

1	INLEITUNG	7
1.1	ENTWICKLUNG DER BLUTSPENDERUNTERSUCHUNG AUF TRANSFUSIONSRELEVANTE VIRALE KRANKHEITSERREGER	7
1.1.1	KLINISCHE UNTERSUCHUNG	7
1.1.2	SEROLOGIE	7
1.1.3	ÜBERTRAGUNGEN TROTZ SEROLOGISCHER TESTS	8
1.1.4	VERNINGERUNG DES RESIDUALEN RISIKOS DURCH DIREKTNACHWEIS VON VIREN	11
1.2	NUKLEINSÄUREAMPLIFIKATIONSTECHNIKEN (NAT)	14
1.2.1	DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION	14
1.2.2	5'-NUKLEASE PCR (TAQMAN PCR)	15
1.2.3	TMA	20
1.3	AUFGABENSTELLUNG	22
2	MATERIAL	23
2.1	REAGENZIEEN	23
2.2	GERÄTE	25
2.3	EDV-SOFTWARE	26
2.4	VERÖFFENTLICHTE NUKLEINSÄURESEQUENZEN	27
2.4.1	HBV-GENOMSEQUENZEN VON KLONierten EINZELISOLATEN	27
2.4.2	KONSENSUSSEQUENZEN FÜR HIV-1 SUBTYPEN	27
2.5	REFERENZPLASMA	28
2.5.1	HBV	28
2.5.2	HIV-1	28
2.5.3	SEROKONVERSIONSPROBENREIHEN	28
2.6	OLIGONUKLEOTIDE ZUR ETABLIERUNG UND DURCHFÜHRUNG DER HBV PCR	30
2.7	OLIGONUKLEOTIDE ZUR ETABLIERUNG UND DURCHFÜHRUNG DER HIV-1 RT-PCR	31
3	METHODEN	32
3.1	NUKLEINSÄUREPRÄPARATION	32
3.1.1	STANDARDVERFAHREN ZUR EXTRAKTION VON HIV-1 UND HBV AUS EINZELSPENDERPLASMA	32
3.1.2	MODIFIZIERTES VERFAHREN ZUR SENSITIVEREN EXTRAKTION VON HBV AUS EINZELSPENDERPLASMA	32
3.1.3	VERFAHREN ZUR EXTRAKTION VON HIV-1 UND HBV AUS VIRUSANGEREICHERTEM POOLPLASMA	33
3.2	GRUNDLEGENDES PCR-PROTOKOLL ZUR GENERIERUNG VON AMPLIFIKATEN AUS PLASMA ODER NUKLEINSÄURELÖSUNGEN	34
3.3	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON PCR-PRODUKTEN	34
3.4	ELUTION VON PCR-PRODUKTEN AUS AGAROSEGEL	35
3.5	PHOTOMETRISCHE DNA-QUANTIFIZIERUNG	35
3.6	PHOTOMETRISCHE RNA-QUANTIFIZIERUNG	36
3.7	KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN	37
3.7.1	LIGATION VON PCR-PRODUKTEN IN VEKTOREN	37
3.7.2	TRANSFORMATION	37
3.7.3	VORKULTUR	37
3.7.4	SELEKTION	38
3.7.5	HAUPTKULTUR	38
3.7.6	PLASMID-PRÄPARATION	38
3.8	DNA-SEQUENZIERUNG	39
3.8.1	SCHEMA ZUM ANSETZEN DER SEQUENZIERREAKTION	39
3.8.2	PROGRAMMIERUNG DES THERMOCYCLERS ZUR CYCLE-SEQUENZIERUNG	40

3.8.3	ETHANOLPRÄZIPITATION	40
3.8.4	SEQUENZANALYSE	40
3.9	HERSTELLUNG VON DNA-ABGEREICHERTEN RNA TRANSKRIPTEN.....	41
3.9.1	<i>IN-VITRO</i> TRANSKRIPTION	41
3.9.2	ERSTER DNASE VERDAU	41
3.9.3	REINIGUNG DER TRANSKRIPTE ÜBER OLIGO DT-ZELLULOSE SÄULEN	41
3.9.4	ZWEITER DNASE-VERDAU	42
3.9.5	ZWEITE AUFREINIGUNG ÜBER OLIGO DT-ZELLULOSE SÄULEN	42
3.10	DENATURIERENDE FORMAMID/AGAROSE-GELELEKTROPHORESE FÜR RNA	42
3.11	DURCHFÜHRUNG UND AUSWERTUNG DER 5'-NUKLEASE-PCR	43
3.11.1	VERRECHNUNG DER MEEDATEN IM ECHTZEIT- (<i>REAL-TIME</i>) MODUS	43
3.11.2	VERRECHNUNG DER MEEDATEN IM PLATTENLESE- (<i>PLATE READ</i>) MODUS	43
3.12	5'-NUKLEASE HBV PCR.....	44
3.13	5'-NUKLEASE HIV-1 RT-PCR	45
3.13.1	2-STEP RT-PCR OHNE INTERNE KONTROLLE	45
3.13.2	1-STEP RT-PCR MIT INTERNER KONTROLLE FÜR DIE ROUTINETESTUNG	46
4	<u>ERGEBNISSE.....</u>	47
4.1	VORGEHENSWEISE ZUR AUSWAHL VON OLIGONUKLEOTIDEN.....	47
4.1.1	SEQUENZAUFBEREITUNG	47
4.1.2	AUSWAHL VON OLIGONUKLEOTIDEN MIT DEM PROGRAMM "PRIMER EXPRESS"	48
4.1.3	ÜBERPRÜFUNG DER GEWÄHLTEN OLIGONUKLEOTIDE AUF SEQUENZHOMOLOGIEN MIT BEKANNTEN SEQUENZEN	51
4.1.4	AUSGLEICH VARIABLER POSITIONEN	51
4.2	AUFBAU VON 5'-NUCLEASE PCR-REAKTIONEN ZUM NACHWEIS VON HBV UND HIV-1.....	52
4.2.1	HBV-PCR	52
4.2.2	OPTIMIERUNG VON REAKTIONSPARAMETERN	54
4.2.3	HIV-1 RT-PCR	56
4.3	INTERNE KONTROLLEN	68
4.3.1	ERMITTLUNG VON ALTERNATIVEN SONDENBINDUNGSSTELLEN FÜR DIE INHIBITIONSKONTROLLSEQUENZ UND AUSWAHL VON HIERFÜR GEEIGNETEN DETEKTIONSSONDEN	69
4.3.2	ERMITTLUNG VON GEEIGNETEN DETEKTIONSSONDEN FÜR DIE ALTERNATIVE SONDENBINDUNGSSTELLE MIT DEM PROGRAMM "PRIMER EXPRESS"	70
4.3.3	ENZYMATISCHE SYNTHESE DER INTERNEN KONTROLLSEQUENZEN	71
4.3.4	KLONIERUNG DER KONSTRUKTSEQUENZ	74
4.3.5	IN-VITRO TRANSKRIPTION DES PLASMIDS PHIVSTD1.11. FÜR DIE HIV-1 PCR	75
4.4	ETABLIERUNG DER BLUTSPENDER-SCREENING PCR MIT INTERNER KONTROLLE FÜR HBV	77
4.4.1	INTERNE KONTROLLREAKTION FÜR DIE HBV PCR	77
4.4.2	VALIDIERUNG DER HBV PCR FÜR DIE ROUTINETESTUNG VON BLUTSPENDERN	80
4.5	ETABLIERUNG DER BLUTSPENDER-SCREENING PCR MIT INTERNER KONTROLLE FÜR HIV-1.....	87
4.5.1	INTERNE KONTROLLREAKTION FÜR DIE HIV-1 RT-PCR BASIEREND AUF EINEM IN-VITRO TRANSKRIPT VON PHIVSTD1.11	87
4.5.2	INTERNE KONTROLLREAKTION FÜR DIE HIV-1 RT-PCR BASIEREND AUF ARMORED RNA TM	88
4.5.3	VALIDIERUNG DER HIV-1 1-STEP RT-PCR MIT ARMORED RNA TM INTERNER KONTROLLE FÜR DIE ROUTINETESTUNG VON BLUTSPENDERN	90
5	<u>DISKUSSION.....</u>	95
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	103
7	<u>SUMMARY.....</u>	104

6

8 LEBENS LAUF..... 105

9 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG..... 106

10 LITERATUR..... 107

11 DANKSAGUNG..... 117

12 ANHÄNGE..... 118