor-CATCACCA-Akzeptor-3'
Sonde für <i>stx2A</i>	5'-FRET-Donor-GGAGAGGA-Akzeptor-3'

Für die PCR-Reaktion wurden die in Tabelle 25 aufgeführten Reagenzien auf Eis in eine 96-Well-Platte pipettiert und vermischt.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Mischung für die Realtime-PCR mit Hydrolysesonde.

Volumen eines Ansatzes:	20 µL
H ₂ O	4,4 µL
Master Mix	10 µL
Primer FW (Stammlösung: 20 µM)	0,2 µL
Primer REV (Stammlösung 20 µM)	0,2 µL
Probe (Stammlösung: 10 µM)	0,2 µL
DNA (verschiedener Konzentrationen)	5 µL

Anschließend wurde die Platte mit einer Folie verschlossen und kurz anzentrifugiert. Die Auftragung der unterschiedlichen Proben erfolgte jeweils als Triplikate, wodurch eine eventuelle Schwankung der Werte durch Berechnung eines Mittelwertes ausgeglichen werden konnte. Die Realtime-PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

- 1.) 10 Minuten bei 95 °C
- 2.) 45 Zyklen mit je:
 - 10 Sekunden bei 95 °C
 - 25 Sekunden bei 60 °C
 - 1 Sekunden bei 72 °C (Fluoreszenzmessung)
- 3.) 10 Sekunden bei 40 °C

Die Auswertung der Daten erfolgte durch die LightCycler 480 Software. Es wurde die Auswertungsmethode „*Absolute Quantification Second Derivative Max*“ verwendet. Die eingesetzte Methode zur Berechnung des C_p -Wertes wird als „*2nd derivative maximum*“-Methode bezeichnet, weil sie das Maximum der zweiten Ableitung der sigmoidalen Kurve bestimmt (Pfaffl, 2001, 2004). Nach den ersten Amplifikationszyklen erreicht das Signal einen detektierbaren Wert und geht in den exponentiellen Bereich der Kurve über. Diese Stelle wird als C_p -Wert (*crossing point*) bezeichnet.

6.10 Realtime-PCR mit SYBR Green

Alle PCR-Reaktionen wurden auf einem LightCycler 480 von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Für den Reaktionsmix wurden die Empfehlungen des Herstellers wie folgt in Tabelle 26 umgesetzt.

6. Experimenteller Teil

Tabelle 26: Zusammensetzung der Mischung für die Realtime-PCR mit SYBR Green.

Volumen eines Ansatzes:	20 µL
<hr/>	
<i>SYBR Green Master I Mix</i>	10 µL
Primer FW (Stammlösung: 20 µM)	0,2 µL
Primer REV (Stammlösung 20 µM)	0,2 µL
Zelllösung aus der Verdünnungsreihe	9,6 µL

Für das Thermocycling wurde folgendes Protokoll verwendet:

- 1.) 15 Minuten bei 95 °C
- 2.) 45 Zyklen mit je:
 - 10 Sekunden bei 95 °C
 - 25 Sekunden bei 60 °C
 - 1 Sekunden bei 72 °C (Fluoreszenzmessung)
- 3.) 10 Sekunden bei 40 °C

Als Primer wurden die folgenden Sequenzen verwendet:

Legionella pneumophila

mip FWD primer 5'-Digoxigenin-ACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAAC-3'

mip REV primer 5'-Biotin-GTACGCTTTGCCATCAAATCTTTCTGAAAC-3'

Salmonella Typhimurium

hilA FWD Primer 5'-digoxigenin-TCTTTTGCTCAGATGTATTCCCGGACTTC-3'

hilA REV Primer 5'-biotin-AGCTCGCTAATCTGCTTTGTGTCCC-3'

Campylobacter jejuni

hipO FWD Primer 5'-digoxigenin-TGGCGCTCTAAATCTTTATTTTCAACCTGC-3'

hipO REV Primer 5'-biotin-CCTTAGCACCAACCCAAACCCTCTTC-3'

Escherichia coli O157:H7

stx1A FWD Primer 5'-digoxigenin-TCTGGATTTAATGTTCGCATAGTGGAACCTC-3'

stx1A Rev Primer 5'-biotin-TAACATCGCTCTTGCCACAGACTGC-3'

Die Länge der Amplifikationsprodukte waren 56 Nukleotide für *C. jejuni*, 57 Nukleotide für *S. Typhimurium*, 61 Nukleotide für *E. coli* O157:H7, und 61 Nukleotide für *L. pneumophila*. Nach der Amplifikation wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die LightCycler 480 Software. Es wurde die Auswertungsmethode „*Absolute Quantification Second Derivative Max*“ verwendet. Die eingesetzte Methode zur Berechnung des C_p -Wertes wird als „*2nd derivative maximum*“-Methode bezeichnet, weil sie das Maximum der zweiten Ableitung der sigmoidalen Kurve bestimmt (Pfaffl, 2001, 2004). Nach den ersten Amplifikationszyklen erreicht das Signal einen detektierbaren Wert und geht in den exponentiellen Bereich der Kurve über. Diese Stelle wird als C_p -Wert (*crossing point*) bezeichnet.

6.11 Multiple Displacement Amplification

Für diese Amplifikation wurde die Anleitung des REPLI-g UltraFast Mini Kit von Qiagen verwendet (Qiagen (Hrsg.), 2006a). Zunächst mussten dafür die Puffer DLB, D1 und N1 vorbereitet werden. DLB wurde mit 500 μ L nukleotidfreiem Wasser verdünnt. 5 μ L Puffer DLB und weitere 35 μ L Wasser ergaben den Puffer D1. 8 μ L *stop solution* und 72 μ L Wasser ergaben den Puffer N1.

1 μL einer DNA-Lösung wurden mit 1 μL Puffer D1 in einem Eppendorfreaktionsgefäß inkubiert (3 Minuten, RT). Dieser Lösung wurden anschließend 2 μL Puffer N2 hinzugefügt, vermischt und anzentrifugiert. Die Zugabe von 15 μL REPLI-g UltraFast Reaktionspuffer und 1 μL REPLI-g UltraFast DNA-Polymerase startete die Amplifikation (1,5 Stunden, 30 °C). Die Reaktion wurde durch eine Zerstörung der DNA-Polymerase gestoppt (3 Minuten, 65 °C). Anschließend wurde das Reaktionsprodukt bei -20 °C gelagert.

6.12 GenomePlex Whole Genome Amplification

Für die Amplifikation wurde die Anleitung des GenomePlex Whole Genome Amplification Kits von Sigma-Aldrich verwendet (Sigma-Aldrich (Hrsg.), 2007). Die Reaktion wurde mit 10 μL DNA-Lösung und 1 μL *Fragmentation Buffer* (10x) gestartet (4 Minuten, 94 °C) und danach auf Eis abgestoppt. Dieser Lösung wurden 2 μL *Library Preparation Buffer* (1x) und 1 μL *Library Stabilization Solution* hinzugefügt (2 Minuten, 95 °C). Danach wurde die Reaktion wieder auf Eis abgestoppt. Im Anschluss an die Zugabe von 1 μL *Library Preparation Enzyme* wurde folgendes Programm zur Bildung der *Library* benutzt:

- 1.) 20 Minuten bei 16 °C
- 2.) 20 Minuten bei 24 °C
- 3.) 20 Minuten bei 37 °C
- 4.) 5 Minuten bei 75 °C
- 5.) Auf 4 °C abkühlen

Im nächsten Schritt wurden 7,5 μL *Amplification Master Mix*, 47,5 μL *Nuclease Free Water* und 5,0 μL WGA DNA-Polymerase hinzugefügt, durchmischt (Vortexer) und

zentrifugiert. Anschließend wurde im Thermocycler folgendes Temperaturprogramm durchgeführt:

- 1.) 3 Minuten bei 95 °C
- 2.) 14 Zyklen mit je:
 - 15 Sekunden bei 94 °C
 - 5 Minuten bei 65 °C
- 3.) 10 Sekunden bei 40 °C

Die anschließende Lagerung des Amplifikationsproduktes erfolgte bei -20 °C.

6.13 Einzelstrangabtrennung mittels μ Bead-Assay

Eine Säule, bestehend aus Eisenkugeln mit einem Kunststoffüberzug, wurde in einem permanenten Magnetfeld fixiert und mit 100 μ L Äquilibrierpuffer, sowie mit 200 μ L PBS-Puffer befeuchtet. Die in der PCR-Reaktion amplifizierte DNA wird nun aus der PCR-Platte in ein Reagenzglas überführt. Dazu wurden aus der 96-Well-PCR-Platte drei gleiche Ansätze zu je 20 μ L, also ein Triplikat mit einem Gesamtvolumen von 60 μ L, in ein Reagenzglas pipettiert. Das Reagenzglas wurde verschlossen und für 10 Minuten im Wasserbad auf 98 °C erhitzt. Die hohe Temperatur denaturiert die DNA-Doppelstränge. Es bildeten sich DNA-Einzelstränge, die entweder eine Biotin- oder Digoxigeninmarkierung hatten. Anschließend wurde das Reagenzglas anzentrifugiert und auf Eis gestellt. In die denaturierte Lösung wurden 100 μ L Bead-Suspension gemischt und dieses Gemisch schließlich auf die Säule im Magnetfeld aufgetragen. Der Durchlauf und das Eluat wurden gemeinsam in einem frischen Reagenzglas gesammelt. Eluiert wurde mit 20 Tropfen kochendem PBS-Puffer (dies entspricht 400 - 500 μ L). Die entstandene Probe wurde mit PBS-

6. Experimenteller Teil

Puffer auf 735 μL aufgefüllt und bis zur zeitnahen Verwendung im DNA-Mikroarrayassay auf Eis gestellt.

6.14 DNA-Mikroarray-Auslesegerät

6.14.1 Aufbau

Für den DNA-Mikroarray-Aufbau wurde ein modifiziertes PASA-System verwendet (Knecht et al., 2004). Das System bestand aus einem automatisierten Reagenzienlauf, einem Drehventil und einer variablen Flusszelle wie in Abb. 53 und Abb. 54 gezeigt.

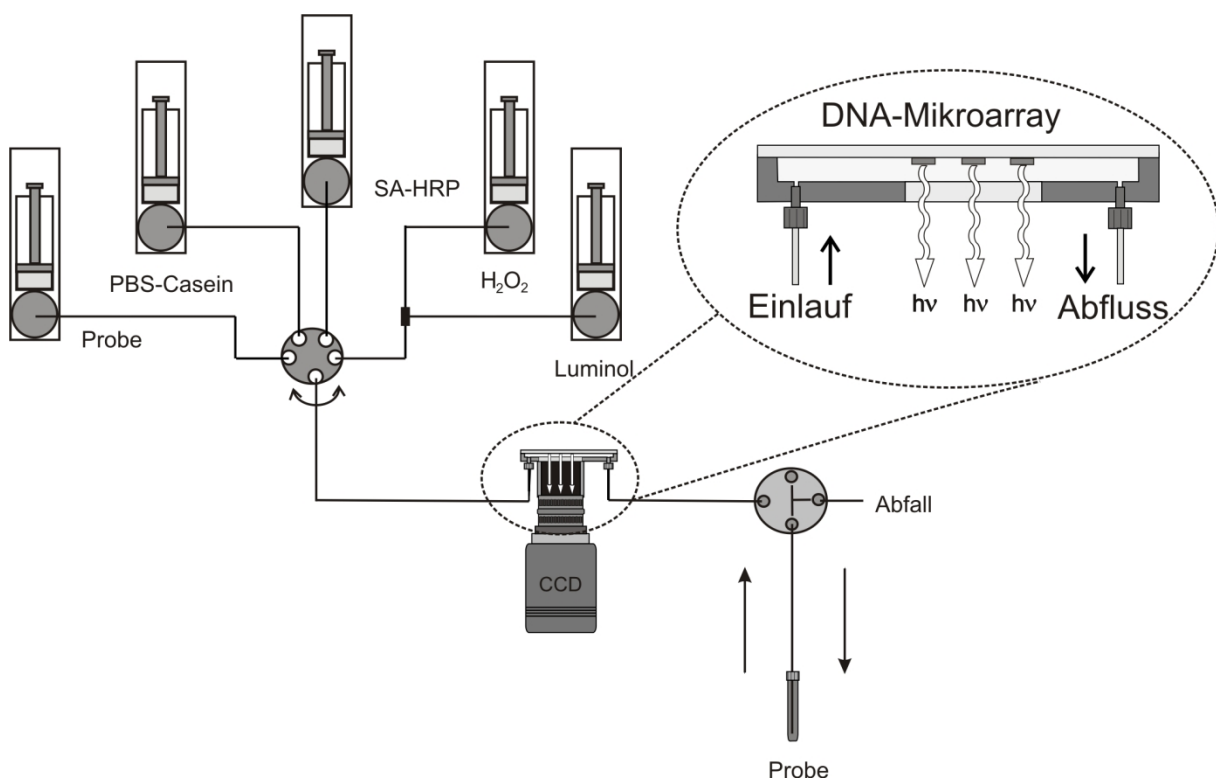


Abb. 53: Fließschema des automatischen CL-DNA-Mikroarray-Auslesegeräts. Im vergrößerten Ausschnitt ist die Flusszelle dargestellt.

Der Chip und die Kamera befanden sich in einem lichtdichten Gehäuse. Die Flusszelle besaß eine Höhe von $142\ \mu\text{m}$ und ein Volumen von $62\ \mu\text{L}$. Der Glasobjektträger wurde mittels einer doppelseitigen Klebefolie auf einer Polycarbonatplatte aufgeklebt. Diese Platte war mit einem Zufluss und einem Abfluss ausgestattet. Die Flusszelle wurde in das Gerät eingelegt und zum Abdichten beschwert, sowie von Lichteinfluss abgeschirmt.

Die Pumpen wurden über das Programm Immunomat V7 (Atto-tec GmbH) angesteuert, die Stellung des Drehventils erfolgte per Hand. Die Signale wurden über das Programm Spot Image Processor 0.2 (von Y. und X. Karsunke) ausgewertet.

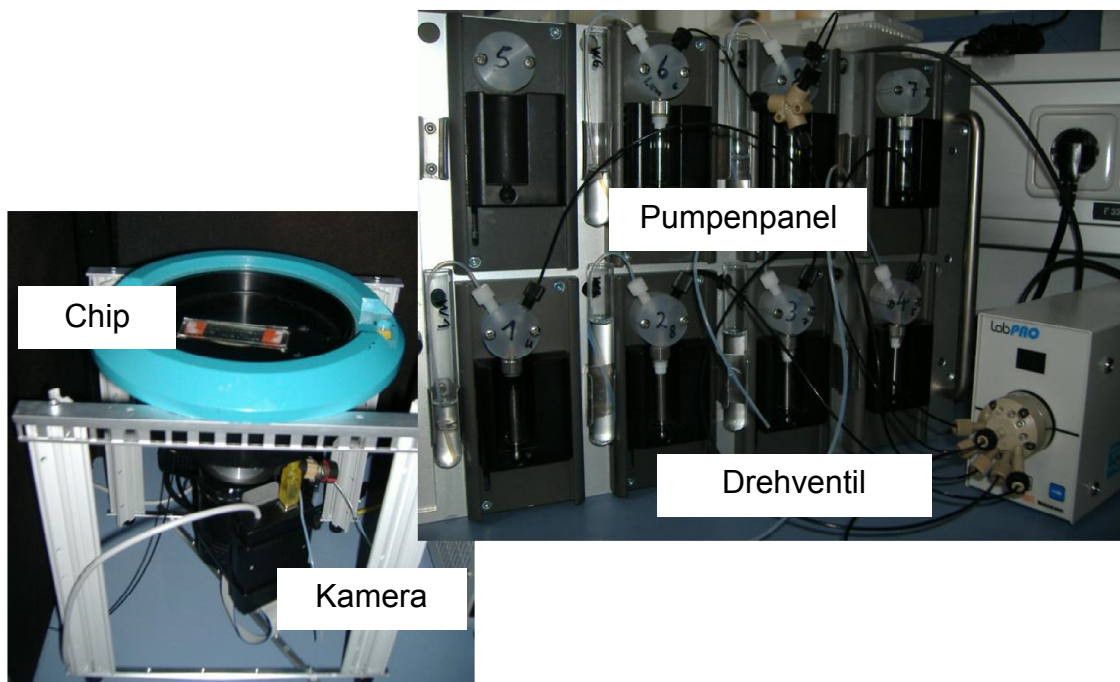


Abb. 54: Zwei Bilder des Aufbaus bestehend aus dem Pumpenpanel, dem Drehventil und der Chiphalterung mit Kamera.

6.14.2 Ablaufprotokoll

Zunächst wurde die Flusszelle mit Waschpuffer geflutet. Anschließend lief folgendes Protokoll ab:

6. Experimenteller Teil

20 x 735 μL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Messprobe (Die Probe wurde wiederholt über den Mikroarray gepumpt, je 20 μL mit einer Inkubationspause von fünf Sekunden)

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Waschpuffer

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ SA-HRP-Lösung/Anti-Dig-Antikörper-HRP-Konjugatlösung

2 x 1 mL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Waschpuffer

je 1 x 600 μL mit 20 $\mu\text{L/s}$ Luminol und H_2O_2

90 Sekunden Aufnahme des Chemilumineszenzsignals

3 x 1 mL mit Regenerationspufferprogramm

Im Regenerationspufferprogramm wurden abwechselnd 20 μL Regenerationspuffer gepumpt, dann eine Sekunde gewartet. Der Puffer konnte so die Ziel-DNA von den Fängersonden auf dem Mikroarray vollständig ablösen. Falls der Chip nicht erneut verwendet werden sollte, konnte als Alternative zur Regeneration das gesamte System gründlich mit Wasser und Hellmanex gespült und gereinigt werden.

6.14.3 Oberflächenchemie

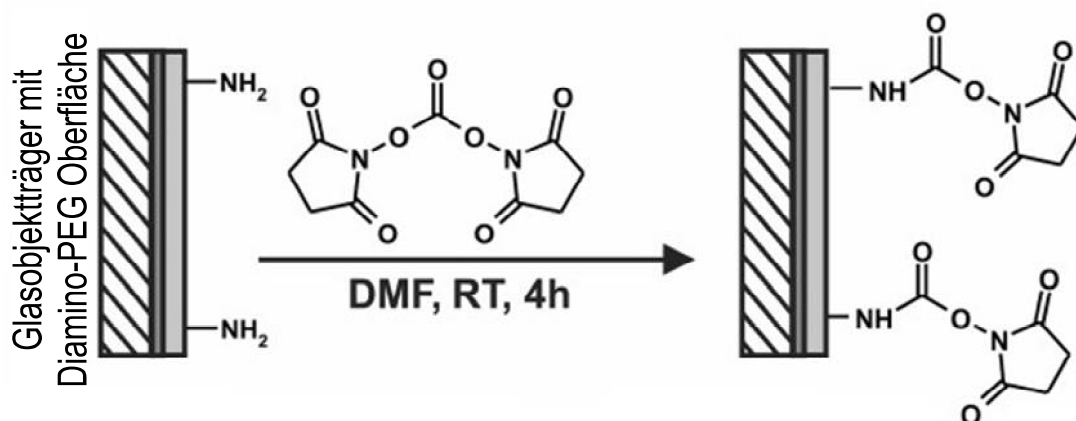


Abb. 55: Schema der Aktivierung der Diamino-PEG-Oberfläche (Quelle: Grafiksammlung am Institut für Wasserchemie).

Für die DNA-Mikroarrays wurde eine Diamino-PEG-Oberflächenchemie verwendet. Das Schema der Aktivierung dieser Oberfläche für die kovalente Anbindung der DNA-Sonden ist in Abb. 55 zu sehen (Wolter et al., 2007).

6.14.4 Vorbehandlung

Zunächst mussten die Objektträger gereinigt und die für die Silanisierung benötigten freien Hydroxylgruppen erzeugt werden. Die Glas-Objektträger wurden über Nacht in Hellmanex geschüttelt und anschließend 30 Minuten lang im Ultraschallbad gereinigt. Die Hellmanexreste wurden mit Millipore-Wasser abgespült und die Objektträger mit einer Lösung aus HCl (37 %) und Methanol eine Stunde lang geschüttelt. Das Mischungsverhältnis aus HCl und Methanol betrug 1:1. Auch diese Lösungsreste wurden mit Wasser entfernt. Anschließend wurden die Objektträger für eine Stunde in 99 %-iger H_2SO_4 geschüttelt. Die Objektträger wurden danach mit Wasser gereinigt, im Stickstoffstrom vorgetrocknet und abschließend für 15 Minuten bei 70 °C im Trockenschrank getrocknet.

6.14.5 Silanisierung

Durch die Silanisierung entstanden Epoxy-Reste auf der Glasoberfläche. 500 μ L 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) wurden zwischen zwei Objektträger gegeben und die erhaltenen Sandwiches wurden in einer geschlossenen Glaskammer inkubiert (1 Stunde, RT). Danach wurden die Sandwiches in Ethanol getrennt und die Glas-Objektträger sukzessive je für 15 Minuten mit Ethanol, Methanol und Ethanol gewaschen. Danach wurden sie erst im Stickstoffstrom, anschließend 15 Minuten lang bei 70 °C im Trockenschrank getrocknet und im Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert.

6.14.6 Vorbereitung und Aktivierung der Diamino-PEG-Oberfläche

Die Epoxyreste können mit Diamino-PEG nukleophil angegriffen werden, um eine neue Oberfläche mit Aminoresten zu bilden. Geschmolzenes Diamino-PEG wurde zwischen zwei silanisierte Objektträger eingebracht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 105 °C im Trockenschrank. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger in destilliertem Wasser getrennt und für 10 Minuten im Ultraschallbad ebenfalls mit destilliertem Wasser gesäubert. Danach erfolgte die Trocknung im Stickstoffstrom und für 15 Minuten bei 70 °C im Trockenschrank. Die beschichteten Objektträger können bei Raumtemperatur im Exsikkator gelagert werden.

Diese Oberfläche wird im letzten Schritt schließlich mit Di(N-succinimidyl)-Carbonat (DSC) behandelt. Um die NHS-Oberfläche zu aktivieren, wurden 80 mg DSC und 4 mg Dimethylaminopyridin in 1,6 mL wasserfreiem Dimethylformamid und 125 µL Triethylamin gelöst. 600 µL dieser Lösung wurden zwischen zwei silanisierte und mit Diamino-PEG behandelte Glasobjektträger gegeben. Die Aktivierung erfolgte für vier Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Objektträger mit Methanol im Ultraschallbad gereinigt. Danach wurden die Objektträger im Stickstoffstrom getrocknet.

6.14.7 DNA-Mikrodosierung

Die Spots für den DNA-Mikroarray wurden mit einem BioOdyssey Calligrapher Miniarrayer aufgetragen. Die DNA-Lösung wurde im Kontaktverfahren mit einer TeleChem Stealth SNS9 Nadel aufgebracht. Im Gerät wurde eine Luftfeuchtigkeit von 35 % eingestellt. Der Spotter stand in einem klimatisierten Raum mit einer vorgegebenen Temperatur von 20 °C, von der nicht abgewichen wurde. Nach dem Spotten fand die Anbindereaktion der DNA-Sonden auf der aktivierten Glasobjektträgeroberfläche statt (16 Stunden, 60 °C). Anschließend wurden unspezifische Bindungen mit einem Tris-Puffer geblockt. Zur Erhöhung der Signalstabilität während der Regenerationsvorgänge wurden die Objektträger in Wasser gelagert (12 Stunden, 4 °C), wie es in Kapitel 3.1.3 beschrieben wurde. Nach

der Trocknung im Stickstoffstrom konnten die Objektträger bei -20 °C gelagert werden.

Zum Blocken wurde folgende Schrittabfolge verwendet:

- 1.) 1 Minute vortexen in Tris-HCl (pH 8,5)
- 2.) 1 Minute vortexen in Millipore Wasser
- 3.) 1 Minute vortexen in Methanol

Die gespotteten Sonden und Referenzsubstanzen sind in Tabelle 27 abzulesen.

Tabelle 27: Gespottete Fängersonden und Referenzsubstanzen.

Benennung	Sequenz
10 mg/mL <i>lacZ</i> in Wasser	5'-Amino-C6-CACCAATCCCCATATGGAAAA-3'
10 mg/mL <i>uidA1</i> in Wasser	5'-Amino-C6-TTTTTGTCACGCGCTATCAG-3'
10 mg/mL <i>R. planticola</i> 16S <i>rRNA</i> in Wasser	5'-Amino-C6-CTGGCAAGCTTGAGTCTTGTAGAGG-3'
Wasser	Negativkontrolle
10 mg/mL Aminobiotin	Positivkontrolle
10 mg/mL <i>hipO</i> in Wasser	5'-Amino-C6-CCTTAGCACCAACCCCTCTTC-3'
10 mg/mL <i>hilA</i> in Wasser	5'-Amino-C6-AGCTCGCTAATCTGCTTTGTGTCCC-3'
10 mg/mL <i>stx1A</i> in Wasser	5'-Amino-C6-TAACATCGCTCTTGCCACAGACTGC-3'
10 mg/mL <i>mip</i> in Wasser	5'-Amino-C6- GTACGCTTTGCCATCAAATCTTTCTGAAAC-3'

6. Experimenteller Teil

Um eine Kontrolle der Funktionsfähigkeit des Chips zu haben, wurde entweder Aminobiotin verwendet oder später dann der direkte synthetische Gegenstrang zur *Raoultella*-Sonde (Tabelle 28).

Tabelle 28: *R. planticola* antisense-Strang zur Validierung der Funktionsfähigkeit des Mikroarrays.

Benennung	Sequenz
10 mg/mL <i>R. planticola</i> 16S rRNA Antisense	5'-Biotin-CCTCTACAAGACTCAAGCTTGCCAG-3'

6.14.8 Flusszelle

Die Grundfläche der Flusszelle ist in Abb. 56 dargestellt. Der Innendurchmesser der Leitungen betrug jeweils 0,5 mm. Die Höhe der Flusszelle betrug 0,14 mm.

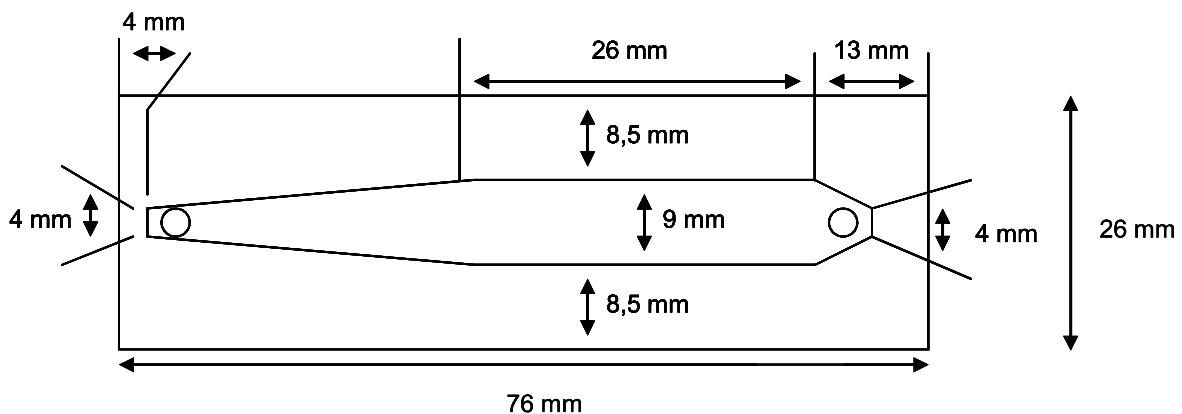


Abb. 56: Grundfläche der Flusszelle (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).

6.15 Statistische Angaben und Auswertung

Die Parameter n und m sind wie folgt definiert:

Definition für n : Anzahl der im Diagramm gezeigten Messpunkte.

Definition für m : Anzahl der zur Berechnung der Standardabweichung verwendeten Messungen.

Für die Berechnung der Nachweisgrenzen wurden die folgenden Wege genutzt:

Aus 3 Negativkontrollen wurde der Durchschnittswert gebildet. Dazu wurde die 3-fache Standardabweichung addiert (Long and Winefordner, 1983). War dies mangels Negativkontrollen nicht möglich, wurde auf die Bestimmung der Nachweisgrenze durch das Kalibrierverfahren zurückgegriffen. Beim Kalibrierverfahren wird die Nachweisgrenze als das 3,3-Fache der Verfahrensstandardabweichung angesehen. Die Verfahrensstandardabweichung ist der Quotient aus der Reststandardabweichung (s_y) und der Steigung der Geraden b (Steigung der Fit-Gerade) in der Nähe der Nachweisgrenze (Molta and Telghederb, 2010).

7. Abkürzungsverzeichnis

a.u.	<i>arbitrary units</i>
Bp	Basenpaare
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CL	Chemilumineszenz
CP	Carbonatpuffer
C _p	<i>Crossing point</i>
DAEC	<i>Diffusely adherent E. coli</i>
Diamino-PEG	Polyethylenglykoldiamin (2000 g/mol)
DSC	Di(N-succinimidyl) carbonat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EAEC	<i>Enteraggregative E. coli</i>
EHEC	<i>Enterohemorrhagic E. coli (E. coli O157:H7)</i>
EIEC	<i>Enteroinvasive E. coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FWD primer	Vorwärtsprimer
GGW	Gleichgewicht
GOPTS	3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan
HRP	<i>Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)</i>
K _d	Dissoziationskonstante
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium
LOD	<i>Limit of detection</i> (Nachweisgrenze)
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>

MDA	<i>Multiple Displacement Amplification</i>
mg	Milligramm (1/1.000 Gramm)
µL	Mikroliter (1/1.000.000)
mL	Milliliter (1/1.000 Liter)
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid
n	Zahl der unabhängige Messungen
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nt	Nukleotide
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
PBS	<i>Phosphate-Buffered-Saline</i>
PEG	Polyethylenglykol
q	Qualitätsfaktor (Standardabweichung bei n = 1)
REV primer	Rückwärtsprimer
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Realtime-PCR	<i>Realtime-Polymerase Chain Reaction</i>
SA-HRP	<i>Streptavidine-Horseradish Peroxidase</i>
SCL	Summe des Chemilumineszenzsignals aus einem Spot
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>
S/N	<i>signal-to-noise ratio</i> (Signal-Rausch-Verhältnis)
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
S. Typhimurium	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium
Taq Polymerase	Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TIRF	<i>Total Internal Reflectance Fluorescence</i>
TMP	Testmittelpunkt
Tris	tris(Hydroxymethyl)-aminoethan
Tris-HCl	tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
w/v	<i>weight per volume</i>

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Beitrag mobiler genetischer Elemente zur Entstehung pathogener <i>E. coli</i> (Kaper et al., 2004).....	3
Abb. 2: Zielsetzung und Überblick zu dieser Arbeit (Berg et al., 2002; Brinkmann, 2005; Roche Diagnostics (Hrsg.), 2013a).....	7
Abb. 3: Schema des Nachweises von β -Galactosidase mit ONPG (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).....	11
Abb. 4: Schema des Nachweises von β -Glucuronidase mit MUG (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).....	16
Abb. 5: Pathogene Mechanismen von Durchfall auslösenden <i>E. coli</i> . AAF, aggregative adherence fimbriae; BFP, bundle-forming pilus; CFA, colonization factor antigen; DAF, decay-accelerating factor; EAST1, enteroaggregative <i>E. coli</i> ST1; LT, heatlabile enterotoxin; ShET1, Shigella enterotoxin 1; ST, heat-stable enterotoxin (Kaper et al., 2004).....	18
Abb. 6: Aufnahme und Abgabe von Stx an einer Paneth-Zelle (Croxen and Finlay, 2009).	22
Abb. 7: Ausbildung der <i>L. pneumophila</i> -Replikationsvakuole (Isberg et al., 2009). (LCV, <i>Legionella containing vacuole</i>)	25
Abb. 8: Weg der Salmonellen bei oraler Aufnahme (Haraga et al., 2008).	30
Abb. 9: Natürliche Reservoirs und Infektionswege für <i>C. jejuni</i> (Young et al., 2007).34	
Abb. 10: Beispielhafte Kombination einer Mikrofiltration und einer Affinitätsfiltration als Probenvorbereitung für einen DNA-Mikroarray (Grafiksammlung des Instituts für Wasserchemie).....	38
Abb. 11: Realtime-PCR mit <i>SYBR Green</i> -Farbstoff für das Gen <i>uidA</i> . 10^3 bis 10^1 Kopien sind deutlich als Amplifikationskurven zu erkennen. Die Negativkontrolle bleibt negativ (grüne Basislinie).....	48
Abb. 12: Schema der Funktionsweise der DNA-Sonden (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).....	50

Abb. 13: Realtime-PCR mit einer Hydrolysesonde für das Gen <i>uidA</i> . Es wird eine Kopienzahl von 10^9 bis 10^2 , sowie eine Negativkontrolle eingesetzt. Die Negativkontrolle überlappt mit den Proben, die 10^2 Kopien enthalten.....	51
Abb. 14: Ablauf einer digitalen Tropfen-PCR (Pinheiro et al., 2012).....	52
Abb. 15: Prinzip der <i>Multiple Displacement Amplification</i> (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).....	53
Abb. 16: Schema der <i>GenomePlex Whole Genome Amplification</i> (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).....	56
Abb. 17: Schematischer Aufbau eines DNA-Mikroarrays (Quelle: Grafiksammlung am Institut für Wasserchemie).....	57
Abb. 18 Assayschema für den Nachweis doppelsträngiger DNA (Noguera et al., 2011).	68
Abb. 19: Vergleich verschiedener Konzentrationen der <i>R. planticola</i> (Gen: <i>16S rRNA</i>) Sonde in Wasser auf einer Diamino-PEG-Oberfläche (10, 1, 0,1, 0,01 mg/mL). Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10^{-3} mg/mL eingesetzt.	73
Abb. 20: Aufschmelzen von doppelsträngiger <i>R. planticola</i> (Gen: <i>16S rRNA</i>) DNA, um die Regenerierbarkeit zu testen (die Sonde wurde mit einer Konzentration von 10 mg/mL in Wasser auf einer Diamino-PEG-Oberfläche gespottet). Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10^{-3} mg/mL eingesetzt (n = 6, m = 6).....	75
Abb. 21: Alkalische Regeneration von <i>R. planticola</i> (Gen: <i>16S rRNA</i>) DNA-Doppelsträngen (10 mg/mL in Wasser auf einer Diamino-PEG-Oberfläche). Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10^{-3} mg/mL eingesetzt (n = 5, m = 6).....	76
Abb. 22: Saure Regeneration von <i>R. planticola</i> (Gen: <i>16S rRNA</i>) DNA-Doppelsträngen (1 mg/mL in Wasser auf einer Diamino-PEG-Oberfläche). Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10^{-3} mg/mL eingesetzt (n = 7, m = 6).....	78

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 23: Signalstabilität von <i>R. planticola</i> (Gen: <i>16S rRNA</i>) DNA-Doppelsträngen auf einer Diamino-PEG-Oberfläche während saurer Regenerationen. Der Mikroarray wurde 17 Mal regeneriert. Die <i>R. planticola</i> DNA-Sonden wurden mit einer Konzentration von 10 mg/mL in Wasser auf den Mikroarray aufgetragen. Nach dem Mikrodosiervorgang wurde der Mikroarray bei 4 °C für einen Tag in Wasser gelagert. Die Analyt-DNA (biotinylierter 25mer-Gegenstrang) wurde mit einer Konzentration von 10 ⁻³ mg/mL eingesetzt (n = 6, m = 6).....	80
Abb. 24: Schema des Assayprinzips. Drei verschiedene Gene werden auf einem DNA-Mikroarray mittels Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen.	83
Abb. 25: Fluidikschema zum Nachweis biotinylierter, einzelsträngiger DNA.	84
Abb. 26: Kalibrierkurve für das Gen <i>16S rRNA</i> von <i>R. planticola</i> (n = 7, m = 6).....	85
Abb. 27: Übersicht der eingesetzten Methoden zur Amplifikation der DNA von <i>E. coli</i> und <i>L. pneumophila</i>	88
Abb. 28: 1:10.000 Verdünnung als Vorbereitung für eine Quantifizierung mit Realtime-PCR.....	88
Abb. 29: <i>Multiple Displacement Amplification</i> von <i>E. coli</i> -DNA, die mit einer Realtime-PCR (Gen: <i>lacZ</i>) quantifiziert wurde (n = 5, m = 3).....	90
Abb. 30: GenomePlex Whole Genome Amplification von <i>E. coli</i> -DNA, die mit einer Realtime-PCR (Gen: <i>lacZ</i>) quantifiziert wurde (n = 5, m = 3).	92
Abb. 31: Beobachtung einer Realtime-PCR-Amplifikation durch ein Fluoreszenzsignal aus einer Hydrolysesonde. Es sind Amplifikationskurven für die Konzentrationen von 10 ⁶ bis 10 ⁹ Kopien/mL der <i>uidA</i> -DNA aus <i>E. coli</i> dargestellt. .	94
Abb. 32: Realtime-PCR von <i>E. coli</i> -DNA (Gen: <i>lacZ</i>), die mit einer Realtime-PCR (Gen: <i>lacZ</i>) quantifiziert wurde (n = 5, m = 3).	95
Abb. 33: Stopped-PCR (nach 30 Zyklen gestoppt) von <i>L. pneumophila</i> -DNA (Gen: <i>mip</i>), die mit einer Realtime-PCR (Gen: <i>mip</i>) quantifiziert wurde (n = 5, m = 3).	96
Abb. 34: Schema einer Realtime-PCR (a), Stopped-PCR (b), und die Quantifizierung von Amplikons nach einer Stopped-PCR auf einem DNA-Mikroarray (c).	99
Abb. 35: Fließschema des Durchfluss-CL-Mikroarray-Auslesegeräts.	99

Abb. 36: Kalibrierkurve für <i>uidA</i> von <i>E. coli</i> . Die DNA wurde in einer Stopped-PCR-Reaktion amplifiziert und auf einem DNA-Mikroarray quantifiziert (n = 5, m = 3). ..	101
Abb. 37: Ablaufschema von der genomischen DNA bis zu den markierten Einzelsträngen.....	103
Abb. 38: CL-Assay zum Nachweis humanpathogener Bakterien, basierend auf einem Hybridisierungsereignis und einer Antikörpererkennung der Digoxigenin-Markierung.	104
Abb. 39: Fluidik zum Nachweis humanpathogener Bakterien auf einem DNA-Mikroarray.....	105
Abb. 40: Zusammenhang zwischen der Menge eingesetzter Mikropartikel aufgetragen gegen das erreichte CL-Signal (n = 5, m = 6).....	106
Abb. 41: Die Zahl der Probendurchflüsse durch die Inkubationskammer aufgetragen gegen das CL-Signal (n = 5, m = 6).....	107
Abb. 42: Kalibrierkurve für das Gen <i>stx1</i> aus <i>E. coli</i> O157:H7. Die Stopped-PCR wurde nach 30 Zyklen gestoppt und auf einem DNA-Mikroarray quantifiziert (n = 7, m = 6).	108
Abb. 43: Kalibrierkurve von <i>E. coli</i> O157:H7 (Gen: <i>stx1</i>) in einem CL-DNA-Mikroarrayassay, der die Amplifikationsprodukte quantifiziert. Die PCR wurde nach 35 und 30 Zyklen gestoppt (n = 13, m = 3 - 18).....	111
Abb. 44: Kalibrierkurve von PCR-Produkten aus <i>E. coli</i> O157:H7 (Gen: <i>stx1</i>). Auftragung des Fluoreszenzsignals der Stopped-PCR nach 35 Zyklen gegen die Zellkonzentration (n = 7, m = 3).....	111
Abb. 45 Kalibrierkurve von <i>S. Typhimurium</i> (Gen: <i>hilA</i>), die mit einer CL-DNA-Mikroarrayanalyse quantifiziert wurde (n = 7, m = 6).....	113
Abb. 46: Kalibrierkurve von <i>C. jejuni</i> (Gen: <i>hipO</i>), die mit einer CL-DNA-Mikroarrayanalyse quantifiziert wurde (n = 6, m = 6).....	113
Abb. 47: Kalibrierkurve von PCR-Produkten aus <i>S. Typhimurium</i> (Gen: <i>hilA</i>). Auftragung des Fluoreszenzsignals der Stopped-PCR nach 35 Zyklen gegen die Zellkonzentration (n = 8, m = 3).....	114

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 48: Kalibrierkurve von PCR-Produkten aus <i>C. jejuni</i> (Gen: <i>hipO</i>). Auftragung des Fluoreszenzsignals der Stopped-PCR nach 35 Zyklen gegen die Zellkonzentration (n = 7, m = 3).....	114
Abb. 49: Kalibrierkurve von <i>L. pneumophila</i> (Gen: <i>mip</i>), die mit einer CL-DNA-Mikroarrayanalyse quantifiziert wurde (n = 5, m = 6).....	115
Abb. 50: 16S rRNA aus <i>T. thermophilus</i> mit den angelagerten 30S-Untereinheit-Proteinen des Ribosoms (Agalarov et al., 2000).	134
Abb. 51: Visualisierung eines Stammbaumes basierend auf 16S rRNA-Sequenzen (Ludwig et al., 2004).	135
Abb. 52: Sekundärstruktur des FWD-Primers für das Gen <i>mip</i> (OligoAnalyzer 3.1 IDT Technologies).	136
Abb. 53: Fließschema des automatischen CL-DNA-Mikroarray-Auslesegeräts. Im vergrößerten Ausschnitt ist die Flusszelle dargestellt.	144
Abb. 54: Zwei Bilder des Aufbaus bestehend aus dem Pumpenpanel, dem Drehventil und der Chiphalterung mit Kamera.	145
Abb. 55: Schema der Aktivierung der Diamino-PEG-Oberfläche (Quelle: Grafiksammlung am Institut für Wasserchemie).	146
Abb. 56: Grundfläche der Flusszelle (Quelle: Bachelorarbeit Florian Huber).	150

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mikroorganismen als Kontaminanten im Trinkwasser – Überblick aus der deutschen und amerikanischen Trinkwasserverordnung (Bundesministerium für Gesundheit, 2012; Environmental Protection Agency (Hrsg.), 2009).	9
Tabelle 2: Übersicht der Methoden zum Nachweis von coliformen Bakterien.	13
Tabelle 3: Übersicht der Methoden zum Nachweis von <i>R. planticola</i>	15
Tabelle 4: Übersicht der Methoden zum Nachweis von pathogenen <i>E. coli</i>	20
Tabelle 5: Übersicht der Methoden zum Nachweis von <i>E. coli</i> O157:H7.	23
Tabelle 6: Übersicht der Methoden zum Nachweis von <i>L. pneumophila</i>	27
Tabelle 7: Übersicht der Methoden zum Nachweis von <i>S. Typhimurium</i>	32
Tabelle 8: Übersicht der Methoden zum Nachweis von <i>C. jejuni</i>	35
Tabelle 9: Nachweisgrenzen verschiedener PCR-Primer für das Gen <i>invA</i> (Csordas et al., 2004).	36
Tabelle 10: Nachweisgrenzen verschiedener PCR-Primer für das Gen <i>uidA</i> (Maheux et al., 2009).	37
Tabelle 11: Übersicht zur Kombination von Anreicherungsverfahren.	40
Tabelle 12: Methoden zur Lyse von biologischen Zellen.	43
Tabelle 13: Zusammenfassung zu den isothermalen Amplifikationsmethoden.	55
Tabelle 14: Vergleich zwischen Immunoassays und DNA-Assays.	70
Tabelle 15: Vergleich der sauren Regeneration bei 1 mg/mL und 10 mg/mL DNA-Sondenkonzentration.	77
Tabelle 16: Reproduzierbarkeit von Regenerationsversuchen mit DNA-Mikroarrays und der sauren Regenerationsmethode (Vergleiche Abb. 22).	79
Tabelle 17: Signalveränderung durch Lagerung des <i>R. planticola</i> -Mikroarrays in Wasser bei 4 °C.	81
Tabelle 18: Übersicht zu CL-DNA-Mikroarrays.	86
Tabelle 19: Überblick der relevanten Parameter und Zusammenfassung der Ergebnisse.	97

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 20: Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von <i>E. coli</i> O157:H7 unter Verwendung einer Stopped-PCR und eines Durchfluss-CL-DNA-Mikroarray-Auslesegeräts (die PCR wurde nach 30 Zyklen gestoppt).	110
Tabelle 21: Überblick über die Leistungsfähigkeit dieses quantitativen DNA-Mikroarrayassays.	116
Tabelle 22: Kreuzreaktivitäten der Analyt-DNA aus <i>S. Typhimurium</i> mit anderen DNA-Sonden.	117
Tabelle 23: Primersequenzen der ausgewählten Gene.	137
Tabelle 24: Sequenzen der ausgewählten Sonden.	138
Tabelle 25: Zusammensetzung der Mischung für die Realtime-PCR mit Hydrolysesonde.	138
Tabelle 26: Zusammensetzung der Mischung für die Realtime-PCR mit <i>SYBR Green</i>	140
Tabelle 27: Gespottete Fängersonden und Referenzsubstanzen.	149
Tabelle 28: <i>R. planticola</i> antisense-Strang zur Validierung der Funktionsfähigkeit des Mikroarrays.	150

10. Literatur

Adkins, S., and Burmeister, M. (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal. Biochem.* *240*, 17–23.

Agalarov, S.C., Sridhar, G., Prasad, Funke, P.M., Stout, C.D., and Williamson, J.R. (2000). Structure of the S15,S6,S18-rRNA complex: assembly of the 30S ribosome central domain. *Science* *288*, 107–112.

Ageno, M., Dore, E., and Frontali, C. (1969). The alkaline denaturation of DNA. *Biophys. J.* *9*, 1281–1311.

Ahmed, N., Dobrindt, U., Hacker, J., and Hasnain, S.E. (2008). Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 387–394.

Ahmed, W., Tucker, J., Bettelheim, K.A., Neller, R., and Katouli, M. (2007). Detection of virulence genes in *Escherichia coli* of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic *E. coli* in surface waters. *Water Res.* *41*, 3785–3791.

Akiba, T., Koyama, K., Ishiki, Y., Kimura, S., and Fukushima, T. (1960). On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of Shigella. *Jpn. J. Microbiol.* *4*, 219–227.

Akutsu, J.-I., Tojo, Y., Segawa, O., Obata, K., Okochi, M., Tajima, H., and Yohda, M. (2004). Development of an integrated automation system with a magnetic bead-mediated nucleic acid purification device for genetic analysis and gene manipulation. *Biotechnol. Bioeng.* *86*, 667–671.

Algar, W.R., and Krull, U.J. (2010). Multiplexed interfacial transduction of nucleic acid hybridization using a single color of immobilized quantum dot donor and two acceptors in fluorescence resonance energy transfer. *Anal. Chem.* *82*, 400–405.

Allegra, S., Berger, F., Berthelot, P., Grattard, F., Pozzetto, B., and Riffard, S. (2008). Use of flow cytometry to monitor legionella viability. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 7813–7816.

Andresen, D., von Nickisch-Roseneck, M., and Bier, F.F. (2009). Helicase dependent OnChip-amplification and its use in multiplex pathogen detection. *Clin. Chim. Acta* *403*, 244–248.

Applied Biosystems (Hrsg.) (2008). Real-time PCR vs. traditional PCR (Foster City, Ca.: ABI).

- Arora, A., Luong, T.Q., Krüger, M., Kim, Y.J., Nam, C.-H., Manz, A., and Havenith, M. (2012). Terahertz-time domain spectroscopy for the detection of PCR amplified DNA in aqueous solution. *The Analyst* *137*, 575–579.
- Asanov, A., Zepeda, A., and Vaca, L. (2012). A platform for combined DNA and protein microarrays based on total internal reflection fluorescence. *Sensors* *12*, 1800–1815.
- Ashbolt, N.J. (2004a). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* *198*, 229–238.
- Ashbolt, N.J. (2004b). Risk analysis of drinking water microbial contamination versus disinfection by-products (DBPs). *Toxicology* *198*, 255–262.
- Asiello, P.J., and Baemner, A.J. (2011). Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab. Chip* *11*, 1420–1430.
- Bagley, S.T., Seidler, R.J., and Brenner, D.J. (1981). *Klebsiella planticola* sp. nov.: A new species of *enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. *Curr. Microbiol.* *6*, 105–109.
- Barlow, M. (2009). What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *532*, 397–411.
- Bast, E. (Hrsg.) (2012). *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken* (Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).
- Bavykin, S.G., Akowski, J.P., Zakhariev, V.M., Barsky, V.E., Perov, A.N., and Mirzabekov, A.D. (2001). Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 922–928.
- Baxter, M.A., Fahlen, T.F., Wilson, R.L., and Jones, B.D. (2003). HilE interacts with HilD and negatively regulates hilA transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect. Immun.* *71*, 1295–1305.
- Beaucage, S.L., and Iyer, R.P. (1992). Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Tetrahedron* *48*, 2223–2311.
- Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., and Atlas, R.M. (1990). Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 307–314.
- Bej, A.K., DiCesare, J.L., Haff, L., and Atlas, R.M. (1991). Detection of *Escherichia coli* and *Shigella spp.* in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl. Environ. Microbiol.* *57*, 1013–1017.

- Beld, M.J.C. van den, and Reubsaet, F. a. G. (2012). Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *31*, 899–904.
- Bennett, A.R., Davids, F.G., Vlahodimou, S., Banks, J.G., and Betts, R.P. (1997). The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of *Salmonella*. *J. Appl. Microbiol.* *83*, 259–265.
- Bercovici, M., Kaigala, G.V., Backhouse, C.J., and Santiago, J.G. (2010). Fluorescent carrier ampholytes assay for portable, label-free detection of chemical toxins in tap water. *Anal. Chem.* *82*, 1858–1866.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (New York: W. H. Freeman).
- Bi, L., Rao, Y., Tao, Q., Dong, J., Su, T., Liu, F., and Qian, W. (2013). Fabrication of large-scale gold nanoplate films as highly active SERS substrates for label-free DNA detection. *Biosens. Bioelectron.* *43*, 193–199.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* *7*, 1513–1523.
- Bjornsdottir-Butler, K., Jones, J.L., Benner, R.A., and Burkhardt, W. (2011). Quantification of total and specific gram-negative histamine-producing bacteria species in fish using an MPN real-time PCR method. *Food Microbiol.* *28*, 1284–1292.
- Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A., and Beach, M.J. (2004). Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC* *53*, 23–45.
- Blackburn, G.F., Shah, H.P., Kenten, J.H., Leland, J., Kamin, R.A., Link, J., Peterman, J., Powell, M.J., Shah, A., and Talley, D.B. (1991). Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. *Clin. Chem.* *37*, 1534–1539.
- Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M.E., Alvarez, R., Bryan, M.C., Fazio, F., Calarese, D., Stevens, J., et al. (2004). Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17033–17038.
- Bok, S., Korampally, V., Darr, C.M., Folk, W.R., Polo-Parada, L., Gangopadhyay, K., and Gangopadhyay, S. (2013). Femtogram-level detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A by sandwich immunoassay using nanoporous substrate and ultra-bright fluorescent suprananoparticles. *Biosens. Bioelectron.* *41*, 409–416.

- Brabec, V. (1979). Study of thermal and acid denaturation of DNA by means of voltammetry at graphite electrodes. *Biopolymers* 18, 2397–2404.
- Brandstetter, T., Böhmer, S., Prucker, O., Bissé, E., zur Hausen, A., Alt-Mörbe, J., and Rühle, J. (2010). A polymer-based DNA biochip platform for human papilloma virus genotyping. *J. Virol. Methods* 163, 40–48.
- Brehm-Stecher, B., Young, C., Jaykus, L.-A., and Tortorello, M.L. (2009). Sample preparation: the forgotten beginning. *J. Food Prot.* 72, 1774–1789.
- Brinkmann, V. (2005). A novel data-mining approach systematically links genes to traits. *PLoS Biol.* 3, e166.
- Brown, R.B., and Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *J. R. Soc. Interface* 5, S131–S138.
- Brown, R.S., and Hussain, M. (2003). The Walkerton tragedy - issues for water quality monitoring. *The Analyst* 128, 320–322.
- Bundesministerium für Gesundheit (2012). TrinkwV 2001 - Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch.
- Bundesumweltamt (2004). Hinweise zu mikrobiologischen Parametern/Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001: Nachtrag zur Liste alternativer Verfahren gem. § 15 Abs. 1 TrinkwV 2001. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 47.
- Burmeister, M., and Ulanovsky, L. (1992). Pulsed-field gel electrophoresis (Totowa, N.J.: Humana Press).
- Camilleri, P. (Hrsg.) (1998). *Capillary electrophoresis: theory and practice* (Boca Raton, Fla.: CRC Press).
- Cannon, G.A., Carr, M.J., Yandle, Z., Schaffer, K., Kidney, R., Hosny, G., Doyle, A., Ryan, J., Gunson, R., Collins, T., et al. (2010). A low density oligonucleotide microarray for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens. *J. Virol. Methods* 163, 17–24.
- Cao, W., Easley, C.J., Ferrance, J.P., and Landers, J.P. (2006). Chitosan as a Polymer for pH-Induced DNA Capture in a Totally Aqueous System. *Anal. Chem.* 78, 7222–7228.
- Cao, Z.-J., Peng, Q.-W., Qiu, X., Liu, C.-Y., and Lu, J.-Z. (2011). Highly sensitive chemiluminescence technology for protein detection using aptamer-based rolling circle amplification platform. *J. Pharm. Anal.* 1, 159–165.

- Casarez, E.A., Pillai, S.D., and Di Giovanni, G.D. (2007). Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR. *Water Res.* *41*, 3643–3648.
- Cavillon, A.-M. (2002). Macrobiological agents in drinking water - *Legionella*. WHO - Water Sanit. Health.
- Chandel, A.L.S., Khan, S.A., Kher, R.S., and Tiwari, A. (2012). Investigation on the chemiluminescence reaction of the phenylhydrazine-luminol–peroxide system. *Luminescence* *27*, 455–458.
- Chang, C.-C., Chen, C.-C., Wei, S.-C., Lu, H.-H., Liang, Y.-H., and Lin, C.-W. (2012). Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification. *Sensors* *12*, 8319–8337.
- Cheek, B.J., Steel, A.B., Torres, M.P., Yu, Y.-Y., and Yang, H. (2001). Chemiluminescence detection for hybridization assays on the flow-thru chip, a three-dimensional microchannel biochip. *Anal. Chem.* *73*, 5777–5783.
- Chiu, C.-H., and Ou, J.T. (1996). Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* *34*, 2619–2622.
- Cho, Y.-K., Kim, J., Lee, Y., Kim, Y.-A., Namkoong, K., Lim, H., Oh, K.W., Kim, S., Han, J., Park, C., et al. (2006). Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. *Biosens. Bioelectron.* *21*, 2161–2169.
- Choi, H.N., Cho, S.-H., and Lee, W.-Y. (2003). Electrogenerated chemiluminescence from tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) immobilized in titania–perfluorosulfonated ionomer composite films. *Anal. Chem.* *75*, 4250–4256.
- Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* *350*, 91–92.
- Connelly, J.T., and Baeumner, A.J. (2012). Biosensors for the detection of waterborne pathogens. *Anal. Bioanal. Chem.* *402*, 117–127.
- Créton, R., and Jaffe, L.F. (2001). Chemiluminescence microscopy as a tool in biomedical research. *BioTechniques* *31*, 1098–1105.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2009). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 26–38.
- Csordas, A.T., Barak, J.D., and Delwiche, M.J. (2004). Comparison of primers for the detection of *Salmonella enterica* serovars using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* *39*, 187–193.

- Daigle, D., Simen, B.B., and Pochart, P. (2011). High-throughput sequencing of PCR products tagged with universal primers using 454 life sciences systems. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Ed. Frederick M Ausubel AI *Chapter 7*, Unit 7.5.
- Das, J., Jo, K., Lee, J.W., and Yang, H. (2007). Electrochemical immunosensor using p-aminophenol redox cycling by hydrazine combined with a low background current. *Anal. Chem.* *79*, 2790–2796.
- Davies, P. r., Turkson, P. k., Funk, J. a., Nichols, M. a., Ladely, S. r., and Fedorka-Cray, P. j. (2000). Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *J. Appl. Microbiol.* *89*, 169–177.
- Deiss, F., Sojic, N., White, D.J., and Stoddart, P.R. (2010). Nanostructured optical fibre arrays for high-density biochemical sensing and remote imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* *396*, 53–71.
- Didenko, V.V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques* *31*, 1106–1121.
- Dobrindt, U., and Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *4*, 550–557.
- Dong, H., Wang, C., Xiong, Y., Lu, H., Ju, H., and Zhang, X. (2013). Highly sensitive and selective chemiluminescent imaging for DNA detection by ligation-mediated rolling circle amplified synthesis of DNAzyme. *Biosens. Bioelectron.* *41*, 348–353.
- Donhauser, S.C., Niessner, R., and Seidel, M. (2009). Quantification of *E. coli* DNA on a flow-through chemiluminescence microarray readout system after PCR amplification. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* *25*, 669–674.
- Donhauser, S.C., Niessner, R., and Seidel, M. (2011). Sensitive Quantification of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Campylobacter jejuni* by Combining Stopped Polymerase Chain Reaction with Chemiluminescence Flow-Through DNA Microarray Analysis. *Anal. Chem.* *83*, 3153–3160.
- Eckner, K.F. (1998). Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and *enterococci* used in drinking and bathing water quality monitoring in southern sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 3079–3083.
- Elgort, M.G., Herrmann, M.G., Erali, M., Durtschi, J.D., Voelkerding, K.V., and Smith, R.E. (2004). Extraction and amplification of genomic DNA from human blood on nanoporous aluminum oxide membranes. *Clin. Chem.* *50*, 1817–1819.
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2005). HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three

secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 57, 691–705.

Elsholz, B., Wörl, R., Blohm, L., Albers, J., Feucht, H., Grunwald, T., Jürgen, B., Schweder, T., and Hintsche, R. (2006). Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays. *Anal. Chem.* 78, 4794–4802.

Environmental Protection Agency (Hrsg.) (2009). Drinking water contaminant candidate list 3 (Washington, D.C.: EPA).

Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., 3rd, et al. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 165–256.

Fan, A., Cao, Z., Li, H., Kai, M., and Lu, J. (2009). Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses. *Anal. Sci.* 25, 587–597.

Ferens, W.A., and Hovde, C.J. (2011). *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 465–487.

Ferragut, C., Izard, D., Gavini, F., Kersters, K., Ley, J.D., and Leclerc, H. (1983). *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 133–142.

Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Höfle, M.G., and Guzmán, C.A. (2004). Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using salmonella as a model organism. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3618–3623.

Fixe, F., Dufva, M., Telleman, P., and Christensen, C.B.V. (2004). Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 32, e9–e9.

Florin, E.L., Moy, V.T., and Gaub, H.E. (1994). Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* 264, 415–417.

Food and Drug Administration (Hrsg.) (2012). Bad Bug Book (Second Edition) (White Oak: FDA).

Frey, A., Schienle, M., Paulus, C., Jun, Z., Hofmann, F., Schindler-Bauer, P., Holzapfl, B., Atzesberger, M., Beer, G., Fritz, M., et al. (2005). A digital CMOS DNA chip. In *IEEE International Symposium on Circuits and Systems, 2005. ISCAS 2005*, pp. 2915–2918 Vol. 3.

Friedrich, A.W., Zhang, W., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Köck, R., Fruth, A., Tschäpe, H., and Karch, H. (2007). Prevalence, virulence profiles, and clinical

- significance of shiga toxin–negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clin. Infect. Dis.* *45*, 39–45.
- Fu, Z., Rogelj, S., and Kieft, T.L. (2005). Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* *99*, 47–57.
- Füchslin, H.P., Kötzsch, S., Keserue, H.-A., and Egli, T. (2010). Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *77*, 264–274.
- García-Aljaro, C., Cella, L.N., Shirale, D.J., Park, M., Muñoz, F.J., Yates, M.V., and Mulchandani, A. (2010). Carbon nanotubes-based chemiresistive biosensors for detection of microorganisms. *Biosens. Bioelectron.* *26*, 1437–1441.
- Gauglitz, G. (2005). Direct optical sensors: principles and selected applications. *Anal. Bioanal. Chem.* *381*, 141–155.
- Gehring, A.G., Albin, D.M., Bhunia, A.K., Reed, S.A., Tu, S.-I., and Uknalis, J. (2006). Antibody microarray detection of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification, assay limitations, and capture efficiency. *Anal. Chem.* *78*, 6601–6607.
- Gilmore, M.S., and Ferretti, J.J. (2003). The thin line between gut commensal and pathogen. *Science* *299*, 1999–2002.
- Gogarten, P. (Hrsg.) (2000). Horizontal Gene Transfer - A new Paradigm for Biology (Big Sur: Esalen Center for Theory and Research Conference on Evolutionary Theory).
- Gong, H., Vu, G.-P., Bai, Y., Chan, E., Wu, R., Yang, E., Liu, F., and Lu, S. (2011). A *Salmonella* small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors. *PLoS Pathog.* *7*, e1002120.
- Gordillo, R., Rodríguez, A., Werning, M.L., Bermúdez, E., and Rodríguez, M. (2014). Quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 in meat products by duplex real-time PCR assays. *Meat Sci.* *96*, 964–970.
- Gorrochotegui-Escalante, N., and Black, W.C., 4th (2003). Amplifying whole insect genomes with multiple displacement amplification. *Insect Mol. Biol.* *12*, 195–200.
- Green, M., Liu, F.-M., Cohen, L., Köllensperger, P., and Cass, T. (2006). SERS platforms for high density DNA arrays. *Faraday Discuss.* *132*, 269–280; discussion 309–319.
- Guery, M. (2004). Biologischer Terrorismus in Bezug auf die Schweiz. *Zür. Beitr. Zur Sicherheitspolitik Konfliktforschung* *74*.

- Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., and Riley, L.W. (1995). Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* *33*, 1375–1377.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., and Miller, S.I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 53–66.
- Haring Bolívar, P., Nagel, M., Richter, F., Brucherseifer, M., Kurz, H., Bosserhoff, A., and Büttner, R. (2004). Label-free THz sensing of genetic sequences: towards “THz biochips.” *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* *362*, 323–333; discussion 333–335.
- Harrington, S.M., Dudley, E.G., and Nataro, J.P. (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* *254*, 12–18.
- Hatakeyama, K., Tanaka, T., Sawaguchi, M., Iwadate, A., Mizutani, Y., Sasaki, K., Tateishi, N., and Matsunaga, T. (2009). Microfluidic device using chemiluminescence and a DNA-arrayed thin film transistor photosensor for single nucleotide polymorphism genotyping of PCR amplicons from whole blood. *Lab. Chip* *9*, 1052–1058.
- Hawkins, T.L., O’Connor-Morin, T., Roy, A., and Santillan, C. (1994). DNA purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4543–4544.
- Hawkins, T.L., Detter, J.C., and Richardson, P.M. (2002). Whole genome amplification--applications and advances. *Curr. Opin. Biotechnol.* *13*, 65–67.
- Hegde, N.V., Cote, R., Jayarao, B.M., Muldoon, M., Lindpaintner, K., Kapur, V., and Debroy, C. (2012). Detection of the top six non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O groups by ELISA. *Foodborne Pathog. Dis.* *9*, 1044–1048.
- Heijnen, L., and Medema, G. (2006). Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *Journal of Water and Health* *04.4*, 487–498.
- Heim, A., Zeuke, S., Grumbach, I.M., and Top, B. (1998). Highly sensitive detection of gene expression of an intronless gene: Amplification of mRNA, but not genomic DNA by nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Nucleic Acids Res.* *26*, 2250–2251.
- Van Heirstraeten, L., Abrahantes, J.C., Lammens, C., Lee, A., Harbarth, S., Molenberghs, G., Aerts, M., Goossens, H., and Malhotra-Kumar, S. (2009). Impact of a short period of pre-enrichment on detection and bacterial loads of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening specimens. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 3326–3328.

- Helm, M., and Wöfl, S. (2006). Instrumentelle Bioanalytik: Einführung für Biologen, Biochemiker, Biotechnologen und Pharmazeuten (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH).
- Hering, K.K., Möller, R., Fritzsche, W., and Popp, J. (2008). Microarray-based detection of dye-labeled DNA by SERRS using particles formed by enzymatic silver deposition. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* 9, 867–872.
- Hermann, P., and Fredericq, E. (1977). The role of the AT pairs in the acid denaturation of DNA. *Nucleic Acids Res.* 4, 2939–2947.
- Hidaka, A., Hokyo, T., Arikawa, K., Fujihara, S., Ogasawara, J., Hase, A., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2009). Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 106, 410–420.
- Hobson, N.S., Tothill, I., and Turner, A.P. (1996). Microbial detection. *Biosens. Bioelectron.* 11, 455–477.
- Holleman, A.F., Wiberg, E., and Wiberg, N. (1995). Lehrbuch der anorganischen Chemie (Berlin: Walter de Gruyter).
- Hommatsu, M., Okahashi, H., Ohta, K., Tamai, Y., Tsukagoshi, K., and Hashimoto, M. (2013). Development of a PCR/LDR/flow-through hybridization assay using a capillary tube, probe DNA-immobilized magnetic beads and chemiluminescence detection. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 29, 689–695.
- Hong, J., Jung, W.K., Kim, J.M., Kim, S.H., Koo, H.C., Ser, J., and Park, Y.H. (2007). Quantification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. *J. Food Prot.* 70, 2015–2022.
- Huang, J., Zhu, Y., Wen, H., Zhang, J., Huang, S., Niu, J., and Li, Q. (2009). Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6981–6985.
- Huang, K., Lee, B.P., Ingram, D.R., and Messersmith, P.B. (2002). Synthesis and characterization of self-assembling block copolymers containing bioadhesive end groups. *Biomacromolecules* 3, 397–406.
- Hübner, I., Steinmetz, I., Obst, U., Giebel, D., and Bitter-Suermann, D. (1992). Rapid determination of members of the family *enterobacteriaceae* in drinking water by an immunological assay using a monoclonal antibody against enterobacterial common antigen. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3187–3191.
- Hügler, M., Böckle, K., Eberhagen, I., Thelen, K., Beimfohr, C., and Hamsch, B. (2011). Development and validation of a FISH-based method for the detection and

quantification of *E. coli* and coliform bacteria in water samples. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* **64**, 1435–1442.

Inglis, G.D., and Kalischuk, L.D. (2004). Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2296–2306.

Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., and Brow, M.A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9436–9440.

Ino, K., Saito, W., Koide, M., Umemura, T., Shiku, H., and Matsue, T. (2011). Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection. *Lab. Chip* **11**, 385–388.

Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats (Hrsg.) (2009). *Vulnerable infrastructure and waterborne disease risk* (Washington, D.C.: National Academies Press).

Isberg, R.R., O'Connor, T.J., and Heidtman, M. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 13–24.

Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., and Wilkins, E. (1999). Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 599–624.

Janke, C., Först, M., Nagel, M., Kurz, H., and Bartels, A. (2005). Asynchronous optical sampling for high-speed characterization of integrated resonant terahertz sensors. *Opt. Lett.* **30**, 1405–1407.

Jeníková, G., Pazlarová, J., and Demnerová, K. (2010). Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Int. Microbiol.* **3**, 225–229.

Jie, G., Zhao, Y., and Niu, S. (2013). Amplified electrochemiluminescence detection of cancer cells using a new bifunctional quantum dot as signal probe. *Biosens. Bioelectron.* **50**, 368–372.

Johnson, B.N., and Mutharasan, R. (2012). Sample preparation-free, real-time detection of microRNA in human serum using piezoelectric cantilever biosensors at attomole level. *Anal. Chem.* **84**, 10426–10436.

Jung, A., Stemmler, I., Brecht, A., and Gauglitz, G. (2001). Covalent strategy for immobilization of DNA-microspots suitable for microarrays with label-free and time-resolved optical detection of hybridization. *Fresenius J. Anal. Chem.* **371**, 128–136.

- Jyoti, A., Vajpayee, P., Singh, G., Patel, C.B., Gupta, K.C., and Shanker, R. (2011). Identification of environmental reservoirs of nontyphoidal salmonellosis: aptamer-assisted bioconcentration and subsequent detection of *Salmonella Typhimurium* by quantitative polymerase chain reaction. *Environ. Sci. Technol.* *45*, 8996–9002.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., and Shibata, T. (2002). *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 3462–3466.
- Kannan, B., Castelino, K., Chen, F.F., and Majumdar, A. (2006). Lithographic techniques and surface chemistries for the fabrication of PEG-passivated protein microarrays. *Biosens. Bioelectron.* *21*, 1960–1967.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 123–140.
- Karsunke, X.Y.Z., Niessner, R., and Seidel, M. (2009). Development of a multichannel flow-through chemiluminescence microarray chip for parallel calibration and detection of pathogenic bacteria. *Anal. Bioanal. Chem.* *395*, 1623–1630.
- Keserue, H.-A., Baumgartner, A., Felleisen, R., and Egli, T. (2012). Rapid detection of total and viable *Legionella pneumophila* in tap water by immunomagnetic separation, double fluorescent staining and flow cytometry. *Microb. Biotechnol.* *5*, 753–763.
- Kessler, H.H., Mühlbauer, G., Stelzl, E., Daghofer, E., Santner, B.I., and Marth, E. (2001). Fully automated nucleic acid extraction: MagNA Pure LC. *Clin. Chem.* *47*, 1124–1126.
- Kick, A., Bönsch, M., Katzschner, B., Voigt, J., Herr, A., Brabetz, W., Jung, M., Sonntag, F., Klotzbach, U., Danz, N., et al. (2010). DNA microarrays for hybridization detection by surface plasmon resonance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* *26*, 1543–1547.
- Kim, J., Voelkerding, K.V., and Gale, B.K. (2006). Patterning of a nanoporous membrane for multi-sample DNA extraction. *J. Micromechanics Microengineering* *16*, 33–39.
- Kim, J., Johnson, M., Hill, P., and Gale, B.K. (2009). Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification. *Integr. Biol.* *1*, 574–586.
- Kim, J., Elsnab, J., Johnson, M., and Gale, B.K. (2010). Sample to answer: a fully integrated nucleic acid identification system for bacteria monitoring. 75930–75930.
- Kingshott, P., Thissen, H., and Griesser, H.J. (2002). Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins. *Biomaterials* *23*, 2043–2056.

- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1989). Whole genome PCR: application to the identification of sequences bound by gene regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* 17, 3645–3653.
- Kloth, K., Niessner, R., and Seidel, M. (2009). Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2106–2112.
- Knecht, B.G., Strasser, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., and Weller, M.G. (2004). Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. *Anal. Chem.* 76, 646–654.
- Kong, H., Liu, D., Zhang, S., and Zhang, X. (2011). Protein sensing and cell discrimination using a sensor array based on nanomaterial-assisted chemiluminescence. *Anal. Chem.* 83, 1867–1870.
- Kozma, P., Lehmann, A., Wunderlich, K., Michel, D., Schumacher, S., Ehrentreich-Förster, E., and Bier, F.F. (2013). A novel handheld fluorescent microarray reader for point-of-care diagnostic. *Biosens. Bioelectron.* 47, 415–420.
- Kröger, K., Bauer, J., Fleckenstein, B., Rademann, J., Jung, G., and Gauglitz, G. (2002). Epitope-mapping of transglutaminase with parallel label-free optical detection. *Biosens. Bioelectron.* 17, 937–944.
- Krøjgaard, L.H., Krogfelt, K.A., Albrechtsen, H.-J., and Uldum, S.A. (2011). Detection of *Legionella* by quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring and risk assessment. *BMC Microbiol.* 11, 254.
- LaFratta, C.N., Huh, S.P., Mallillin, A.C., Riviello, P.J., and Walt, D.R. (2010). Visualizing fluorescence: using a homemade fluorescence “microscope” to view latent fingerprints on paper. *J. Chem. Educ.* 87, 1105–1107.
- Lagally, E.T., Scherer, J.R., Blazej, R.G., Toriello, N.M., Diep, B.A., Ramchandani, M., Sensabaugh, G.F., Riley, L.W., and Mathies, R.A. (2004). Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection. *Anal. Chem.* 76, 3162–3170.
- Lai, R.Y., Lagally, E.T., Lee, S.-H., Soh, H.T., Plaxco, K.W., and Heeger, A.J. (2006). Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons via a reusable, electrochemical sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4017–4021.
- Langer, V., Niessner, R., and Seidel, M. (2011). Stopped-flow microarray immunoassay for detection of viable *E. coli* by use of chemiluminescence flow-through microarrays. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 1041–1050.

- Langer, V., Hartmann, G., Niessner, R., and Seidel, M. (2012). Rapid quantification of bioaerosols containing *L. pneumophila* by Coriolis® μ air sampler and chemiluminescence antibody microarrays. *J. Aerosol Sci.* *48*, 46–55.
- Lazcka, O., Del Campo, F.J., and Muñoz, F.X. (2007). Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* *22*, 1205–1217.
- Leach, R.M., Drummond, M., and Doig, A. (2013). *Practical flow cytometry in haematology diagnosis* (Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell).
- Lee, W.-Y. (1997). Tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrogenerated chemiluminescence in analytical science. *Microchim. Acta* *127*, 19–39.
- Lee, S.-W., and Tai, Y.-C. (1999). A micro cell lysis device. *Sens. Actuators Phys.* *73*, 74–79.
- Lee, D.-Y., Lauder, H., Cruwys, H., Falletta, P., and Beaudette, L.A. (2008). Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens. *Sci. Total Environ.* *398*, 203–211.
- Lehtola, M.J., Pitkänen, T., Miebach, L., and Miettinen, I.T. (2006). Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* *54*, 57–61.
- Lemarchand, K., Masson, L., and Brousseau, R. (2004). Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. *Crit. Rev. Microbiol.* *30*, 145–172.
- Li, F., Zhao, Q., Wang, C., Lu, X., Li, X.-F., and Le, X.C. (2010). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle labeling and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* *82*, 3399–3403.
- Li, J., Xu, Q., Fu, C., and Zhang, Y. (2013). A dramatically enhanced electrochemiluminescence assay for CA125 based on dendrimer multiply labeled luminol on Fe₃O₄ nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.* *185*, 146–153.
- Li, K., Shrivastava, S., Brownley, A., Katzel, D., Bera, J., Nguyen, A.T., Thovarai, V., Halpin, R., and Stockwell, T.B. (2012). Automated degenerate PCR primer design for high-throughput sequencing improves efficiency of viral sequencing. *Viol. J.* *9*, 261.
- Lim, D.V., Simpson, J.M., Kearns, E.A., and Kramer, M.F. (2005). Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 583–607.

Liu, F., Liu, H., Zhang, M., Yu, J., Wang, S., and Lu, J. (2013). Ultrasensitive electrochemiluminescence detection of lengthy DNA molecules based on dual signal amplification. *The Analyst* 138, 3463–3469.

Lo, H.-C., Hsiung, H.-I., Chattopadhyay, S., Han, H.-C., Chen, C.-F., Leu, J.P., Chen, K.-H., and Chen, L.-C. (2011). Label free sub-picomole level DNA detection with Ag nanoparticle decorated Au nanotip arrays as surface enhanced Raman spectroscopy platform. *Biosens. Bioelectron.* 26, 2413–2418.

Long, G.L., and Winefordner, J.D. (1983). Limit of detection a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 55, 712A–724A.

Lorenz, T.C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp. JoVE* e3998.

Lottspeich, F., and Engels, J. (2012). *Bioanalytik* (Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).

Loy, A., and Bodrossy, L. (2006). Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 363, 106–119.

Lu, A.-H., Salabas, E.L., and Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 46, 1222–1244.

Lu, K.-Y., Wo, A.M., Lo, Y.-J., Chen, K.-C., Lin, C.-M., and Yang, C.-R. (2006). Three dimensional electrode array for cell lysis via electroporation. *Biosens. Bioelectron.* 22, 568–574.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., et al. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363–1371.

Luthra, R., and Medeiros, L.J. (2004). Isothermal multiple displacement amplification: a highly reliable approach for generating unlimited high molecular weight genomic DNA from clinical specimens. *J. Mol. Diagn. JMD* 6, 236–242.

Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., et al. (1994). A massive outbreak in milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167.

Maheux, A.F., Picard, F.J., Boissinot, M., Bissonnette, L., Paradis, S., and Bergeron, M.G. (2009). Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli*/*Shigella* in water samples. *Water Res.* 43, 3019–3028.

- Majid, E., Male, K.B., and Luong, J.H.T. (2008). Boron doped diamond biosensor for detection of *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 7691–7695.
- Mallard, F., Marchand, G., Ginot, F., and Campagnolo, R. (2005). Opto-electronic DNA chip: high performance chip reading with an all-electric interface. *Biosens. Bioelectron.* *20*, 1813–1820.
- Mälzer, H.-J., Staben, N., Hein, A., and Merkel, W. (2010). Identification, assessment, and control of hazards in water supply: experiences from water safety plan implementations in Germany. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* *61*, 1307–1315.
- Mandel, M., and Marmur, J. (1968). Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In *Methods in Enzymology*, K.M. Lawrence Grossman, ed. (Waltham: Academic Press), pp. 195–206.
- Manickam, A., Chevalier, A., McDermott, M., Ellington, A.D., and Hassibi, A. (2010). A CMOS electrochemical impedance spectroscopy biosensor array for label-free biomolecular detection. In *Solid-State Circuits Conference Digest of Technical Papers (ISSCC), 2010 IEEE International*, pp. 130–131.
- Mantzila, A.G., Maipa, V., and Prodromidis, M.I. (2008). Development of a faradic impedimetric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *Anal. Chem.* *80*, 1169–1175.
- Manz, A., Pamme, N., and Iossifidis, D. (2004). *Bioanalytical Chemistry* (London: Imperial College Press).
- Marquette, C.A., and Blum, L.J. (2006). Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.* *385*, 546–554.
- Martín, M.C., Martínez, N., del Río, B., Ladero, V., Fernández, M., and Alvarez, M.A. (2010). A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting *enterobacteriaceae* in the dairy and other food industries. *J. Dairy Sci.* *93*, 860–867.
- Marzocchi, E., Grilli, S., Della Ciana, L., Prodi, L., Mirasoli, M., and Roda, A. (2008). Chemiluminescent detection systems of horseradish peroxidase employing nucleophilic acylation catalysts. *Anal. Biochem.* *377*, 189–194.
- Masson, J.-F., Battaglia, T.M., Davidson, M.J., Kim, Y.-C., Prakash, A.M.C., Beaudoin, S., and Booksh, K.S. (2005). Biocompatible polymers for antibody support on gold surfaces. *Talanta* *67*, 918–925.

- Masters, N., Wiegand, A., Ahmed, W., and Katouli, M. (2011). *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *Water Res.* 45, 6321–6333.
- Mathieu, L., Robine, E., Deloge-Abarkan, M., Ritoux, S., Pauly, D., Hartemann, P., and Zmirou-Navier, D. (2006). *Legionella* bacteria in aerosols: sampling and analytical approaches used during the legionnaires disease outbreak in Pas-de-Calais. *J. Infect. Dis.* 193, 1333–1335.
- McKinney, R.E., and Meyer, M.D. (Hrsg.) (2004). Environmental pollution control microbiology (New York: M. Dekker).
- Mehta, J., Van Dorst, B., Devriese, L., Rouah-Martin, L., Bekaert, K., Somers, K., Somers, V., Scippo, M.-L., Blust, R., and Robbens, R. (2011). The use of phages and aptamers as alternatives to antibodies in medical and food diagnostics. *Biomed. Eng. Trends Res. Technol. InTech* 445–468.
- Menikh, A., Mickan, S.P., Liu, H., Maccoll, R., and Zhang, X.-C. (2004). Label-free amplified bioaffinity detection using terahertz wave technology. *Biosens. Bioelectron.* 20, 658–662.
- Miao, W. (2008). Electrogenerated chemiluminescence and its biorelated applications. *Chem. Rev.* 108, 2506–2553.
- Miao, W., and Bard, A.J. (2004). Electrogenerated chemiluminescence. 77. DNA hybridization detection at high amplification with [Ru(bpy)₃]²⁺-containing microspheres. *Anal. Chem.* 76, 5379–5386.
- Mihaljevic, R.R., Sikic, M., Klančnik, A., Brumini, G., Mozina, S.S., and Abram, M. (2007). Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Pathog.* 43, 120–125.
- Miltenyi Biotec (Hrsg.) (2006). Streptavidin MicroBeads (Bergisch Gladbach: Miltenyi Biotec).
- Mir, M., Martínez-Rodríguez, S., Castillo-Fernández, O., Homs-Corbera, A., and Samitier, J. (2011). Electrokinetic techniques applied to electrochemical DNA biosensors. *Electrophoresis* 32, 811–821.
- Mirasoli, M., Guardigli, M., Michelini, E., and Roda, A. (2013a). Recent advancements in chemical luminescence-based lab-on-chip and microfluidic platforms for bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87, 36–52.
- Mirasoli, M., Bonvicini, F., Dolci, L.S., Zangheri, M., Gallinella, G., and Roda, A. (2013b). Portable chemiluminescence multiplex biosensor for quantitative detection of three B19 DNA genotypes. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 1139–1143.

- Mocanu, D., Kolesnychenko, A., Aarts, S., Dejong, A.T., Pierik, A., Coene, W., Vossenaar, E., and Stapert, H. (2008). Quantitative analysis of DNA hybridization in a flowthrough microarray for molecular testing. *Anal. Biochem.* **380**, 84–90.
- Molta, K., and Telghederb, U. (2010). Berechnung der Verfahrensstandardabweichung und Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze aus einer Kalibrierung gemäß DIN 32645.
- Morio, F., Corvec, S., Caroff, N., Le Gallou, F., Drugeon, H., and Reynaud, A. (2008). Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: utility for daily practice. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **211**, 403–411.
- Muniesa, M., Jofre, J., García-Aljaro, C., and Blanch, A.R. (2006). Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7141–7149.
- Nagel, M., Richter, F., Haring-Bolívar, P., and Kurz, H. (2003). A functionalized THz sensor for marker-free DNA analysis. *Phys. Med. Biol.* **48**, 3625–3636.
- Nakagawa, T., Hashimoto, R., Maruyama, K., Tanaka, T., Takeyama, H., and Matsunaga, T. (2006). Capture and release of DNA using aminosilane-modified bacterial magnetic particles for automated detection system of single nucleotide polymorphisms. *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 862–868.
- Nanduri, V., Sorokulova, I.B., Samoylov, A.M., Simonian, A.L., Petrenko, V.A., and Vodyanoy, V. (2007). Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 986–992.
- Natrajan, A., Sharpe, D., Costello, J., and Jiang, Q. (2010). Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. *Anal. Biochem.* **406**, 204–213.
- Neugebauer, S., Zimdars, A., Liepold, P., Gebala, M., Schuhmann, W., and Hartwich, G. (2009). Optimization of an electrochemical DNA assay by using a 48-electrode array and redox amplification studies by means of scanning electrochemical microscopy. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **10**, 1193–1199.
- Neumann, T., Bonham, A.J., Dame, G., Berchtold, B., Brandstetter, T., and Rühle, J. (2010). Temperature and time-resolved total internal reflectance fluorescence analysis of reusable DNA hydrogel chips. *Anal. Chem.* **82**, 6124–6131.
- Noguera, P.S., Posthuma-Trumpie, G.A., van Tuil, M., van der Wal, F.J., Boer, A. de, Moers, A.P.H.A., and van Amerongen, A. (2011). Carbon nanoparticles as detection labels in antibody microarrays. Detection of genes encoding virulence factors in shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Anal. Chem.* **83**, 8531–8536.

Nolan, T., Bustin, S.A., Griffin, H.G., and Griffin, A. (2010). PCR Technology: Current Innovations, Second Edition (Boca Raton, Fla.: CRC Press).

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63–e63.

O' Connell, K., Kelly, J., and Nirai, U. (2010). A rare case of soft-tissue infection caused by *Raoultella planticola*. *Case Rep. Med.* 2010.

Okabe, Y., Chen, Y., Purohit, R., Corn, R.M., and Lee, A.P. (2012). Piezoelectrically driven vertical cavity acoustic transducers for the convective transport and rapid detection of DNA and protein binding to DNA microarrays with SPR imaging—a parametric study. *Biosens. Bioelectron.* 35, 37–43.

Okahata, Y., Kawase, M., Niikura, K., Ohtake, F., Furusawa, H., and Ebara, Y. (1998). Kinetic measurements of DNA hybridization on an oligonucleotide-immobilized 27-MHz quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.* 70, 1288–1296.

Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., and Ezura, Y. (2003). Seven-hour fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of *enterobacteriaceae* in food and environmental water sample. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1182–1190.

Pagel, J.E., Qureshi, A.A., Young, D.M., and Vlassoff, L.T. (1982). Comparison of four membrane filter methods for fecal coliform enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 787–793.

Palka-Santini, M., Cleven, B.E., Eichinger, L., Krönke, M., and Krut, O. (2009). Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiol.* 9, 1.

Pappert, G., Rieger, M., Niessner, R., and Seidel, M. (2009). Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of *E. coli*. *Microchim. Acta* 168, 1–8.

Pardy, B. (2003). Seven deadly sins of Canadian water law. *J. Environ. Law Pract.* 13, 89–107.

Park, T., Lee, S., Seong, G.H., Choo, J., Lee, E.K., Kim, Y.S., Ji, W.H., Hwang, S.Y., Gweon, D.-G., and Lee, S. (2005). Highly sensitive signal detection of duplex dye-labelled DNA oligonucleotides in a PDMS microfluidic chip: confocal surface-enhanced Raman spectroscopic study. *Lab. Chip* 5, 437–442.

Pavankumar, A.R., and Sankaran, K. (2008). The need and new tools for surveillance of *Escherichia coli* pathogens. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 125–145.

Pawar, A.Y., Sonawane, D.D., Erande, K.B., and Derle, D.V. (2013). Terahertz technology and its applications. *Drug Invent. Today* 5, 157–163.

Pei, L., Rieger, M., Lengger, S., Ott, S., Zawadsky, C., Hartmann, N.M., Selinka, H.-C., Tiehm, A., Niessner, R., and Seidel, M. (2012). Combination of crossflow ultrafiltration, monolithic affinity filtration, and quantitative reverse transcriptase PCR for rapid concentration and quantification of model viruses in water. *Environ. Sci. Technol.* 46, 10073–10080.

Peskoller, C., Niessner, R., and Seidel, M. (2009a). Cross-flow microfiltration system for rapid enrichment of bacteria in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 399–404.

Peskoller, C., Niessner, R., and Seidel, M. (2009b). Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of *Escherichia coli* bacteria. *J. Chromatogr. A* 1216, 3794–3801.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45–e45.

Pfaffl, M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ Quant. PCR* 1, 89–113.

Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedberg, B., and Gauglitz, G. (2000). A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosens. Bioelectron.* 15, 473–481.

Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., and Armes, N.A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 4, 1115–1121.

Pierik, A., Dijkman, J.F., Lub, J., Stapert, H.R., and Broer, D.J. (2010). Immobilization of oligonucleotides with homo-oligomer tails onto amine-functionalized solid substrates and the effects on hybridization. *Anal. Chem.* 82, 1191–1199.

Pierik, A., Boamfa, M., Zelst, M. van, Clout, D., Stapert, H., Dijkman, F., Broer, D., and Wimberger-Friedl, R. (2012). Real time quantitative amplification detection on a microarray: towards high multiplex quantitative PCR. *Lab. Chip* 12, 1897–1902.

Piliarik, M., Vaisocherová, H., and Homola, J. (2007). Towards parallelized surface plasmon resonance sensor platform for sensitive detection of oligonucleotides. *Sens. Actuators B Chem.* 121, 187–193.

Pillet, F., Thibault, C., Bellon, S., Maillart, E., Trévisiol, E., Vieu, C., François, J.M., and Leberre, V.A. (2010). Simple surface chemistry to immobilize DNA probes that significantly increases sensitivity and spots density of surface plasmon resonance imaging based microarray systems. *Sens. Actuators B Chem.* 147, 87–92.

- Pinheiro, L.B., Coleman, V.A., Hindson, C.M., Herrmann, J., Hindson, B.J., Bhat, S., and Emslie, K.R. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal. Chem.* *84*, 1003–1011.
- Price, C.W., Leslie, D.C., and Landers, J.P. (2009). Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab. Chip* *9*, 2484–2494.
- Prime, K.L., and Whitesides, G.M. (1993). Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* *115*, 10714–10721.
- Public Health Agency of Canada (2000). Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May–June 2000. *Can. Commun. Dis. Rep. Relevé Mal. Transm. Au Can.* *26*, 170–173.
- Qiagen (Hrsg.) (2006a). REPLI-g UltraFast Mini Handbook (Hilden: Qiagen).
- Qiagen (Hrsg.) (2006b). DNeasy Blood & Tissue Handbook (Hilden: Qiagen).
- Quilliam, R.S., Williams, A.P., Avery, L.M., Malham, S.K., and Jones, D.L. (2011). Unearthing human pathogens at the agricultural–environment interface: A review of current methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in freshwater ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* *140*, 354–360.
- Rabsch, W., Andrews, H.L., Kingsley, R.A., Prager, R., Tschäpe, H., Adams, L.G., and Bäuml, A.J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect. Immun.* *70*, 2249–2255.
- Ram, S., Vajpayee, P., and Shanker, R. (2008). Rapid culture-independent quantitative detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in surface waters by real-time PCR with molecular beacon. *Environ. Sci. Technol.* *42*, 4577–4582.
- Ratcliff, R.M., Lanser, J.A., Manning, P.A., and Heuzenroeder, M.W. (1998). Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *J. Clin. Microbiol.* *36*, 1560–1567.
- Rau, K.R., Guerra, A., Vogel, A., and Venugopalan, V. (2004). Investigation of laser-induced cell lysis using time-resolved imaging. *Appl. Phys. Lett.* *84*, 2940.
- Rau, K.R., Quinto-Su, P.A., Hellman, A.N., and Venugopalan, V. (2006). Pulsed laser microbeam-induced cell lysis: time-resolved imaging and analysis of hydrodynamic effects. *Biophys. J.* *91*, 317–329.
- Ray, P.E., and Liu, X.H. (2001). Pathogenesis of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* *16*, 823–839.

- Reynisson, E., Josefsen, M.H., Krause, M., and Hoorfar, J. (2006). Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 66, 206–216.
- Reynolds, K.A., Mena, K.D., and Gerba, C.P. (2008). Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 117–158.
- Rice, S.A., and Doty, P. (1957). The thermal denaturation of desoxyribose nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3937–3947.
- Rice, E.W., Allen, M.J., and Edberg, S.C. (1990). Efficacy of beta-glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined-substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1203–1205.
- Richardson, S.D. (2009). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 81, 4645–4677.
- Richter, M.M. (2004). Electrochemiluminescence (ECL). *Chem. Rev.* 104, 3003–3036.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 154–160.
- Roche Diagnostics (Hrsg.) (2013a). <https://www.roche-applied-science.com/shop/home>, abgerufen am 03.12.2013.
- Roche Diagnostics (Hrsg.) (2013b). Universal ProbeLibrary System Technology (Mannheim: Roche Diagnostics).
- Roda, A., and Guardigli, M. (2011). Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 69–76.
- Roda, A., Mirasoli, M., Dolci, L.S., Buragina, A., Bonvicini, F., Simoni, P., and Guardigli, M. (2011). Portable device based on chemiluminescence lensless imaging for personalized diagnostics through multiplex bioanalysis. *Anal. Chem.* 83, 3178–3185.
- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., and Barceló, D. (2006). Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 1025–1041.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.R., and Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49, 31–54.

- Rudi, K., Høidal, H.K., Katla, T., Johansen, B.K., Nordal, J., and Jakobsen, K.S. (2004). Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 790–797.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350–1354.
- Sassolas, A., Leca-Bouvier, B.D., and Blum, L.J. (2008). DNA Biosensors and Microarrays. *Chem. Rev.* *108*, 109–139.
- Schindler, P. (2004). Fäkale Verunreinigungen im Trinkwasser (Nürnberg: Fachinformationsdienst Lebenswissenschaften Umwelt und Gesundheit).
- Schlapak, R., Pammer, P., Armitage, D., Zhu, R., Hinterdorfer, P., Vaupel, M., Frühwirth, T., and Howorka, S. (2006). Glass surfaces grafted with high-density poly(ethylene glycol) as substrates for DNA oligonucleotide microarrays. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* *22*, 277–285.
- Schmidt, H., and Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* *17*, 14–56.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., and Zeillinger, R. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.* *4*, 234–238.
- Schulze, H., Giraud, G., Crain, J., and Bachmann, T.T. (2009). Multiplexed optical pathogen detection with lab-on-a-chip devices. *J. Biophotonics* *2*, 199–211.
- Schumacher, S., Nestler, J., Otto, T., Wegener, M., Ehrentreich-Förster, E., Michel, D., Wunderlich, K., Palzer, S., Sohn, K., Weber, A., et al. (2012). Highly-integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis. *Lab. Chip* *12*, 464–473.
- Seidel, M., and Niessner, R. (2008). Automated analytical microarrays: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* *391*, 1521–1544.
- Sekhon, B.S., and Kamboj, S. (2010). Microfluidics technology for drug discovery and development - an overview. *Int J Pharm Tech Res* *2*, 804–809.
- Shaikh, N., and Tarr, P.I. (2003). *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* *185*, 3596–3605.
- Sharma, S., Sachdeva, P., and Viridi, J.S. (2003). Emerging water-borne pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *61*, 424–428.

- Shevchuk, O., Jäger, J., and Steinert, M. (2011). Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front. Microbiol.* 2, 74.
- Sigma-Aldrich (Hrsg.) (2007). Whole Genome Amplification Advisor (München: Sigma-Aldrich).
- Singh, A., Poshtiban, S., and Evoy, S. (2013). Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors* 13, 1763–1786.
- Singleton, P., and Sainsbury, D. (2006). Dictionary of microbiological and molecular biology (Chichester: John Wiley).
- Slater, E.R., and Owen, R.J. (1997). Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 274–278.
- Smeets, P.W.M.H., Rietveld, L.C., van Dijk, J.C., and Medema, G.J. (2010). Practical applications of quantitative microbial risk assessment (QMRA) for water safety plans. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 61, 1561–1568.
- Soejima, T., Minami, J., Yaeshima, T., and Iwatsuki, K. (2012). An advanced PCR method for the specific detection of viable total coliform bacteria in pasteurized milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 485–497.
- Song, X., Shen, H., Yin, X., Wang, X., and Liu, J. (2013). Microflow-injection chemiluminescence of luminol and hypochlorite enhanced by phloxine B. *Luminescence* 28, 16–22.
- Stangegaard, M., Frøslev, T.G., Frank-Hansen, R., Laursen, S.S., Jørgensen, M., Hansen, A.J., and Morling, N. (2009). Automated extraction of DNA and PCR setup using a Tecan Freedom EVO® liquid handler. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2, 74–76.
- Stevens, K.A., and Jaykus, L.-A. (2004). Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, 7–24.
- Stewart, L.D., McNair, J., McCallan, L., Thompson, S., Kulakov, L.A., and Grant, I.R. (2012). Production and evaluation of antibodies and phage display-derived peptide ligands for immunomagnetic separation of *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1598–1605.
- Strelau, K.K., Kretschmer, R., Möller, R., Fritzsche, W., and Popp, J. (2010). SERS as tool for the analysis of DNA-chips in a microfluidic platform. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1381–1384.

Su, Y., Xie, Y., Hou, X., and Lv, Y. (2014). Recent advances in analytical applications of nanomaterials in liquid phase chemiluminescence. *Appl. Spectrosc. Rev.* *49*, 201–232.

Tantawiwat, S., Tansuphasiri, U., Wongwit, W., Wongchotigul, V., and Kitayaporn, D. (2005). Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in drinking water. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* *36*, 162–169.

Teissie, J. (1992). Time course of electropermeabilization. In *Charge and Field Effects in biosystems - 3*, M.J. Allen, S.F. Cleary, A.E. Sowers, and D.D. Shillady, eds. (Boston: Birkhäuser), pp. 285–301.

Thermo Scientific (Hrsg.) (2009). *Thermo Scientific Pierce Cell Lysis Technical Handbook* (Waltham, Ma.: Thermo Scientific).

Thomas, K.M., Charron, D.F., Waltner-Toews, D., Schuster, C., Maarouf, A.R., and Holt, J.D. (2006). A role of high impact weather events in waterborne disease outbreaks in Canada, 1975 - 2001. *Int. J. Environ. Health Res.* *16*, 167–180.

Tombelli, S., Mascini, M., Sacco, C., and Turner, A.P. (2000). A DNA piezoelectric biosensor assay coupled with a polymerase chain reaction for bacterial toxicity determination in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* *418*, 1–9.

Tronel, H., and Hartemann, P. (2009). Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella spp.* *Lett. Appl. Microbiol.* *48*, 653–656.

Valgren, C., Wester, S., and Hansson, O. (2008). A comparison of three automated DNA purification methods in Forensic casework. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* *1*, 76–77.

Vora, G.J., Meador, C.E., Stenger, D.A., and Andreadis, J.D. (2004). Nucleic acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 3047–3054.

Vulto, P., Dame, G., Maier, U., Makohliso, S., Podszun, S., Zahn, P., and Urban, G.A. (2010). A microfluidic approach for high efficiency extraction of low molecular weight RNA. *Lab. Chip* *10*, 610–616.

Walter, A., Wu, J., Flechsig, G.-U., Haake, D.A., and Wang, J. (2011). Redox cycling amplified electrochemical detection of DNA hybridization: application to pathogen *E. coli* bacterial RNA. *Anal. Chim. Acta* *689*, 29–33.

Wang, D., Coscoy, L., Zylberberg, M., Avila, P.C., Boushey, H.A., Ganem, D., and DeRisi, J.L. (2002). Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 15687–15692.

- Wang, R.-F., Cao, W.-W., and Cerniglia, C.E. (1997). A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* *83*, 727–736.
- Wang, Y., Wang, J., Yang, F., and Yang, X. (2012). Probing biomolecular interactions with dual polarization interferometry: real-time and label-free coralyne detection by use of homoadenine DNA oligonucleotide. *Anal. Chem.* *84*, 924–930.
- Wang, Z., Duan, N., Li, J., Ye, J., Ma, S., and Le, G. (2011). Ultrasensitive chemiluminescent immunoassay of *Salmonella* with silver enhancement of nanogold labels. *Luminescence* *26*, 136–141.
- Warren, L.S., Benoit, R.E., and Jessee, J.A. (1978). Rapid enumeration of fecal coliforms in water by a colorimetric beta-galactosidase assay. *Appl. Environ. Microbiol.* *35*, 136–141.
- Wellinghausen, N., Frost, C., and Marre, R. (2001). Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 3985–3993.
- Wen, C.-Y., Hu, J., Zhang, Z.-L., Tian, Z.-Q., Ou, G.-P., Liao, Y.-L., Li, Y., Xie, M., Sun, Z.-Y., and Pang, D.-W. (2013). One-step sensitive detection of *Salmonella typhimurium* by coupling magnetic capture and fluorescence identification with functional nanospheres. *Anal. Chem.* *85*, 1223–1230.
- Wen, J., Legendre, L.A., Bienvenue, J.M., and Landers, J.P. (2008). Purification of nucleic acids in microfluidic devices. *Anal. Chem.* *80*, 6472–6479.
- Wolter, A., Niessner, R., and Seidel, M. (2007). Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays. *Anal. Chem.* *79*, 4529–4537.
- Wolter, A., Niessner, R., and Seidel, M. (2008). Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system. *Anal. Chem.* *80*, 5854–5863.
- Wutz, K., Meyer, V.K., Wacheck, S., Krol, P., Gareis, M., Nölting, C., Struck, F., Soutschek, E., Böcher, O., Niessner, R., et al. (2013). New route for fast detection of antibodies against zoonotic pathogens in sera of slaughtered pigs by means of flow-through chemiluminescence immunochips. *Anal. Chem.* *85*, 5279–5285.
- Yáñez, M.A., Barberá, V.M., and Catalán, V. (2007). Validation of a new seminested PCR-based detection method for *Legionella pneumophila*. *J. Microbiol. Methods* *70*, 214–217.

- Yaradou, D.F., Hallier-Soulier, S., Moreau, S., Poty, F., Hillion, Y., Reyrolle, M., André, J., Festoc, G., Delabre, K., Vandenesch, F., et al. (2007). Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1452–1456.
- Yoon, J.-Y., and Kim, B. (2012). Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety. *Sensors* 12, 10713–10741.
- Young, K.T., Davis, L.M., and DiRita, V.J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 665–679.
- Yue, W.-F., Du, M., and Zhu, M.-J. (2012). High temperature in combination with UV irradiation enhances horizontal transfer of *stx2* gene from *E. coli* O157:H7 to non-pathogenic *E. coli*. *PLoS ONE* 7, e31308, 1–7.
- Zhang, H.-R., Xu, J.-J., and Chen, H.-Y. (2013). Electrochemiluminescence ratiometry: a new approach to DNA biosensing. *Anal. Chem.* 85, 5321–5325.
- Zhou, W.-J., Halpern, A.R., Seefeld, T.H., and Corn, R.M. (2012). Near infrared surface plasmon resonance phase imaging and nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance phase imaging for ultrasensitive protein and DNA biosensing with oligonucleotide and aptamer microarrays. *Anal. Chem.* 84, 440–445.
- Zhu, L.-X., Zhang, Z.-W., Wang, C., Yang, H.-W., Jiang, D., Zhang, Q., Mitchelson, K., and Cheng, J. (2007). Use of a DNA microarray for simultaneous detection of antibiotic resistance genes among *Staphylococcal* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3514–3521.
- Zhu, N., Zhang, A., Wang, Q., He, P., and Fang, Y. (2004). Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes. *Anal. Chim. Acta* 510, 163–168.
- Zhu, P., Shelton, D.R., Karns, J.S., Sundaram, A., Li, S., Amstutz, P., and Tang, C.-M. (2005). Detection of water-borne *E. coli* O157 using the integrating waveguide biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 21, 678–683.
- Zhu, P., Shelton, D.R., Li, S., Adams, D.L., Karns, J.S., Amstutz, P., and Tang, C.-M. (2011). Detection of *E. coli* O157:H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* 30, 337–341.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., and Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32, e103, 1–10.