

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Identifizierung von Bakterien durch Sequenzierung der 16S-rDNA – Amplifikate	AM020
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, Juli 2006 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich des Verfahrens

Die Methode beschreibt ein Verfahren zur Amplifikation des 5'-Endes der 16S-rDNA aus Bakterien und nachfolgenden Sequenzierung des PCR-Produktes. Das für die Amplifizierung verwendete Primerpaar 27f/ 926R bindet an hoch konservierte Bereiche der 16S-rRNA-Gene von Eubakterien (1, 3). Dies gilt auch für das Primerpaar 16S-FW/16S-Rev.

Nach Extraktion der genomischen DNA wird ein 899 Bp bzw. 1041 Bp großes Fragment mittels PCR vervielfältigt und gelelektrophoretisch nachgewiesen.

Anschließend wird eine Sequenzierung der hochvariablen 16S-rDNA Bereiche zur Identifizierung von Bakterien durchgeführt. Dazu wird das PCR-Produkt zunächst aufgereinigt und anschließend mit dem Primer 27f bzw. 16S-FW sequenziert. Zur weiteren Bestätigung sollte zusätzlich mit den Rückwärtsprimern 926R bzw. 16S-Rev sequenziert werden.

2. Kurzbeschreibung

Der Nachweis beruht auf der PCR (polymerase chain reaction) und nachfolgenden Sequenzierung des PCR-Produktes unter Verwendung der PCR-Primer. Dazu sind folgende Arbeitsschritte durchzuführen:

- Isolierung der genomischen DNA aus Bakterien
- Durchführung der 16S-rDNA - PCR
- Aufreinigung des PCR-Produktes
- Sequenzierung des PCR-Produktes
- Auswertung der 16S-rDNA-Sequenz über BLAST N

3. 16S-rDNA-Amplifizierung

3.1. Chemikalien, Verwendete Primer und Kontroll-DNA

Hinweis: Die Chemikalien müssen analysenrein, steril und für die Molekularbiologie geeignet sein.

Alle Verdünnungen werden mit sterilem Reinstwasser* angesetzt.

*Reinstwasser, steril: VE-Wasser, welches über eine Reinstwasseranlage aufgereinigt und anschließend autoklaviert wurde

- Reinstwasser, steril
- dNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MgCl₂- Lösung
- Taq- Polymerase oder Hot-Start- Polymerase mit geeignetem Puffer
→ *alternativ:* HotStar- Mastermix (enthält Puffer, dNTP's, MgCl₂ und Polymerase)

Primer	Sequenz:	Spezifität
Primer 27f	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'	Eu- und Archaeobakterien
Primer 926R	5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3'	Eu- und Archaeobakterien
Primer 16S-FW	5' GAA GAG TTT GAT CAT GGC TCA G 3'	Eu- und Archaeobakterien
Primer 16S-Rev	5' ACG ACA GCC ATG CAG CAC CT 3'	Eu- und Archaeobakterien

Alle Primer werden in einer Konzentration von 20 pmol/μl (Arbeitslösung 20 μMol/l) eingesetzt.

Positivkontrolle: Eubakterielle genomische DNA, z.B. *E. coli* DH5α

3.2 Geräte und Materialien

- sterile Mikroliterreaktionsgefäße: 2 ml und 1,5 ml
- Sterile, dünnwandige PCR-Reaktionsgefäße: 0,2 ml
- Mikroliter- Kolbenhubpipetten (variable Volumina)
- Einmal- Pipettenspitzen (diverse Volumina, aerosolgeschützt, steril)
- Mikroliterzentrifuge
- Thermocycler

3.3. Durchführung

3.3.1 Lagerung der Proben und DNA- Gewinnung

Die Bakterienproben werden auf geeignetem Nährböden bei der jeweils optimalen Temperatur kultiviert und bei $6 \pm 2^\circ\text{C}$ gelagert oder als Glycerindauerkulturen eingefroren.

Zur DNA-Gewinnung aus frisch kultivierten Bakterien eignen sich beispielsweise kommerzielle Kitsysteme sowie Methoden, die bei Sambrook et al. (4) beschrieben sind.

Die DNA-Konzentration in den erhaltenen Extrakten kann beispielsweise durch Messung im UV/VIS-Spektrophotometer ermittelt oder nach einer Elektrophorese im Agarosegel abgeschätzt werden.

3.3.2 PCR-Reaktion

Abhängig vom verwendeten Thermocycler werden die Reaktionen in geeigneten Gefäßen angesetzt. Alle Reagenzien werden während des Pipettierens auf Eis gelagert.

Beispielhaft werden hier jeweils Reaktionsansätze aufgeführt, bei denen das Endvolumen der Einzelreaktion 25 μl beträgt. Der PCR- Ansatz kann mit anderen Volumina erfolgen, die Konzentration der Zutaten ist dann entsprechend anzupassen.

Mastermix: bei einer größeren Anzahl von Reaktionsansätzen (mehr als drei Ansätze) wird ein Mastermix hergestellt, der mit Ausnahme der DNA-Probe alle Einzelbestandteile des Reaktionssatzes enthält.

Jede zu untersuchende Probe wird mit dem Primerpaar 27f/926R und/ oder 16S-FW/ 16S-Rev amplifiziert.

Es wird jeweils eine **Amplifikationsreagenzkontrolle** (1 μl Reinstwasser statt der Probe), eine **Positivkontrolle** (eubakterielle DNA, z.B. *E. coli*), eine **negative Extraktionskontrolle** (z.B. Nährmedium) und ggf. eine **positive Extraktionskontrolle** (eubakterielle DNA, z.B. *E. coli*) mitgeführt.

3.3.3 Standard -PCR-Reaktionsansatz

Tabelle 1: PCR- Reaktionsmix Primerpaar 27f / 926-R bzw. 16S-FW/ 16S-Rev

Reaktionsvolumen: 25 µl		
Reagenz (Stammlösung)	Konzentration im Einzel- PCR- Ansatz	Reaktionsmix für n* PCR- Ansätze
10x PCR-Reaktionspuffer	1 x	n x 2,5 µl
MgCl ₂ , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	n x 1,5 µl
dNTP-Mix, 1 mmol/l je dNTP	0,1 mmol/l je dNTP	n x 2,5 µl
Primer 27f; 20 µmol/l	0,4 µmol/l	n x 0,5 µl
Primer 926-R, 20 µmol/l	0,4 µmol/l	n x 0,5 µl
Taq- oder Hotstart- Polymerase (5 units/ µl)	0,5-1 unit	n x 0,1 µl
steriles Reinstwasser	--	n x µl (ad 24 µl)
Jeweils 24 µl Reaktionsmix werden in die PCR- Gefäße pipettiert. Anschließend wird die Proben- DNA zugesetzt :		
Stammlösung	DNA-Menge im Einzel- PCR-Ansatz	Zugabe pro PCR- Ansatz
Proben- DNA (10 - 200 µg/ ml)	10 – 200 ng	1 µl

* Es wird ca. 5% mehr Reaktionsmix als nötig hergestellt, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

** Reagenz nur zusetzen, wenn nicht bereits im Reaktionspuffer enthalten (wie z. B. bei HotStar[®]- Mastermix)

- Reaktionsansätze in den geschlossenen PCR- Gefäßen gut mischen, ggf. mit Mineralöl überschichten und kurz zentrifugieren.
- Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur- Zeit- Programm starten (siehe unten). Die PCR- Bedingungen, besonders die Annealing- Temperatur, sind für jeden Thermocycler und für die verwendeten Polymerasen einzeln anzupassen:
- Temperatur-Zeit-Programm: **27f/926r**
 - 1 x 10 Min bei 95 °C Aktivierung der Hotstart-Polymerase z.B. Amplitaq Gold
 - 35 x 60 Sec bei 95 °C Denaturierung
 - 60 Sec bei 50 °C Annealing
 - 90 Sec bei 72 °C Synthese
 - 1 x 10 Min. bei 72 °C Elongation
- Temperatur-Zeit-Programm: 16S-FW/ 16S-Rev
 - 1 x 10 Min bei 95 °C Aktivierung der Hotstart-Polymerase z.B. Amplitaq Gold
 - 35 x 60 Sec bei 95 °C Denaturierung
 - 60 Sec bei 53 °C Annealing
 - 90 Sec bei 72 °C Synthese
 - 1 x 10 Min. bei 72 °C Elongation

3.3.4 Lagerung und PCR-Analyse

Nach Beendigung des PCR-Programmes sind die PCR-Reaktionsansätze bei 6 ± 2°C

im Kühlschrank zu lagern oder direkt weiter zu bearbeiten. Dazu werden 5 µl des Reaktionsansatzes über ein 1 % iges Agarosegel analysiert. Die Gelanalyse und -dokumentation der PCR-Produkte erfolgt analog zur SOP „**PCR- Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate- resistenten transgenen Pflanzen**“ des UAM (Unterausschuss „Methodenentwicklung“) der B/LAG vom März 2002.

Für die nachfolgende Sequenzierung werden 20 µl des Reaktionsansatzes aufgereinigt.

3.4 Auswertung der PCR

Negativ- Kontrollen

Sowohl die Amplifikationsreagenzkontrolle (Wasser) als auch die Negativ- Kontrollen (siehe 3.3.2) müssen in der PCR- Reaktion negative Ergebnisse liefern. Positive Befunde bei diesen Kontrollen lassen auf eine Verschleppung von DNA schließen. Sollten diese Kontrollen ein PCR-Amplifikat enthalten, ist der gesamte PCR- Ansatz bzw. die DNA-Extraktion zu wiederholen.

Kontroll- PCR

Die Kontroll- PCR mit der Positivkontrolle *E. coli* DNA muss ein Amplifikat in der erwarteten Größe liefern. Ein negativer Befund weist darauf hin, dass die aus der Probe extrahierte DNA nicht in ausreichender Menge und/ oder Reinheit vorliegt. In diesem Fall muss vor dem Einsatz in der spezifischen PCR eine DNA-Aufreinigung durchgeführt werden, oder die DNA- Extraktion ist zu wiederholen. Deren Ergebnis ist wiederum in der Kontroll-PCR zu testen.

Die PCR mit dem Primerpaar 27f/926R bzw. dem Primerpaar 16S-FW/ 16S-Rev muss bei der untersuchten Probe ein Amplifikat in der erwarteten Größe liefern. Ein negativer Befund weist darauf hin, dass die aus der Probe extrahierte DNA nicht in ausreichender Menge und/ oder Reinheit vorliegt, oder nicht aus Eubakterien stammt. In diesem Fall muss die DNA- Extraktion wiederholt werden. Deren Ergebnis ist wiederum in der PCR zu testen.

4. Aufreinigung von PCR-Produkten

4.1 Anwendungsbereich

Die Methode eignet sich zur schnellen Aufreinigung von PCR-Produkten in der Größenordnung von 100 bp bis 10 kb über Silikagel-Säulen (Zeitbedarf < 1/2 Stunde). Bei der Reinigung werden Primer, Nukleotide, Salze und Polymerasen aus der vorangegangenen PCR-Reaktion entfernt. Die nach dieser Methode gereinigten PCR Produkte sind beispielsweise für den Einsatz zur Sequenzierung, T-RFLP Analyse oder Klonierung geeignet.

Anmerkung: Alternativ können andere Aufreinigungsmethoden eingesetzt werden.

4.2. Grundlage des Verfahrens

Amplifizierte DNA wird, unabhängig davon ob die PCR-Reaktion mit oder ohne Öl durchgeführt wurde, während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikagelmembran einer Zentrifugationssäule gebunden (Festphasenextraktion), durch einen Waschschrift gereinigt und mit HPLC-Wasser eluiert.

4.3 Geräte und Material

Kunststoffmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Neben den üblichen Laborgeräten kommen folgende Geräte und Materialien zum Einsatz:

4.3.1 Verbrauchsmaterial

- Einweghandschuhe
- Mikrolitergefäße
- Aerosolgeschützte Pipettenspitzen, steril (diverse)

4.3.2 Geräte

- Mikroliterzentrifuge
- Mikroliter- Kolbenhubpipetten (variable Volumina)

4.3.3 Chemikalien / Reagenzien

- QIAquick PCR Purification Kit, Fa.Qiagen, Hilden
Achtung: Puffer PB enthält Guanidinium-Hydrochlorid. Handschuhe und Schutzbekleidung tragen.
- Abs. unvergällten Ethanol
- HPLC-Wasser, steril

4.3.4 Bemerkungen zum Kit

QIAquick PCR Purification Kit:

- Benötigte Bestandteile des Kits: Puffer PB und PE, Spin Säulen, Sammelgefäße
- Alle Puffer des Kits bei Raumtemperatur (RT) aufbewahren
- Alle Zentrifugationsschritte sind bei RT durchzuführen
- Herstellung von Puffer PE: Zugabe abs. Ethanol zu Lösung PB (Mengenangabe s. Etikett Lösung PB)

4.4 Durchführung

- Zugabe von 5 Volumen PB (mit Ethanol versetzt) zu einem Volumen PCR-Produkt, z.B. 100 µl Puffer PB zu 20 µl PCR Produkt.
Anmerkung: Es ist nicht notwendig, Öl aus der PCR-Reaktion zu entfernen. Soll das gesamte PCR-Produkt aufgereinigt werden, kann die Zugabe des PB-Puffer in das PCR-Reaktionsgefäß erfolgen, ansonsten sind 1,5 ml Mikrolitergefäße zu verwenden.
- Probe gut mischen (z.B. Vortex) und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- Spin-Säule in ein Sammelgefäß überführen, Deckel der Säule mit Probennummer beschriften
- Probe auf die Spinsäule pipettieren
- 1 Min. bei 17.900 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 750 µl Puffer PE auf die Säule geben, 1 min bei 17.900 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- erneut 1 Min. bei 17.900 x g zentrifugieren, um den Puffer PE von der Säule zu entfernen und die Säule vollständig zu trocknen, Durchfluss verwerfen
- Säule in beschriftetes, steriles 1,5 ml Mikrolitergefäß überführen und 30 µl steriles HPLC-Wasser auf die Säule pipettieren
- 1 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 Min. bei 17.900 x g zentrifugieren
- Die Proben werden beschriftet und bis zum Abschluss der Untersuchung, z.B. Sequenzierung, bei $6 \pm 2^\circ\text{C}$ gelagert. Die Dauerlagerung erfolgt bei $-20 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.5 Qualitätssicherung, Überprüfung der gereinigten PCR-Produkte

Anhand nachfolgender Analysen (z.B Sequenzierung oder T-RFLP Analysen) kann auf die Qualität der Proben geschlossen werden. Alternativ kann durch eine anschließende Agarosegelelektrophorese eine Abschätzung der Reinheit, Menge und Qualität der PCR-Produkte erfolgen.

4.6 Literatur

QIAquick Spin Handbook, July 2002

5. Sequenzierung des PCR-Produktes mittels Kapillarelektrophorese

5.1. Anwendungsbereich

Die automatische DNA-Sequenzierung dient zur Bestimmung der Nukleotidabfolge in bestimmten Genbereichen, z.B. der 16S-rDNA. Mit der ermittelten 16S-rDNA-Sequenz kann in der Regel durch einen Vergleich mit einer DNA-Datenbank (Genbank) ermittelt werden, um welche Bakterienspezies es sich handelt. Die Methode eignet sich im Rahmen der Überwachung zur Identifizierung und Überprüfung der Organismen.

Nach entsprechender Probenvorbereitung wird die Sequenzierung des PCR-Produktes durchgeführt.

Beispielhaft ist im folgenden die Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese ABI310 beschrieben. Alternativ können andere Sequenzierer eingesetzt werden. Die Durchführung der Sequenzierung ist dann den jeweiligen Herstellerangaben zu entnehmen.

5.2. Grundlage des Verfahrens

Die DNA-Sequenzierung mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer beruht auf einer vollautomatischen Kapillarelektrophorese mittels Multicolor-Technik. Zur Trennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden spezielle Polymere (POP: performance optimized polymer) verwendet, die sowohl native als auch denaturierende Analysen erlauben. Die Detektion erfolgt über ein Lasermodul und eine CCD-Kamera.

Die Sequenzierung erfolgt nach SANGER im Cycle Sequencing Verfahren unter Verwendung der DNA Taq Polymerase TaqFS™ und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (one-tube-Dye terminator Sequenzierung) oder fluoreszenzmarkierten Primern (Dye primer Sequenzierung). Dabei wird für jede der vier Basen ein eigener Farbstoff verwendet, so dass die Analyse einer kompletten Sequenzreaktion in einem einzigen Lauf erfolgt (Multi-Color-Detection). Unterschiedliche Kapillarlängen (47 cm, 61 cm) und Analysezeiten ermöglichen flexibel zwischen sehr kurzen Analysen von etwa 450 Basen Leseweite in etwa 50 Minuten und langen Leseweiten bis 700 Basen in etwa 150 Min. zu wählen.

5.3 Material

5.3.1 Geräte

Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Neben den üblichen Laborgeräten kommen folgende Geräte und Materialien zum Einsatz:

- ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Kapillarelektrophorese), Applied Biosystems
- Mikroliterzentrifuge
- Thermocycler
- Kolbenhubpipetten, variable Volumina

5.3.2. Verbrauchsmaterial

- Einweghandschuhe
- PCR-Gefäße steril 0,2 ml
- PCR-Gefäße steril 0,5 ml
- Mikrolitergefäße, steril
- Sterile aerosolgeschützte Pipettenspitzen
- 310 Capillary, 47cm/ 50 µm Applied Biosystems
- Genetic Analyzer 0,5 ml Sample Tubes Applied Biosystems
- Genetic Analyzer Septa für 0,5 ml Sample Tubes Applied Biosystems

5.4. Chemikalien, Lösungen und Kits

Für die Sequenzierung mit dem ABI310 wird für die Herstellung aller Lösungen, Verdünnungen sowie zum Reinigen HPLC-Wasser (unsteril) eingesetzt.
(Ausnahme: Primerlösungen, 3M NaAcetat und 70 % Ethanol)

Chemikalien:

- Sequenzierprimer 27f-1 bzw. 27f-2 bzw. 926-R, s. Kap. 3.1
- POP6 Applied Biosystems; Lagerung $6 \pm 2^\circ\text{C}$
- Hi-Di Formamid Applied Biosystems; Lagerung $6 \pm 2^\circ\text{C}$
- TSR (Template Suppressing Reagent) Applied Biosystems; Lagerung $6 \pm 2^\circ\text{C}$
- 10 x ABI 310 Genetic Analyzer Buffer mit EDTA (50 ml), Applied Biosystems; Lagerung $6 \pm 2^\circ\text{C}$
- HPLC- Wasser z.B. Fluka
- Natriumacetat
- Salzsäure zum pH-Wert einstellen
- Natriumhydroxid zum pH-Wert einstellen

Lösungen:

- 3 M NaAcetat pH 5,2
- 70% Ethanol

Kits:

- ABI 310 Big Dye Terminator Kit, Vers. 1.1 Applied Biosystems bestehend aus:
 - a) Terminator Ready Reaction Premix
 - b) Kontroll-DNA (pGEM-3ZF(+)) Plasmid-DNA Kontroll-Template $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
 - c) Kontroll-Primer (-21M13 (forward) Kontrollprimer, $0,8 \text{ pMol}/\mu\text{l}$) Lagerung bei $(-20^\circ\text{C}; \text{R. } 633)$
- Dye Ex Spin Kit Qiagen, Hilden

5.5 Sequenzierungsansatz (Cycle Sequencing)

Die Herstellung des Sequenzierungsansatzes erfolgt analog zur Herstellung eines PCR-Ansatzes.

<u>Sequenzierungsansatz</u>	<u>Standard-PCR</u>	<u>Kontroll-PCR (z.B.pGEM-3Zf)</u>
Premix (ABI310 Big Dye Terminator Kit 1.1)	4 μl	4 μl
DNA-Template	1-5 μl	2 μl *
Sequenzier-Primer (Arb.Lsg:10 pmol/ μl)	0,5 μl	5 μl
HPLC-Wasser	(ad 20 μl)	(ad 20 μl)

* Kontroll-DNA (z.B. pGEM-3ZF(+)) Plasmid-DNA Kontroll-Template), Amplifikation mit dem Kontrollprimer -21M13(forward) aus dem ABI 310 Big Dye Terminator Kit, Vers. 1.1 (s. 5.4)

5.6 Thermocycling

25 Zyklen:

96 $^\circ\text{C}$	30 sec	
50 $^\circ\text{C}$	15 sec	
60 $^\circ\text{C}$	4 min	
72 $^\circ\text{C}$	2 min	1x
Pause	10 $^\circ\text{C}$	

5.7 Aufreinigung der Sequenzierungsansätze

Nach Amplifikation der Sequenzierungsreaktion werden die DNA-Produkte aufgereinigt. Nachfolgend ist beispielhaft eine Aufreinigung über Dye Ex Spin – Säulen beschrieben. Andere Aufreinigungsmethoden sind ebenfalls anwendbar.

Aufreinigung über Dye Ex 2.0 Spin-Säulen

- Säule vorsichtig vortexen
- Deckel durch eine ¼ Drehung lockern (damit kein Vakuum entstehen kann)
- Unteren Ablaufdeckel entfernen und Säule in 2 ml Abfallgefäß setzen
- 3 Min. bei 770 x g und RT zentrifugieren
- Säule vorsichtig in steriles 1,5 ml Mikroliterreaktionsgefäß setzen
- 20 µl Sequenzierungsansatz zentral aufpipettieren
- 3 Min. bei 800 x g in der Mikroliterzentrifuge und RT zentrifugieren
- Eluat von 20 µl enthält die aufgereinigten Sequenzierprodukte
- Probenvorlage für ABI 310: 10 µl Eluat + 10 µl Hi-Di-Formamid (oder TSR) in spezielle 0,5 ml ABI-Reaktionsgefäße überführen; mit Septum verschließen

5.8 Geräteeinstellungen Kapillarelektrophorese

Die jeweils erforderlichen Geräteeinstellungen und Wartungsmaßnahmen sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

5.8.1 Parameter für die Sequenzanalyse

Alle Parameter, die das Gerät steuern, sind mit der Gerätesoftware am zugehörigen Computer einzustellen. Die folgenden Einstellungen gelten bei Verwendung der unter Punkt 5.3 genannten Komponenten (ABI 310 Big Dye Terminator Kit, Vers. 1.1, kurze Kapillare, POP6) und müssen nicht verändert werden.

Modul:	SeqPOP6Rapid (1ml)
Dye Set Primer:	DT POP6 (BD Set any Primer)
Matrix:	SeqSetE
Basecaller:	Basecaller-310 POP6
Injection Sec.:	30
Injection kV:	2,0
Run kV:	15,0
Run °C:	50
Run Time:	36 Min.

Mit diesen Einstellungen können etwa 450 Bp sequenziert werden.

5.9 Messung, Auswertung und Qualitätssicherung

In der Sequenzierungsreaktion wird von der eingesetzten DNA-Probe eine Vielzahl neuer DNA-Fragmente generiert, die sich jeweils in der Länge um ein Nukleotid unterscheiden und am 3'-Ende mit einem fluoreszierenden Nukleotid markiert sind. Jedes der vier verschiedenen Nukleotide ist mit einem Farbstoff markiert. Die DNA-Fragmente wandern entsprechend ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in der Kapillarelektrophorese. Die vom Laser des Sequenziergerätes am Ende der Kapillare detektierten Intensitätssignale der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden als Rohdaten von der Systemsoftware laufend gesammelt und in einer Datei abgespeichert. Die „Farbe“ der Peaks der Rohdaten wird von der Software „Sequencing Analysis“ den entsprechenden Nukleotiden (A, C, G, T) zugeordnet. Die so erhaltene DNA-Sequenz kann nach visueller Kontrolle noch manuell editiert werden.

Eine Sequenzierungsreaktion ist als gut zu bewerten, wenn die Peaksignale gut getrennt sind (spacing 11-12) und die Signalthöhe der Rohdaten zwischen 2000 und 3000 liegt. In einer guten

Reaktion sollten mindestens 350 Basen lesbar sein und die Fehlerrate (Anzahl der N's) < 5 % liegen. Für die Auswertung im Rahmen der Überwachung sind jedoch auch kurze fehlerfreie Sequenzbereiche von 100 – 200 Basen häufig schon ausreichend, um bestimmte Sequenzen über Sequenzvergleiche (z.B. über BLAST N) durchführen zu können. Eine Sequenz ist nicht auswertbar, wenn schon zu Beginn der Sequenz Fehler (N's) auftreten und diese über den gesamten Sequenzverlauf verteilt sind. In diesen Fällen ist zu überprüfen, ob die Qualität der eingesetzten DNA gewährleistet ist.

Die Funktionalität der verwendeten Chemikalien und die Gerätefunktion wird in laborintern festgelegten Intervallen mit einer Standard-DNA überprüft.

5.10 Datenbankrecherche

Die editierten DNA-Sequenzen können für die weitere Auswertung in eine geeignete DNA-Analyse-Software eingeladen und mittels Datenbankvergleich analysiert werden. Die Datenbankrecherche erfolgt beispielsweise bei www.ncbi.nlm.nih.gov/blast (BLAST N).

Als Ergebnis der Datenbankrecherche werden von BLAST N diejenigen Bakterienstämme ausgegeben, die die höchste Homologie zu der analysierten 16S-rDNA-Sequenz haben.

Bei einer Sequenzhomologie $\geq 98\%$ kann häufig eindeutig auf die Gattung und Spezies der analysierten Bakterienprobe geschlossen werden.

Bei einigen genetisch nahe verwandten Bakterienstämmen, z.B. zwischen *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia pestis*, Spezies innerhalb der *Bacillus cereus* Gruppe oder auch zwischen *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* bzw. *Bordetella bronchiseptica*, sind die 16S-rDNA-Sequenzen so ähnlich (hohe Sequenzhomologie, identischer score bei BLAST N – Auswertung), dass für eine eindeutige Spezieszuordnung zusätzliche physiologische und/ oder molekularbiologische Untersuchungen (z.B. MLST, PFGE) notwendig sind.

6. Validierung

Im Februar 2006 wurde diese Methode durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ der Bund/ Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik in einem Ringversuch validiert, an dem sechs bundesdeutsche Überwachungslaboratorien und ein Labor aus der Schweiz teilnahmen. Für die Sequenzierung der PCR-Produkte wurden Kapillarelektrophoresen der Firma Applied Biosystems ABI 310 (4 Labore), ABI 3100 (2 Labore) und der Firma Beckmann (1 Labor) erfolgreich eingesetzt.

Im Ringversuch wurde genomische DNA aus sechs Bakterienstämmen (*Morganella morganii*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Bordetella petrii* und *Bordetella parapertussis*) nach der vorliegenden SOP mit beiden Primersystemen analysiert und über BLAST N ausgewertet. Fünf der sechs Bakterienstämme wurden von allen teilnehmenden Laboratorien auf Speziesebene mit über 98% Homologie eindeutig identifiziert. Der Bakterienstamm *Bordetella parapertussis* ließ sich mittels 16S-rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene nicht von *Bordetella pertussis* bzw. *Bordetella bronchiseptica* abgrenzen; dies wurde von allen teilnehmenden Laboren richtig festgestellt.

Alle teilnehmenden Laboratorien wendeten die vorliegende Nachweismethode „mit Erfolg“ an.

7. Literatur

1. STACKEBRANDT, E., M. GOODFELLOW. (1991) Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons, Chichester.
2. WEISBURG, W. G., S. M BARNES, D. A. PELLETIER, D. J. LANE (1991). 16S-Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. Journal of Bacteriology. 173, 2: 697-703
3. LIU ET AL., (1997), Applied and Environmental Microbiology 63, 4516-4522

4. SAMBROOK J, E.F. FRITSCH, T. MANIATIS (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring harbour press