

Vergleichende Versuche zur DNS-Gewinnung aus den Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii*

Astrid Müller, A. Hassl, H. Aspöck

Einleitung

Der Nachweis einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* des Menschen basiert zwar grundsätzlich auf dem Nachweis spezifischer Antikörper, doch kommt in bestimmten Fällen dem direkten Erregernachweis eine entscheidende Rolle zu. Vor allem gilt dies einerseits für die pränatale Diagnostik, wenn der Erreger im Fruchtwasser nachgewiesen werden soll, andererseits für die Diagnostik der Toxoplasmose von Immungeschwächten, insbesondere HIV-Positiven, bei denen auch bei einer akut und unmittelbar lebensbedrohlich verlaufenden Toxoplasmose der Antikörper-Nachweis kein schlüssiges Ergebnis zu liefern imstande ist (4). Neben einer Reihe gut etablierter Verfahren — Färbungen zum direkten Nachweis des Erregers, Isolierung und Anzüchtung von Toxoplasmen in Versuchstieren oder Gewebekulturen und schließlich Tests zum Nachweis von zirkulierendem Antigen — kommt mehr und mehr der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) große Bedeutung zu.

Das Verfahren basiert auf der Amplifikation und dem Nachweis von spezifischen DNS-Stücken des Erregers und gestattet damit die Aufdeckung einer Infektion auch bei extrem geringer Parasitendichte, wenn andere Verfahren versagen. Unabdingbare Voraussetzung für das Gelingen einer PCR ist die Isolierung und Aufbereitung der DNS des Erregers. Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, welchem von vier etablierten Verfahren unter dem Gesichtspunkt der Effizienz der Vorzug zu geben ist.

Material und Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurden Reagenzien der Firma Merck, Deutschland, verwendet.

SPF-Mäuse (OF 1-Swiss, Versuchstierzuchtanstalt Himberg, NÖ) wurden mit je 10^6 Toxoplasma-Trophozoiten (Stamm RH) i. p. beimpft. Die Tachyzoiten wurden nach 48 Std. geerntet. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5 min., 1500 g) und die Pellets mit je 3 ml NaCl-Lösung aufgespült. Die Tachyzoiten wurden in einer Bürker-Türk-Zählkammer ausgezählt. Für jede Isolierung bzw. für jedes Aufbereitungsverfahren wurde eine Ausgangsmenge von 2×10^8 Tachyzoiten verwendet. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min., 1500 g) wurden die Pellets nach folgenden vier Methoden verarbeitet:

1. Methode A nach MANIATIS et al. (6)

Das Material wurde mit 1 ml TBS (25 mmol Tris Borat Puffer, LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden, pH 7,4, 4° C) gewaschen und 1 min. bei 6720 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 50 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgespült, mit Extraktionspuffer (10 mM Tris, 0,1 M EDTA, 0,5% SDS, pH 8,0) sowie mit RNase (Pharmacia Ges. m. b. H., Wien) versetzt und 1 Std. bei 37° C inkubiert. Der Extraktionspuffer führt die Lyse der Zellen herbei. Nach Zugabe von 5 µl Proteinase K (Biomedica Ges. m. b. H., Wien) wurde die Probe 3 Std. bei 50° C inkubiert.

Darauf folgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI-Extraktion). Dabei wurde die Probe mit 550 µl Phenol versetzt, zentrifugiert (1 min., 6720 g), die wässrige Phase abgehoben und die organische Phase verworfen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurden 550 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24 : 1) hinzugefügt und zentrifugiert (1 min., 6720 g). Die Äthanol-Präzipitation der DNS (400 µl Probe, 80 µl 10 mol Ammoniumazetat, 800 µl Äthanol) wurde bei -70° C über Nacht durchgeführt.

Die Probe wurde nach der Präzipitation 10 min. bei 6720 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde 1 Std. 15 min. im Lyophilisator (SVC 200H, Savant, Bio-Trade Ges. m. b. H., Wien) getrocknet, mit 30 µl TE aufgespült und der DNS-Gehalt bestimmt.

2. Methode B nach BURG et al. (1)

Um die Zellen zur Lyse zu bringen, wurde das Pellet mit 50 µl Aqua bidestillata versetzt und 10 min. auf 94° C erhitzt. Hierauf wurde die Probe mit einem Puffer (10 mmol Tris-HCl, pH 7,4, 10 mmol NaCl, 10 mmol EDTA, 0,2% SDS) und 10 µl Proteinase K versetzt und 2 Std. bei 60° C inkubiert. Darauf folgten eine PCI-Extraktion und Äthanol-Präzipitation wie oben beschrieben. Das Pellet wurde anschließend mit 60 µl TE aufgespült.

3. Methode C nach GROVER et al. (3)

Das Pellet wurde mit 225 µl Aqua bidestillata versetzt und 1 Std. bei -70° C eingefroren, um die Zellen zur Lyse zu bringen. Anschließend wurde die Probe aufgetaut, 15 min. auf 94° C erhitzt, geschüttelt und zentrifugiert (10 min., 6720 g). Aus dem Überstand wurde der DNS-Gehalt bestimmt.

4. Methode D nach ERLICH et al. (2)

Das Pellet wurde mit je 100 µl 0,1 M NaOH und 2 M NaCl versetzt, geschüttelt und 5 min. auf 99° C erhitzt. Dann wurde die Probe 10 min. bei 6.720 g zentrifugiert und anschließend aus dem Überstand der DNS-Gehalt bestimmt.

Zur Bestimmung des DNS-Gehalts wurde dann von allen Proben mit einem Spektrophotometer (Lambda 3 UV/VIS, Perkin Elmar Ges. m. b. H., Wien) die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 320 nm gemessen. Die Schichtdicke der Küvetten beim Messen im UV-Bereich betrug 10 mm.

Der DNS-Gehalt wurde nach folgender Formel für Doppelstrang-DNS berechnet (6) :

$$\text{Menge an DNS in } \mu\text{g/ml} = 20 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320})$$

Ergebnisse

Der bei den vier angewandten Methoden (A, B, C und D) bestimmten DNS-Gehalt ist in Tabelle 1 aufgelistet.

TABELLE 1

Ergebnisse von vier Methoden zur Isolierung von DNS aus je 2×10^8 Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii*.

Methode	Probengröße in μl	DNS-Gehalt d. Probe in μg	DNS-Gehalt in $\mu\text{g/ml}$
A	30	52,5	1750
B	60	69	1150
C	225	242	1070
D	200	262	1450

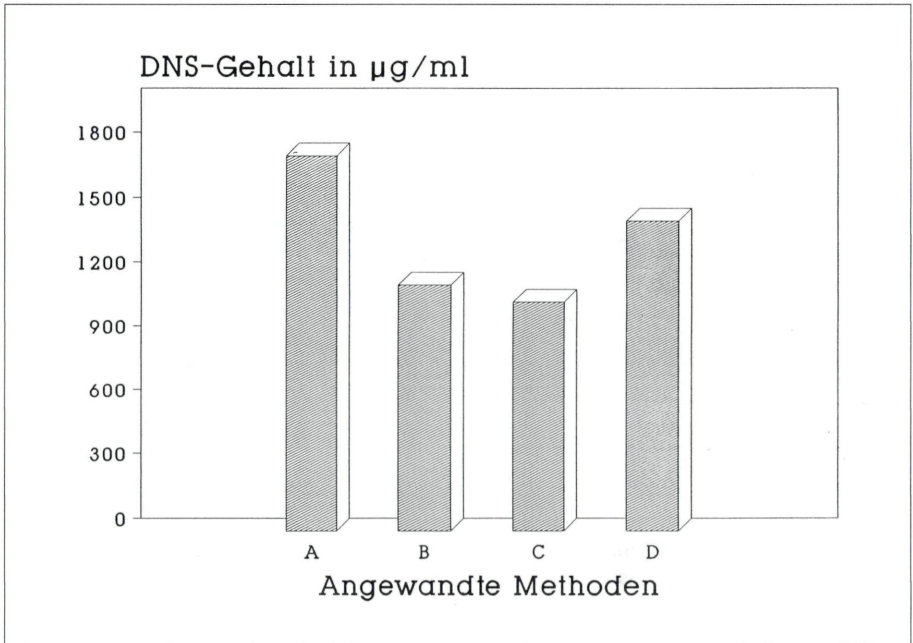


Abb. 1:

Vergleich der durchschnittlichen DNS-Ausbeute in $\mu\text{g/ml}$ bei Anwendung der Methoden A, B, C und D.

Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Effizienz, d. h. Ausbeute und Arbeitsaufwand, von vier DNS-Isolierungs- bzw. Aufbereitungsmethoden zu überprüfen, um mittels der einfachsten und zeitsparendsten Methode zu der für eine Polymerase-Ketten-Reaktion notwendigen DNS-Menge — in unserem Fall DNS aus den Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii* — zu gelangen.

Ein wesentlicher Arbeitsschritt bei der Durchführung der Methode A nach MANIATIS et al. (6) und der Methode B nach BURG et al. (1) ist die Inkubation der Proben mit dem Enzym Proteinase K. Anschließend an die Inkubation werden die gespaltenen Proteine durch die PCI-Extraktion entfernt. Die DNS wird mit Äthanol ausgefällt, wobei beim Arbeiten mit geringen DNS-Konzentrationen die Äthanol-Präzipitation bei -70°C über

Nacht durchgeführt werden sollte (6). Als Endprodukt erhält man qualitativ hochwertige DNS. Auffallend ist, daß sich bei Durchführung der PCI-Extraktion mit der Methode B die organische Phase leichter von der wässrigen Phase trennen läßt als bei Durchführung der PCI-Extraktion mit der Methode A. Dieser Umstand ist auf die unterschiedliche Zusammensetzung des Extraktionspuffers zurückzuführen (6).

Die Trennung der organischen Phase — sie enthält die Proteine — von der wässrigen Phase — sie enthält die DNS — stellt bei routinemäßigem Arbeiten eine mögliche Quelle des DNS-Verlustes dar. Für bestimmte Fragestellungen, z. B. für Klonierungsversuche, benötigt man unbedingt reine DNS, so daß die Inkubation mit Proteinase K und die anschließende PCI-Extraktion unumgänglich sind. In solchen Fällen geben wir auf Grund des oben erwähnten Vorteils der Methode B den Vorzug.

Das eigentliche Ziel dieser Arbeit war es jedoch, von den vier DNS-Isolierungs- bzw. Aufbereitungsmethoden jene Methode zu ermitteln, die bei möglichst geringem Arbeitsaufwand die für eine PCR notwendige DNS-Menge erbringt. Für die erfolgreiche Durchführung einer PCR benötigt man mindestens $0,5 \mu\text{g}$ - $1 \mu\text{g}$ spezifische DNS pro PCR-Ansatz (5). Diese DNS-Menge wird von jedem der beschriebenen vier Verfahren bereitgestellt. Die höchste DNS-Ausbeute jedoch erzielt man mit der Methode A, gefolgt von der Methode D (siehe Tab. 1 und Abb. 1).

Die Methoden C nach GROVER et al. (3) und D nach ERLICH et al. (2) sind auf Grund fehlender Inkubation mit dem Enzym Proteinase K und fehlender PCI-Extraktion streng genommen nicht als DNS-Isolierungsmethoden im eigentlichen Sinn, sondern als DNS-Aufschlußmethoden anzusehen. Beide Methoden liefern DNS, die stark mit Proteinen und RNS verunreinigt ist. Diese Verunreinigungen wirken sich jedoch auf den DNS-Amplifikationsvorgang nicht negativ aus. Die Durchführung der beiden Methoden C und D ist wenig zeitintensiv und mit geringem Arbeits- und Materialaufwand verbunden. Mit der Methode D erzielt man eine höhere DNS-Ausbeute als mit der Methode C (siehe Abb. 1 und Tab. 1).

Bedenkt man den geringen Arbeitsaufwand, so muß man die Methode D nach ERLICH et al., auch wenn sie in der Skala der DNS-Ausbeute den zweiten Platz einnimmt, für die routinemäßige Aufbereitung der DNS aus den Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii* empfehlen.

Zusammenfassung

Vier Methoden zur Isolierung von DNS aus je 2×10^8 Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii* wurden hinsichtlich ihrer Effizienz verglichen. Jede Methode wurde mindestens zweimal durchgeführt. Die höchste DNS-Menge erbrachte die Methode nach MANIATIS et al., gefolgt von der Methode nach ERLICH et al. Die Methode nach MANIATIS et al. zeichnet sich überdies, ebenso wie jene nach BURG et al., durch einen hohen Reinheitsgrad der isolierten DNS aus, der allerdings mit großem Arbeitsaufwand bezahlt werden muß. Die optimale Relation von Ausbeute und Aufwand ergibt sich bei der Methode nach ERLICH et al., der wir daher zur Isolierung von DNS den Vorzug geben.

Schlüsselwörter

DNS-Aufbereitungsmethoden, Effizienz, Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii*.

Summary

A comparison of four methods for DNA-isolation from *Toxoplasma gondii* for polymerase chain reaction

Four methods for the isolation of DNA of 2×10^8 tachyzoites from *Toxoplasma gondii* were compared with respect to their efficiencies. Each method was performed at least

twice. The highest amount of DNA was obtained by the method of MANIATIS et al. followed by the method of ERLICH et al.

Both, MANIATIS' method as well as that according to BURG et al. yielded DNA of high purity, they require, however, a rather high expenditure of work. The best ratio of DNA-amount to expenditure was found with the method according to ERLICH et al., which therefore should be given preference for isolation of DNA from the tachyzoites of *Toxoplasma gondii*.

Key words

Methods for DNA-isolation, efficiency, tachyzoites from *Toxoplasma gondii*.

Literatur

1. BURG, J. L., GROVER, C. M., POULETTY, P., BOOTHROYD, J. C. (1989):
Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction.
Journal of Clinical Microbiology 27, 1787-1792.
2. ERLICH, H.:
PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification.
Stockton Press, New York, 1989.
3. GROVER, C. M., THULLIEZ, P., REMINGTON, J. S., BOOTHROYD, J. C. (1990):
Rapid prenatal diagnosis of congenital toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid.
Journal of Clinical Microbiology 28, 2297-2301.
4. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1990):
Antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by sera of AIDS-patients before, during and after clinically important infections.
Zbl. Bakt. 272, 514-525.
5. IBELGAUFTS, H.:
„Gentechnologie von A - Z“. Studienausgabe.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Bundesrepublik, 1990.
6. MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J.:
“Molecular Cloning“. A Laboratory Manual. 2nd Edition.
Cold Spring Harbor Laboratory Press (USA), 1989.

KORRESPONDENZADRESSE:

Cand. biol. Astrid Müller
Klinisches Institut für Hygiene
Abteilung für Medizinische Parasitologie

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

