

S 21.5 EINSATZ VON RESTRIKTIONSENZYMEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER SPEZIFITÄT VON PCR-PRODUKTEN

Astrid Müller, A. Haßl und H. Aspöck
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Vermehrung (Amplifikation) von Nukleinsäurestücken bekannter Sequenz. Seit kurzer Zeit setzen wir sie im Routinelabor zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* in verschiedenen Patientenmaterialien ein. Als Ziel-Sequenz verwenden wir ein 194 bp langes Stück des B1-Gens, das 35fach im Genom von *Toxoplasma gondii* vorliegt.

Auftrennung und Nachweis der PCR-Produkte erfolgen entweder mittels Agarose-Gel-Elektrophorese durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und Sichtbarmachung durch UV-Bestrahlung oder im Phast-Elektrophorese-System mittels Silberfärbung. Im ersten Fall erfolgt die Identifizierung der PCR-Produkte mittels einer shareware zur Molekulargewichtsbestimmung, im zweiten Fall steht für die Berechnung der Anzahl der Basenpaare der DNS-Banden ein Einlesegerät mit spezieller Software zur Verfügung. Beide Systeme sind zwar überaus benutzerfreundlich, eine Möglichkeit, die Spezifität der DNS-Banden zu überprüfen, fehlt jedoch. Diesem Mangel kann man durch den Einsatz von Restriktionsenzymen begegnen. "Positive" PCR-Proben werden mit dem Restriktionsenzym ALU I versetzt; dieses schneidet das amplifizierte, 194 bp lange DNS-Stück zwischen der 88sten und 89sten Base, wodurch die Sequenz in ein Stück mit 88 bp Länge und in ein Stück mit 106 bp Länge geteilt wird, die man mit den oben genannten Methoden nachweist.

Auf diese Weise untersuchten wir die PCR-Produkte von 53 Proben; es handelte sich dabei im einzelnen um 34 induzierte Sputa, 14 Bronchiallavage-Materialien, 3 Lymphknoten-Proben und 2 Proben von biotischem Hirnmaterial. In 80% der Fälle wurden die PCR-Produkte tatsächlich an der oben genannten Stelle geschnitten. Bei den restlichen Proben hingegen wurde offensichtlich nicht nach der 88sten, sondern nach der 78sten Base geschnitten. Derzeit läßt sich noch nicht entscheiden, ob diese Befunde durch eine primär falsch-positive PCR oder auf Grund einer Variation der Basensequenz innerhalb des Gens erklärt werden können.