

# Nachweis von Herpes simplex Virus DNA durch die Hybridisierung mit einer durch die Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) amplifizierten nichtradioaktiven Sonde

Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA by Hybridization with an Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplified Nonradioactive Herpes Simplex Probe

T. Ansorge<sup>1</sup>, T. Fenner<sup>2</sup>, Ute Förster<sup>1</sup>, Hertha-Lore Borkhardt<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Akademie Magdeburg

<sup>2</sup> Abteilung für Virologie, Bernhard Nocht Institut, Hamburg

## Zusammenfassung:

*In menschlichen Hautabstrichen konnte durch die PCR HSV-DNA nachgewiesen werden. Das untersuchte Material stammt von Hautläsionen eines Patienten mit diagnostiziertem Ewing-Sarkom. Um den Nachweis der amplifizierten DNA zu verbessern, wurde nach der PCR eine Hybridisierung mit einer spezifischen HSV-DNA-Sonde durchgeführt. Die Herstellung der HSV-Sonde erfolgte durch die PCR unter Verwendung digoxigenierter Nukleotide.*

## Schlüsselwörter:

*Herpes simplex Virus – Polymerase Ketten-Reaktion – Digoxigeninmarkierte Sonde*

## Summary:

*By using the polymerase chain reaction (PCR) an assay for HSV-DNA detection in human skin lesions was established. The material was extracted from skin lesions of a patient with Ewing sarcoma. To optimize the detection of the amplified DNA a hybridization was carried out with a specific HSV-DNA probe labeled by the PCR with a nonradioactive digoxigenin-deoxyuridinetriphosphate (dUTP).*

## Keywords:

*Herpes simplex virus – polymerase chain reaction – digoxigenin labeled probe*

## Einleitung

Weltweit muß mit einer hohen Durchseuchungsrate Jugendlicher und Erwachsener mit Herpes simplex-Viren der Typen 1 und 2 gerechnet werden. Immunmodulierende endogene und exogene Faktoren (Patienten mit Krebs und/oder zytostatischer Therapie, AIDS, Neugeborene) können zu akuten Exazerbationen führen. Diese treten entweder lokal begrenzt oder systemisch auf. Ihr Schweregrad ist dem Maß der Immundefizienz meist entsprechend. Um verfügbare therapeutische Möglichkeiten voll auszuschöpfen, ist eine schnelle und sichere Diagnose notwendig.

Diese Arbeit beschreibt eine Methode für den empfindlichen Nachweis der HSV-DNA in Hautläsionen durch die Hybridisierung amplifizierter HSV-DNA mit einer Digoxigenin-markierten Sonde. Die Amplifizierung der HSV-DNA und die Herstellung der spezifischen HSV-DNA-Sonde erfolgt durch die PCR.

## Material und Methoden

### DNA-Extraktion aus Zellkulturen

Die Extraktion der HSV<sub>1</sub>-DNA erfolgte aus einer HSV<sub>1</sub>-infizierten FL-Zellkultur (1), von der die infektiösen Einheiten

(IU) pro ml vorher bestimmt wurden. Nach einer Wäsche mit TE8 (Tris 10 mmol, EDTA 1 mmol, pH8) wurden die Zellen durch die Zugabe von 1 ml Lysispuffer (1% SDS, Proteinase K 100 µg/ml) und Inkubation über 30 min bei 37°C und 30 min bei 56°C lysiert. Nach einer Phenol/Chloroformextraktion erfolgte die Präzipitation der DNA bei -20°C in 2 Volumen Ethanol (2).

### DNA-Extraktion aus epidermalen Abstrichen

Die HSV-DNA-Gewinnung aus Oralschleimhautabstrichen von 3 Patienten ohne und eines Patienten mit herpetiformen Läsionen erfolgte nach der schon beschriebenen Methode. Die präzipitierte DNA wurde in 20 µl TE8 gelöst.

### DNA-Amplifikation

Für die PCR wurde ein Primerpaar genutzt, mit dem 92 bp große Segmente amplifiziert werden. Das amplifizierte HSV-DNA-Segment ist sowohl für HSV<sub>1</sub> als auch HSV<sub>2</sub> spezifisch und entspricht einem Teil des HSV-DNA-Polymerasegens. Die genutzten Primer weisen folgende Sequenzen auf (3):

Primer I: CAT CAC CGA CCC GGA GAG GGA C,  
Primer II: GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A.

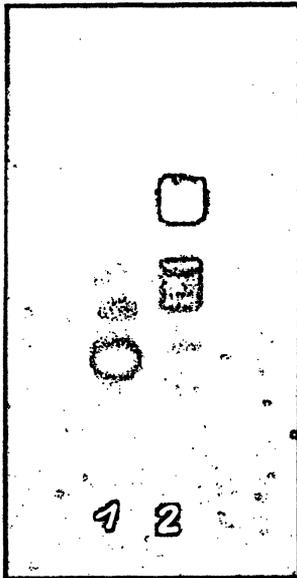


Abb. 1: Ethidiumbromidfärbung der digoxigenierten HSV-Sonde nach Agarosegelelektrophorese in einem 4%igen Gel (3% Nu Sieve Agarose, 1% Agarose standard), (1) HSV-Sonde, (2) Marker V Boehringer, Mannheim.

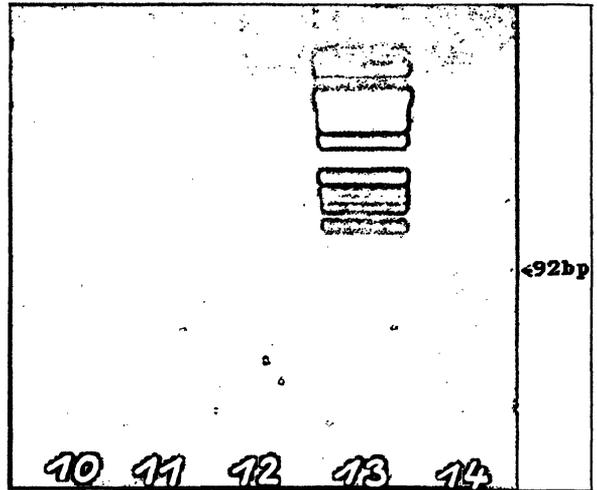


Abb. 2a: Ethidiumbromidfärbung der amplifizierten DNA nach Agarosegelelektrophorese in einem 4%igen Gel (3% Nu Sieve Agarose, 1% Agarose standard), (1) Marker V (Boehringer, Mannheim), (2) amplifizierte DNA des Patienten, (3) Negativkontrolle I, 20 000 IU aus HSV<sub>1</sub>-infizierten FL-Zellkulturen (4), 2000 IU (5), 10 000 IU (6), 1000 IU (7) und 100 IU (8), (9) Negativkontrolle II, (10, 11, 12) Kontrollgruppe (13) 1 kb-ladder Gibco, (14) Positivkontrolle (10 000 IU). Bei 10, 11, 12 und 14 sind zusätzlich die Primerpaare erkennbar.

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 10 µl Taq-Puffer (10\* konz.)
- 50 µM je Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP)
- 100 ng Primer I
- 100 ng Primer II
- 5 µl Herpes simplex DNA (5 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng, 1000 ng), oder 10 µl Patienten-DNA
- ad 100 µl Aqua dest
- + 1 µl Taq-Polymerase (2 U)

Insgesamt erfolgten 40 Zyklen über 90 sek bei 94°C, 90 sek bei 50°C und 90 sek bei 65°C. Nach Amplifikation wurde die Agarosegelelektrophorese (3% Nu Sieve, 1% Agarose standard) durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham International PLC, Amersham, UK) durch die Southern Blot Technik transferriert. Dazu wurde das Gel über 20 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) inkubiert und der DNA-Transfer auf die Nylonmembran in einem Vacublot-Apparat (Schleicher & Schüll) bei 0,9 bar Vakuum mit Transferpuffer (0,25 M NaOH, 1,5 M NaCl) über 1 Stunde durchgeführt. Die Nylonmembran wurde für 30 sek auf eine mit 20 x SSC (1 x SSC entspricht 0,15 M NaCl, 0,015 M Triso-

dium Citrat, pH 7,4) durchtränkte 3 mm Filterpapierscheibe gelegt, luftgetrocknet und bei 80°C gebacken.

#### Präparation der HSV-DNA-Sonde

Der Einbau der Nukleotide in die Sonde nach der beschriebenen PCR-Vorschrift erfolgte unter Nutzung der HSV<sub>1</sub>-DNA aus einer infizierten FL-Zell-Kultur. Zur Herstellung der HSV-Sonde wurden 3 µl dNTP labeling mix (Desoxyadenosintriphosphat 1 mM, Desoxyguanosintriphosphat 1 mM, Desoxythymidintriphosphat 0,65 mM, Desoxycytidintriphosphat 1 mM, Digoxigenin-dUTP 0,35 mM) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen konnten ungefähr 100 ng/5 µl digoxigenierte HSV-DNA-Sonde nach der elektrophoretischen Separation im 4%igen Agarosegel geschätzt werden (Abb. 1). Die Hybridisierung wurde nach den Anweisungen des Herstellers (Nonradioactive DNA Detection Kit, Boehringer Mannheim) bei 68°C mit 100 ng Sonde in 10 ml Lösung durchgeführt. Nach der anschließenden Reaktion von Digoxigenin mit einem alkalischen Phosphatase-gekoppelten Antidigoxigenin Antikörper konnte der Nachweis durch die Farbreaktion mit Nitroblau-Tetrazolium und X-Phosphat über 10 min geführt werden.



Abb. 2b: Southern Blot des Agarosegels und Nachweis der Hybridisierung durch den polyclonalen Anti-Digoxigenin-Antikörper. (1) Marker V (Boehringer, Mannheim), (2) amplifizierte Patienten-DNA, (3) Negativkontrolle I, 20 000 IU aus HSV<sub>1</sub>-infizierten FL-Zellkulturen (4), 2000 IU (5), 10 000 IU (6), 1000 IU (7) und 100 IU (8), (9) Negativkontrolle II, (10, 11, 12) Kontrollgruppe, (13) kb-ladder (Gibco), (14) Positivkontrolle (10 000 IU).



ten FL-Zellkulturen (4), 2000 IU (5), 10 000 IU (6), 1000 IU (7) und 100 IU (8), (9) Negativkontrolle II, (10, 11, 12) Kontrollgruppe, (13) kb-ladder (Gibco), (14) Positivkontrolle (10 000 IU).

Mit dieser Sonde war durch DNA-Hybridisierungsversuche mit allen Herpesviren (Herpes simplex Virus 1 und 2, Epstein-Barr-Virus, Varizella-Zoster-Virus, Cytomegalievirus) nur ein Nachweis der DNA von Herpes simplex-Virus 1 und 2 möglich.

## Ergebnisse

5 ng (100 IU), 50 ng (1000 IU), 100 ng (2000 IU), 500 ng (10 000 IU) und 1000 ng (20 000 IU) DNA von HSV<sub>1</sub>-infizierten FL-Zellkulturen wurden zur Amplifizierung des spezifischen Segments durch die PCR eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten der Puffer mit den beiden Primern (Negativkontrolle I) und DNA von embryonalen Zellen mit Puffer und dem Primerpaar (Negativkontrolle II).

Das amplifizierte DNA-Segment aus der HSV<sub>1</sub>-infizierten Zellkultur zeigte das erwartete Molekulargewicht von 92 bp nach elektrophoretischer Auftrennung im 4%igen Agarosegel. Nach der Ethidiumbromidfärbung konnte die DNA nur dann dargestellt werden, wenn mehr als 100 IU aus einer HSV<sub>1</sub>-infizierten Zellkultur im PCR-Ansatz verwendet wurden. Eine Sichtbarmachung spezifischer, mit Ethidiumbromid-gefärbter Banden war nicht möglich, wenn im Versuchsansatz die Negativkontrollen eingesetzt wurden (Abb. 2a). Nach der Hybridisierung mit der digoxigenierten HSV-Sonde konnten zusätzlich 100 IU aus der HSV<sub>1</sub>-infizierten FL-Zellkultur nachgewiesen werden (Abb. 2b).

Die höhere Sensitivität ist ein Ergebnis der immunologischen Verstärkerreaktion zwischen Digoxigenin-markierter Sonde und Phosphatase-markiertem Antidigoxigenin-Antikörper. Diese Ergebnisse zeigen, daß die PCR eine sehr empfindliche und spezifische Diagnostik des HSV ermöglicht. Die Sensitivität kann durch die Hybridisierung mit einer HSV-DNA-Sonde, die durch die PCR unter Nutzung digoxigenerter Nukleotide hergestellt wurde, gesteigert werden.

Mit dem beschriebenen Testsystem wurden unter Nutzung der PCR je 0,3 µg DNA, gewonnen aus Oralschleimhautabstrichen eines Patienten mit und von 3 Patienten ohne herpetiforme Läsionen (Kontrollgruppe), untersucht. Der Patient mit den herpetiformen Läsionen wurde aufgrund eines diagnostizierten Ewing-Sarkoms zytostatisch behandelt. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe konnte bei diesem Patienten nach elektrophoretischer Auftrennung und anschließender Ethidiumbromidfärbung die 92 bp Bande dargestellt werden. Nach Southerntransfer und Hybridisierung mit der digoxigenierten Sonde war eine Bestätigung der Spezifität der 92 bp Bande ebenso möglich. Die Ergebnisse zeigen, daß mit dem hier vorgestellten Testsystem auch aus geringen Mengen an Patientenmaterial (Abstrich) HSV-DNA direkt isoliert und amplifiziert werden kann und dadurch eine schnelle HSV-Diagnostik möglich wird.

## Diskussion

Die PCR ermöglicht einen schnellen Nachweis von Herpes-simplex-Viren. Neben den Vorteilen, die auch der HSV-Antigennachweis bei der Interpretation des Ergebnisses gegenüber Methoden des Antikörpernachweises zeigt, erlaubt die PCR eine Steigerung der Spezifität und Empfindlichkeit (4).

Durch die Hybridisierung der amplifizierten DNA mit einer digoxigenierten Sonde, hergestellt aus einer HSV<sub>1</sub>-infizierten Zellkultur unter Nutzung der PCR, wird eine Kontrolle der amplifizierten Sequenz und über den phosphatasegekoppelten Antikörper eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 10 gegenüber der Ethidiumbromidfärbung im Agarosegel erreicht.

Im Gegensatz zur Nick-Translation oder dem Random-Priming weisen die über die PCR hergestellten Sonden keine überlappenden Sequenzen auf und sind deshalb sehr spezifisch für die HSV-DNA (5).

Bei einem Patienten, der zytostatisch behandelt wurde, konnte durch dieses empfindliche und spezifische Nachweissystem ein akuter Herpes labialis diagnostiziert werden. Eine schnelle Diagnostik ermöglicht bei diesen Problemfällen eine frühzeitige lokale Therapie mit dem Ziel der Vermeidung einer generalisierten HSV-Infektion und eines eventuell daraus resultierenden Abbruchs der zytostatischen Therapie.

### Schrifttum:

1. Herrmann, H., Brunnemann, H., Schmidt, J., Urbach, M. (1975) Fluoreszenz-Antikörpertechnik, ihre Anwendung zum Nachweis von Viren des Atemtraktes. Beilage der Zeitschrift für medizinische Labortechnik, 16. Heft 5.
2. Colin, P., Corbitt, G., Morris, D. J. (1988) Detection of CMV by dot blot DNA hybridization using probes labeled with p<sup>32</sup> by nick translation or random hexanucleotide priming. Molecular and cellular probes 2, 181.
3. Cao, M., Xiao, X., Egbert, B., Darragh, T. M., Yen, T. S. B. (1989) Rapid detection of cutaneous herpes simplex virus infection with the polymerase chain reaction. J. of invest. Dermatology 82, 391.
4. Saito, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487.
5. Lanzillo, J. J. (1990) Preparation of digoxigenin-labeled probes by the Polymerase chain reaction. Bio Techniques 8, 621.

### Anschriften der Verfasser:

Dr. med. Thomas Ansorge  
Prof. Dr. sc. med. Hertha-Lore Borkhardt  
Dr. med. Ute Förster  
Medizinische Akademie Magdeburg  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Leipziger Straße 44  
O-3090 Magdeburg

Dr. med. Thomas Fenner  
Bernhardt Nocht Institut  
Abteilung für Virologie  
Bernhardt-Nocht-Straße 74  
W-2000 Hamburg 36

□