

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

3.1.1 Referenz- und Kontrollstämme

Zur Evaluierung verschiedener phäno- und genotypischer Methoden zur Bestimmung von *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Virulenzfaktoren und von Spezies-spezifischen Genen wurden die in Tab. 6 aufgeführten Referenz- und Wildtypstämme in den PCR-Untersuchungen als Kontrollen (fettgedruckte Gene) sowie für die Herstellung von Oligonukleotid-Sonden (unterstrichene Gene) verwendet.

Tab. 6: Liste der zur Evaluierung der Nachweissysteme verwendeten Referenz- und Kontrollstämme sowie deren wichtigste Genloci

Stamm	Virulenzassoziierte Gene
[P]. haemolytica-Stämme (Serotyp)	
DSM 5283 (1A)	<i>lktA</i> , <i>trBA</i> , <i>tonB</i> , <i>irp</i> , <i>pomA</i> , <i>gcp</i> , <i>sodA</i>
IMT* 3018 (2A)	<i>lktA</i> , <i>trBA</i> , <i>tonB</i> , <i>irp</i> , <i>pomA</i> , <i>gcp</i> , <i>sodA</i> , <i>sodC</i>
P. multocida ssp. multocida-Stämme (Kapsel-/Serotyp)	
AF (A)	<i>capA</i> , <i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>oma87</i> , <i>tbpA</i> , <i>toxA</i> , <i>tonB</i> , <i>nanB</i> , <i>nanH</i> , <i>hgbA</i> , <i>hgbB</i>
X73 (A:1)	<i>capA</i> , <i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>oma87</i> , <i>sodA</i> , <i>sodC</i> , <i>tonB</i> , <i>nanB</i> , <i>hgbA</i> , <i>hgbB</i>
P2100 (-:10)	<i>capA</i> , <i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>oma87</i> , <i>tonB</i> , <i>nanB</i> , <i>nanH</i> , <i>hgbA</i> , <i>hgbB</i>
P 1591 (- :13)	<i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>oma87</i> , <i>sodA</i> , <i>tonB</i> , <i>nanH</i> , <i>hgbA</i> , <i>hgbB</i>
NCTC 10322 (A)	<i>capA</i> , <i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>oma87</i> , <i>sodA</i> , <i>sodC</i> , <i>tonB</i> , <i>nanB</i> , <i>nanH</i> , <i>pfha</i> , <i>hgbA</i>
NCTC 10323 (B)	<i>capB</i> , <i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>oma87</i> , <i>sodA</i> , <i>sodC</i> , <i>tbpA</i> , <i>tonB</i> , <i>nanB</i> , <i>nanH</i> , <i>pfha</i> , <i>hgbA</i> , <i>hgbB</i>
ATCC 12948 (D)	<i>capD</i> , <i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>toxA</i> , <i>tonB</i> , <i>nanB</i> , <i>nanH</i> , <i>pfha</i> , <i>hgbA</i> , <i>hgbB</i>
NCTC 10326 (E)	<i>capE</i> , <i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>oma87</i> , <i>tonB</i> , <i>nanB</i> , <i>nanH</i> , <i>pfha</i> , <i>hgbA</i> , <i>hgbB</i>
P4679 (F)	<i>capF</i> , <i>psl</i> , <i>kmt</i> , <i>ompH</i> , <i>ptfA</i> , <i>oma87</i> , <i>tonB</i> , <i>nanB</i> , <i>nanH</i> , <i>hgbA</i> , <i>hgbB</i>
Sonstige Kontrollstämme	
RW 1374 (<i>E. coli</i>)	TypIII-Sekretionsgene (<i>escv-n</i>)
DSM 4296 (<i>H. influenzae</i>)	<i>igase</i> (<i>Haemophilus influenzae</i> Immunglobulin-Protease-Gen)
IMT 859 (<i>H. influenzae</i>)	<i>hia</i> (<i>Haemophilus influenzae</i> adhesin)

* IMT: Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin

Nähere Angaben zu den Referenz- und Kontrollstämmen, deren Herkunft und Bezugsquellen, sind im Verzeichnis der Stämme im Anhang aufgeführt. Dort sind zudem die weiteren in dieser Arbeit untersuchten *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Referenzstämmen aufgelistet, die genau wie die Wildtypisolate als Untersuchungsstämmen zur Beurteilung des Vorkommens und der Verbreitung virulenzassoziierter Faktoren bei diesen Gattungen dienen.

Als Negativkontrollen für die DNS-DNS-Hybridisierung dienten die in Tab. 7 aufgeführten Bakterienisolate.

Tab. 7: Liste der in der DNS-DNS-Hybridisierung als Negativkontrollen verwendeten Bakterienstämmen

Stamm	Spezies *	Wirt/Herkunft	Bezugsquelle/Referenz
IMT 1311	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Schwein	Prof. Gerlach, Hannover
IMT 2213	<i>Actinobacillus salpingitidis</i> (<i>Gallibacterium gen. nov.</i>)	Huhn, Philippinen	IMT Diagnostik, Berlin
IMT 4715	<i>Actinobacillus suis</i>	Schwein, Berlin	IMT Diagnostik, Berlin
ATCC 33391	<i>Haemophilus influenzae</i>	NCTC 8143	[215]
IMT 5006	<i>Haemophilus somnus</i> (<i>Histophilus somni</i>)	Rind	Prof. Gerlach, Hannover
RW1374	<i>Escherichia coli</i>	Kalb, Hessen	Prof. Baljer, Giessen

* in Klammern werden die Speziesbezeichnungen entsprechend der aktuellen Nomenklatur genannt (Euzéby: List of bacterial names with standing in nomenclature; Society for Systematic and Veterinary Bacteriology (URL: <http://www.bacterio.cict.fr/>))

3.1.2 Empfängerstämmen für Transformationsversuche

Die Klonierungsarbeiten wurden mit den *E. coli*-Stämmen DH5 α [®] (Clontech, Heidelberg), XL-1 Blue (Stratagene, Heidelberg) und TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

3.1.3 *Pasteurella*-Wildtypstämme

In die Untersuchungen wurden 272 *Pasteurella* spp. und ssp. sowie 89 als [*P.*] *haemolytica* bezeichnete Wildtypisolate einbezogen. Es handelte sich dabei um Stämme unterschiedlicher tierartlicher und regionaler Herkunft, die im Zeitraum von 1982-2003 vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen (IMT) der Freien Universität Berlin isoliert und asserviert wurden. Da eine Vielzahl der Isolate (85) lediglich als *Pasteurella*-Spezies bezeichnet worden war, wurden sie zunächst, wie in Kap. 3.3 angegeben, biotypisiert. Die Isolate stammen vorwiegend aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands, eine geringere Anzahl wurde in Syrien und Äthiopien isoliert. Der größte Teil der Wildtypstämme wurde aus pathologischen Prozessen isoliert, gefolgt von zur Statuskontrolle untersuchten Nasentupfern klinisch gesunder Rinder, Kälber und Schweine und Isolaten aus nicht mitgeteilten Infektionslokalisationen. Detaillierte Informationen zu Herkunft und Isolierungslokalisation der im Kap. 4.3 als *P. multocida* ssp. biotypisierten Wildtypstämme geben die Tab. 49 und 50 im Stammverzeichnis des Anhangs.

3.2 Anzucht und Stammhaltung der verwendeten Bakterienstämme

Die Anzucht der *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Isolate erfolgte auf TSYE (tryptic soy yeast extract)-Agar mit Zusatz von 5 % defibriniertem Schafblut bei 37°C unter aeroben Bedingungen. Zur Asservation des Stamm-Materials wurde jeweils eine Kolonie der über Nacht (ü. N.) inkubierten Agar-Platten in einem Reagenzröhrchen mit 5 ml TSYE-Bouillon angeimpft und bei 37°C ü. N. im Schüttelinkubator kultiviert. 1,3 ml dieser Bakterienkultur wurden mit 0,5 ml Glycerin (Rotipuran® Glycerol, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) vermischt und in einem 2 ml Cryo-Röhrchen (Cryovial®, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung des Hämolysevermögens der *Mannheimia*-Isolate wurden diese auf Rinder-Waschblutagar angeimpft und bei 37°C unter aeroben Bedingungen ü. N. inkubiert. Das Hämolyseverhalten wurde nach 18 und 48 Stunden beurteilt.

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten. Zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen mit rekombinanten Plasmiden wurde das Medium je nach propagiertem Plasmid mit verschiedenen Antibiotika-Lösungen supplementiert (s. Kap. 3.4.4.1).

3.3 Zuordnung der Isolate zur Gattung *Pasteurella* bzw. *Mannheimia*

Sofern es sich nicht um die von anderen Institutionen oder Studien zur Verfügung gestellte, bereits biotypisierte Isolate handelte, wurden die in die Untersuchung einbezogenen *Pasteurella*-Wildtypisolate nach den in Tab. 8 dargestellten Kriterien biochemisch untersucht und klassifiziert. Die Testverfahren wurden entsprechend der im Manual of Clinical Microbiology [223] angegebenen Standardprotokollen durchgeführt.

Tab. 8: Biochemische Eigenschaften von *Pasteurella*- und *Mannheimia* species

	<i>P. multocida</i> <i>ssp. multocida</i> , <i>ssp. septica</i> <i>ssp. gallicida</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. glucosida</i>	<i>M. varigena</i>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M. ruminalis</i>	<i>P. trehalosi</i>	<i>P. sensu stricto</i> , <i>P. species</i>
Katalase	+							
Cytochromoxidase	+							
Harnstoffspaltung								v
Indolbildung	+	-						v
Beweglichkeit	-							
Zellmorphologie	kleine kokkoide, Gram-negative Stäbchen							
Koloniemorphologie	grauweiß, glatt bis schleimig M-, S-, R-Form	grauweiß, rund und glatt S-, R-Form						glatt bis schleimig
Hämolyse								
Rinderblut	-	+	+	v	-	-	+	-
Schafblut	-	+	+	v	+	-	+	-
MacConkey-Agar	kein Wachstum	Wachstum						v

v: variabel; +: positiv; -: negativ

Alle Indol-positiven und Hämolyse-negativen Stämme wurden anhand der in Tab. 9 aufgeführten Kriterien weiter differenziert, während Indol-negative, Hämolyse-positive Wildtypisolate, die aufgrund weiterer phänotypischer Merkmale als *M. haemolytica* identifiziert worden waren, zur weiteren Charakterisierung in Biogruppen und Biogruppen-Varianten nach Jaworski et al. (1998) [155] differenziert wurden (Tab. 10).

Tab. 9: Zuordnung von *Pasteurella*-Spezies aufgrund von Kohlenhydratfermentationsleistungen, Indolbildung und Ornithindecaboxylierung nach Mutters et al. (1989)

	Indol	Orni	Harn	Tre	Mal	Xyl	Ara	Man	Sor	Dul
<i>P. multocida</i>										
<i>ssp. multocida</i>	+	+	-	v	-	v	-	+	+	-
<i>ssp. septica</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>ssp. gallicida</i>	+	+	-	-	-	+	v	+	+	+
<i>P. anatis</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>P. avium</i>	-	-	-	+	-	v	-	-	-	-
<i>P. canis</i>	v	+	-	v	-	v	-	-	-	-
<i>P. dagmatis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. gallinarum</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. langaaensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. species B</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>P. stomatis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>P. volantium</i>	-	v	-	+	+		-	+	v	-

v: variabel; +: positiv; -: negativ; Orni(thin), Harn(stoff), Tre(halose), Mal(tose), Xyl(ose), Ara(binose), Man(nit), Sor(bit), Dul(cit)

Tab. 10: Klassifizierung von *Mannheimia haemolytica*-Isolaten in Biogruppen und Biogruppen-Varianten nach Jaworski et al. (1998) [155]

Biogruppe	Tre	Xyl	Ara	Sali	Sor	Cello	Mal	Orni	β-Glu	α-Fuc
1	-	+	-	-	((+))	-	(+)	-	-	((+))
2	+	-	-	+	(+)	(+)	(+)	-	+	-
3	-	+	-	+	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)
4	+	-	-	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-
5	-	+	+	((+))	(+)	((+))	(+)	+	(+)	(+)
6	-	(+)	+	-	-	-	(+)	+	-	(+)
7	-	(+)	+	-	-	-	(+)	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)
9	-	+	+	-	+	-	(+)	+	(+)	(+)
10	-	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)
11	-	+	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)
16	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	(+)
UT27	-	+	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-

Tre(halose), Xyl(ose), Ara(binose), Sali(cin), Sor(bit), Cello(biose), Mal(tose), Orni(thin), β-Glu(cosidase), α-Fuc(osidase)

+: positiv; (+): negatives Ergebnis möglich; ((+)): bei **einer** negativen Reaktion in Doppelklammern Benennung einer neuen Variante der originalen Biogruppe angezeigt; bei **zwei** negativen Reaktionen in Doppelklammern Benennung einer neuen Variante nicht akzeptabel; -: negativ

3.4 Molekulargenetische Methoden

3.4.1 Gewinnung und Konzentrationsbestimmung von genomischer DNS

3.4.1.1 Hitze-Lyse

Diese Methode ermöglicht es, auf einfache und schnelle Weise genomische DNS aus Bakterien zu gewinnen und in der PCR oder DNS-DNS-Hybridisierung einzusetzen.

Nach der Anzucht der Isolate über Nacht bei 37°C auf TSYE-Agar wurde jeweils eine Öse Koloniematerial in 200 µl A. bidest in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß (Typ „safe-lock“, Eppendorf, Hamburg) suspendiert. Es folgte eine Lagerung der Reaktionsgefäße bei -20°C für 10 min. Anschließend wurde die Bakteriensuspension aufgetaut und 10 min zentrifugiert (Raumtemperatur (RT), 16.000 x g). Nach Dekantieren und Verwerfen des Überstandes erfolgte eine Resuspension der Pellets in 50 µl A. bidest. Die so präparierte Bakteriensuspension wurde 10 min im Thermocycler (Biometra, Göttingen) bei 95°C erhitzt, um anschließend abermals 10 min zentrifugiert zu werden (RT, 16.000 x g). Der Überstand wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

3.4.1.2 Aufarbeitung von chromosomaler und Plasmid-DNS mittels Kit

Für bestimmte Reaktionen, wie z.B. die Ligation, Restriktionsenzymanalyse oder die Herstellung von Oligonukleotid-Sonden, ist die Verwendung aufgereinigter chromosomaler DNS indiziert. Dies erfolgte mit dem Master Pure™ Genomic DNA Purification Kit (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) nach der Anleitung des Herstellers.

Plasmidaufarbeitungen (transformierte *ompH*-Konstrukte) wurden mit dem Plasmid Mini und Midi Kit (Quiagen, Hilden) ebenfalls nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.4.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Gelextraktion (QIAquick™ Gel-Extraction Kit, Qiagen Hilden)

Mit dieser Methode können DNS-Fragmente in einer Größe von 100 - 7000 bp aus dem Agarosegel (Standard- oder Low-melting point Agarose) eluiert werden. Nach Exzision des gewünschten, elektrophoretisch aufgetrennten DNS-Fragmentes mit einem Skalpell erfolgt mit einem speziellen Puffersystem zunächst der Verdau des die DNS enthaltenden

Gelblockes, anschließend die Bindung der DNS an eine Trägermatrix, diverse Waschschriffe und letztendlich die Ablösung der DNS von der Trägermatrix mittels eines weiteren Puffers. Die Eluierung der für die Sondenherstellung bzw. Ligationsansätze benötigten DNS-Fragmente erfolgte entsprechend des vom Hersteller empfohlenen Protokolls.

Aufreinigung der DNS

PCR-Produkte, die sequenzanalysiert werden sollten bzw. einem Restriktionsendonuklease-Verdau unterzogen wurden, wurden mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) laut Angabe des Herstellers aufgereinigt. Nach der Aufreinigung erfolgte eine Kontrolle des Amplifikates über ein Elektropherogramm und die Messung der DNS-Konzentration, wie in Kap. 3.4.1.4 beschrieben.

3.4.1.4 DNS-Konzentrationsbestimmung

Die DNS-Konzentration wurde fluorometrisch bestimmt. Die Methode bietet den Vorteil, dass ausschließlich DNS und keine RNS oder Proteinbestandteile gemessen werden und nur geringe Volumina zur Messung erforderlich sind.

Die Messlösung enthält den Farbstoff „Hoechst 33258“ (Life Technologies, Karlsruhe), der sich selektiv in die kleine Furche der DNS-Doppelhelix einlagert. Durch die Bindung des Farbstoffes an die DNS verändert sich dessen Emissionsspektrum. Nach Zugabe von DNS zur Messlösung und unter UV-Bestrahlung emittiert dieser Farbstoff Licht, dessen Intensität von einer Fotozelle gemessen und mittels einer Eichkurve in die Konzentration umgerechnet wird. Zur Erstellung der Eichkurve werden eine Standard-DNS mit bekannter Konzentration und ein Leerwert verwendet. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit dem Fluorometer DQ200-230V (Hofer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco DA, USA) entsprechend der vorgeschlagenen Arbeitsprotokolle.

3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.4.2.1 Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden von den Firmen MWG Biotech AG (Ebersberg), Tib-MolBiol (Berlin) und Eurogentec (Belgien) bezogen. Die als Lyophilisate gelieferten Primer wurden in ACILA (Pyroquant Diagnostik GmbH, Walldorf) gelöst (Konzentration der Stammlösung 100 pmol/μl) und bei - 20°C gelagert. Die DNS-Sequenzen der verwendeten Primer sind den Tab. 11 - 14 zu entnehmen.

3.4.2.2 Reaktionsansätze für Einzel-PCRen und Thermocyclerprogramme

Der Standard-Reaktionsansatz für alle Einzel-PCRen setzte sich wie folgt zusammen:

	2,50 μl	PCR-Puffer (10 x)
	1,25 μl	MgCl ₂ (50 mM)
	0,10 μl	dNTPs (10 mM each)
	0,50 μl	je Reaktionsprimer (10 pmol each)
	0,50 μl	<i>Taq</i> DNS-Polymerase (1 unit)
	<u>2,00 μl</u>	<u>Template-DNS (Hitzelyse) bzw. 2 ng aufgereinigte DNS</u>
ad	25,0 μl	A. bidest.

Als Template-DNS wurde je nach Weiterverwendung des PCR-Produktes aufgereinigte chromosomale DNS (DNS-Sonden, Restriktionsanalysen, Ligationsreaktion) oder mittels Hitzelyse isolierte DNS verwendet (s. Kap.3.4.1). PCR-Ansätze, deren Produkte für eine Ligationsreaktion oder eine Restriktion mit Endonukleasen bestimmt waren, hatten ein Endvolumen von 50 μl mit entsprechender Verdoppelung der Einzelreagenzien.

Einen Überblick über die Thermocyclerprogramme geben die Tab. 15 – 18. Vor Beginn des ersten Zyklus erfolgte bei jedem der angegebenen Programme jeweils eine Prädenaturierung bei 94°C über 3 min. Dem letzten Zyklus jedes Reaktionsansatzes war eine Endelongation bei 72°C über 10 min nachgeschaltet. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung im Thermocycler bei + 4°C gekühlt bzw. im Kühlschrank bei dieser Temperatur gelagert. Bei jeder PCR wurden Positiv- und Leerwertkontrollen mitgeführt.

3.4.2.3 Multiplex-PCR

Zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer virulenzassoziierter Gene in *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Spezies bzw. zur schnellen Differenzierung dieser beiden Gattungen voneinander wurden verschiedene Multiplex-PCRen etabliert. Eine Multiplex-PCR ermöglicht es, mit nur einem PCR-Ansatz zwei und mehr DNS-Fragmente gleichzeitig zu identifizieren. In einer ersten Multiplex-PCR zur Differenzierung von *Mannheimia*- und *Pasteurella multocida* ssp.-Isolaten wurden zum Nachweis der entsprechenden Gene die Primerpaare LktA, PomA, KMT, ToxA, CapA und CapD eingesetzt.

In einer zweiten Multiplex-PCR, die zur weiteren Charakterisierung von *Pasteurella multocida* ssp.-Isolaten dienen sollte, wurden zum Nachweis virulenzassoziierter Gene die Primerpaare Oma87, Pm TbPA, Pm NanH-1, Pm NanB-1, Fim4, HgbA, HgbB, MhPm ExbBs/ Pm TonB as, Pfha und CapF verwendet. Die entsprechenden Sequenzen, Lokalisationen und Referenzen sind in Tab. 11 und 12 aufgeführt.

Die Spezifität der Multiplex-PCRen wurde durch einen Vergleich der mittels Einzel-PCRen und DNS-DNS-Hybridisierung gewonnenen Daten zum Vorkommen der einzelnen virulenzassozierten Gene überprüft. Bei Genen, die auch bei anderen *Pasteurellaceae*-Spezies vorhanden sind bzw. bei solchen, die innerhalb von *P. multocida* ssp. und *M. haemolytica* eine hohe Variabilität aufweisen, wurde für jedes Gen mittels Lasergene Megalign (DNASTAR, Copyright© 2003) ein Abgleich aller in den internationalen Datenbanken hinterlegten DNS-Sequenzen durchgeführt und die Oligonukleotid-Primer in Bereichen ausgewählt, die spezifisch für *P. multocida* ssp. respektive *M. haemolytica* waren und innerhalb dieser Spezies hoch konserviert waren. Außerdem erfolgte eine sorgfältige Abstimmung der zu amplifizierenden Fragmentgrößen, einer Grundvoraussetzung für die Etablierung einer Multiplex-PCR.

Die Sensitivität der Multiplex-PCRen wurde durch den Einsatz definierter Konzentrationen an Template-DNS geprüft. Dazu wurde aufgereinigte DNS in einer Konzentration von 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 und 200 ng von Positiv-Kontrollstämmen herangezogen, die jeweils dem nachzuweisenden Genotyp entsprachen. Die Konzentration, bei der alle zu amplifizierenden Fragmentgrößen auf dem Agarosegel deutlich visualisierbar waren, wurden als Grenzwert für die Sensitivität der Multiplex-PCRen festgelegt.

Die Reaktionsansätze für die Multiplex-PCRen setzten sich folgendermaßen zusammen:

<u>Multiplex 1</u>	<u>Multiplex 2</u>	
2,5 µl	2,5 µl	10 x PCR-Puffer
2,0 µl	2,0 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl	0,6 µl	dNTPs (10 mM)
0,1 µl	0,1 µl	je Primer-Paar (100 pmol)
0,2 µl	0,3 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U)
2,5 µl	2,5 µl	Template DNS (Hitzelyse)
17,7 µl	17,0 µl	A. bidest.
25,0 µl	25,0 µl	

Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt:

		<u>Multiplex 1</u>	<u>Multiplex 2</u>
1	Prädenaturierung	94°, 4 min	94°C, 4 min
2	Denaturierung	94°C, 30 sec	94°C, 30 sec
3	Annealing	58°C, 45 sec	60°C, 45 sec
4	Extension	68°C, 210 sec	68°C, 4 min
Schritt 2-4: 25 Schleifen			
5	Endelongation	72°C, 10 min	72°C, 10 min

3.4.2.4 Horizontale Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der kontinuierlichen Auftrennung, Identifizierung und Aufreinigung von DNS-Fragmenten von 0,1-25 kb Länge. Der Nachweis genspezifischer PCR-Amplifikate erfolgte in 1%-igen Agarosegelen bei Einzel-PCRen und in 1,5 %-igen Agarosegelen bei Multiplex-PCRen. Dazu wurden 1,0 - 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TBE durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55°C und Zugabe von 0,5 µl einer Ethidiumbromidlösung (1 %-ig) zur Sichtbarmachung der DNS-Banden auf einem UV-Tisch wurde die flüssige Agarose in eine Gelkammer mit Probentaschenkämmen von 8 bis 24 Taschen, je nach zu bearbeitender Probenanzahl gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (1 x TBE) gelegt und die Kämme wurden entfernt. Die aufzutrennenden DNS-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen

Bromphenolblau (BPB) vermischt. Das BPB enthält Saccharose und erhöht die spezifische Dichte der Probe, so dass die eingefüllte DNS-Probe in der Geltasche verbleibt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes an die Gelkammer, wodurch die negativ geladenen DNS-Fragmente zur Anode wanderten. Die Laufbedingungen variierten je nach Gelgröße und Größe des zu erwartenden PCR-Amplikates: Spannung 80 – 100 V und Laufzeit 1 - 3 h. Anschließend wurden die einzelnen Amplifikate durch einen Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten.

Tab. 11: Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation virulenzassoziierter Gene bzw. deren flankierender Regionen in *Pasteurella multocida* ssp. und *Pasteurella*-Spezies

Angaben zu den Oligonukleotidprimern		Angaben zur Spezifität der PCR		
Name	Sequenz (5' - 3')	Lokalisation im Gen ³	Gen	Referenz / Acc.-Nr.
P6 s	TCTGGATCCATGAAAAAATACTAAAGTA	(-) 9- (+)21	<i>psl</i>	mod. nach [162] / M19391
P6 as	AAGGATCCTTAGTATGCTAACACAGGACGACG	8-430	<i>psl</i>	mod. nach [162] / M19391
KMT s	ATCCGTATTTACCCAGTGG	213-232	<i>kmt</i>	[311] / AF016259
KMT as	GCTGTAAACGAACTCGCCAC	669-649	<i>kmt</i>	[311] / AF016259
ToxA s*	CTTAGATGAGCGACAAGGTT	1878-1897	<i>toxA</i>	diese Arbeit / AF240778
ToxA as*	GGAATGCCACACCTCTATA	2743-2725	<i>toxA</i>	diese Arbeit / AF240778
ToxA2 s**	ATGAAAACAAAACATTTTTTTAACT	1-25	<i>toxA</i>	diese Arbeit / AF240778
ToxA2 as**	TTATAGTGCTCTTGTTAAGCGAGGC	3858-3833	<i>toxA</i>	diese Arbeit / AF240778
OmpH s	CGCGTATGAAGGTTTAGGT	351-369	<i>ompH</i>	diese Arbeit / U50907
OmpH as	TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	789-769	<i>ompH</i>	diese Arbeit / U50907
Oma87 s**	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC	1-24	<i>oma87</i>	diese Arbeit / U60439
Oma87 as**	TTAGAACGTCCCACCAATGCTG	2362-2341	<i>oma87</i>	diese Arbeit / U60439
Oma87-1 as*	TGACTTGCGCAGTTGCATAAC	949-928	<i>oma87</i>	diese Arbeit / U60439
Fim4 s	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC	995-1022	<i>ptfA</i>	[91] / AE006044
Fim4 as	TCATGAATTCTTATGCGCAAATCCTGCTGG	1483-1463	<i>ptfA</i>	[91] / AE006044
Pm TbPA s	TTGGTTGGAAACGGTAAAGC	969-989	<i>tbPA</i>	diese Arbeit / AY007725
Pm TbPA as	TAACGTGTACGGAAAAGCCC	1697-1677	<i>tbPA</i>	diese Arbeit / AY007725
leu-tRNA s	AGTTTCTGCGGGATGTTTTGTTAT	2039-2062	<i>leu-tRNA</i>	[235] / AY007725

s = sense, as = antisense; * Primer für die PCR-Untersuchung; ** Primer für die Herstellung von Oligonukleotid-Sonden

Tab. 11 (Fortsetzung)

Angaben zu den Oligonukleotidprimern		Angaben zur Spezifität der PCR		
Name	Sequenz (5' - 3')	Lokalisation im Gen ³	Gen	Referenz / Acc.-Nr.
PmTbPA1 as	TGCGACAACGGAAATTCCTC	180-160	<i>tbPA</i>	[235] / AY007725
PmTbPA1 s	GGACAGTGCATATAACTTGTTTACTA	969-988	<i>tbPA</i>	[235] / AY007725
IS1016 as	ACGATAACTCAGCATAATAGCGCCT	innerhalb des IR (variabel)	<i>IR</i>	[235] / AY007725
CapA s	TGCCAAAATCGCAGTCAG	9891-9874	<i>hyaD</i>	[310] / AF067175
CapA as	TTGCCATCATTGTCAGTG	193-176	<i>hyaC</i>	[310] / AF067175
CapB s	CATTTATCCAAGCTCCACC	260-278	<i>bcbB</i>	[310] / AF169324
CapB as	GCCCGAGAGTTTCAATCC	1018-1001	<i>bcbB</i>	[310] / AF169324
CapD s	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	3142-3165	<i>dcbF</i>	[310] / AF302465
CapD as	CATCTACCCACTCAACCATATCAG	3789-3766	<i>dcbF</i>	[310] / AF302465
CapE s	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	1143-1163	<i>ecbJ</i>	[310] / AF302466
CapE as	GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	1656-1637	<i>ecbJ</i>	[310] / AF302466
CapF s	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	299-320	<i>fcB</i>	[310] / AF302467
CapF as	TTCCGCCGTCAATTACTCTG	1150-1131	<i>fcB</i>	[310] / AF302467
Pm NanB s**	AGTGTCCGGGAATAGTGGTG	1377-1396	<i>nanB</i>	diese Arbeit / AF274868
Pm NanB as**	CCGTTGTTCAACAACGAACC	1931-1914	<i>nanB</i>	diese Arbeit / AF274868
Pm NanB1 s*	GTCCTATAAAGTGACGCCGA	2607-2626	<i>nanB</i>	diese Arbeit / AF274868
Pm NanB1 as*	ACAGCAAAGGAAGACTGTCC	3191-3171	<i>nanB</i>	diese Arbeit / AF274868
Pm NanH s**	CACTGCCTTATAGCCGTATTCC	292-313	<i>nanH</i>	diese Arbeit / AF274869
Pm NanH as**	AGCACTGTTACCCGAACCC	1256-1238	<i>nanH</i>	diese Arbeit / AF274869

s = sense, as = antisense; * Primer für die PCR-Untersuchung; ** Primer für die Herstellung von Oligonukleotid-Sonden

Tab. 11 (Fortsetzung)

Angaben zu den Oligonukleotidprimern		Angaben zur Spezifität der PCR		
Name	Sequenz (5' - 3')	Lokalisation im Gen ³	Gen	Referenz / Acc.-Nr.
Pm NanH1 s*	GAATATTTGGGCGGCAACA	516-534	<i>nanH</i>	diese Arbeit / AF274869
Pm NanH1 as*	TTCTCGCCCTGTCATCACT	876-856	<i>nanH</i>	diese Arbeit / AF274869
MhPm ExbB s	GGTGGTGATATTGATGCGGC	277-296	<i>exbBD</i>	diese Arbeit / AE006158
Pm TonB as	GCATCATGCGTGCACGGTT	1421-1404	<i>tonB</i>	diese Arbeit / AE006158
MhPm SodA s	TACCAGAATTAGGCTACGC	14-32	<i>sodA</i>	diese Arbeit / AE006034
Pm SodA as	GAAACGGGTTGCTGCCGCT	375-357	<i>sodA</i>	diese Arbeit / AE006034
Pm SodC s	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA	24-43	<i>sodC</i>	[177] / X83124
Pm SodC as	TGGTGCTGGGTGATCATCATG	259-239	<i>sodC</i>	diese Arbeit / X83124
Pfha s**	TCCATACACTCGGTAATATG	2024-2043	<i>pfhB2</i>	diese Arbeit / AY035342
Pfha as**	TCTAATGTACCAGGCAGATC	3488-3469	<i>pfhB2</i>	diese Arbeit / AY035342
Pfha1 s*	AGCTGATCAAGTGGTGAAC	2409	<i>pfhB2</i>	diese Arbeit / AY035342
Pfha1 as*	TGGTACATTGGTGAATGCTG	2684	<i>pfhB2</i>	diese Arbeit / AY035342
HgbA s	TGGCGGATAGTCATCAAG	68	<i>hgbA</i>	diese Arbeit / Pm0337
HgbA as	CCAAAGAACCACTACCCA	487	<i>hgbA</i>	diese Arbeit / Pm0337
HgbB s	ACCGCGTTGGAATTATGATTG	308	<i>hgbB</i>	diese Arbeit / Pm0337
HgbB as	CATTGAGTACGGCTTGACAT	1096	<i>hgbB</i>	diese Arbeit / Pm0337

s = sense, as = antisense; * Primer für die PCR-Untersuchung; ** Primer für die Herstellung von Oligonukleotid-Sonden

³ Die Lage im Gen wird angegeben im Verhältnis zu dessen offenem Leserahmen. In Klammern ist die entsprechende Accession-Nummer der Referenzsequenz, die unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> abrufbar ist, angegeben.

Tab. 12: Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation virulenzassoziierter Gene in *Mannheimia* spp. und *Pasteurella trehalosi*

Angaben zu den Oligonukleotidprimern		Angaben zur Spezifität der PCR		
Name	Sequenz (5' - 3')	Lokalisation im Gen ³	Gen	Referenz / Acc.-Nr.
LktA s	GGGAACAGAGCATCGTGA	1626-1643	<i>lktA</i>	diese Arbeit / M20730
LktA as	ATTTATCATTGCCGTCAGAAT	2416-2396	<i>lktA</i>	diese Arbeit / M20730
MhLktA s	GGTAAAGGCAATGACCTATTACACG	2317-2341	<i>lktA</i>	diese Arbeit / Z26247
MhLktA as	CTCTAGCAAATTGAATAGAAGATAAAC	2860-2834	<i>lktA</i>	diese Arbeit / Z26247
PomA s	CAACACATATGATTATGGATC	135-155	<i>pomA</i>	diese Arbeit / AF133259
PomA as	TACAGCTGTTACATTAGCTG	1002-983	<i>pomA</i>	diese Arbeit / AF133259
Mh TrbPB s	AAAGGATATTGGGATTTACT	557-576	<i>trbpB</i>	diese Arbeit / U73302
Mh TrbPB s	AAACAACAAATACCGACTTAT	979-961	<i>trbpB</i>	diese Arbeit / U73302
Mh TrbPA2 as	TCATAGCGAGTTAAATCACG	266-247	<i>trbpA</i>	diese Arbeit / U73302
Mh TrbPB2 s	CGACGGAATTAGGTGGTATT	1664-1683	<i>trbpB</i>	diese Arbeit / U73302
Gcp s	GTGTTGCCATTTATGATGAAG	42-63	<i>gcp</i>	diese Arbeit / U15958
Gcp as	AGCGAAGAAAGCCAGTGTA	952-933	<i>gcp</i>	diese Arbeit / U15958
Irp s	GGCGAAAACCTAGATATGTCGG	313-334	<i>irp</i>	diese Arbeit / AY028745
Irp as	CCTAAATTAAGGCGTTCAATCG	1337-1316	<i>irp</i>	diese Arbeit / AY028745
MhPm ExbB s	GGTGGTGATATTGATGCGGC	277-296	<i>exbBD</i>	diese Arbeit / U62565
Mh TonB as	GTGGTGTGCTCTTTACGCT	1296-1277	<i>tonB</i>	diese Arbeit / U62565
MhPm SodA s	TACCAGAATTAGGCTACGC	14-32	<i>sodA</i>	diese Arbeit / L47537
Mh SodA as	TCGCACAACCGCAGGTTGCT	637-618	<i>sodA</i>	diese Arbeit / L47537
Mh SodC s	AAGGTGGCAAGCTCACAGCAG	13-33	<i>sodC</i>	diese Arbeit / U59225
Mh SodC as	TGAGTGGTTATCGCCGCCT	242-224	<i>sodC</i>	diese Arbeit / U59225

s = sense, as = antisense

Tab. 13: Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation virulenzassoziierter Gene in *Haemophilus influenzae* und *Escherichia coli*

Angaben zu den Oligonukleotidprimern		Angaben zur Spezifität der PCR		
Name	Sequenz (5' - 3')	Lokalisation im Gen ³	Gen	Referenz / Acc.-Nr.
Hiiga s	TTCCGATGATTGATTTTAGTG	65-85	<i>iga</i>	diese Arbeit / AF522262
Hiiga as	CCATTCTTGCCAAGATTTT	846-828	<i>iga</i>	diese Arbeit / AF522262
Hiadh s	ATAAAGTGGGCAAACGTGC	3303-3321	<i>hia</i>	diese Arbeit / U 38617
Hiadh as	CTGGTAACCAACACCTGCT	3541-3523	<i>hia</i>	diese Arbeit / U 38617
III-System s	TTTTCCCTTGATGGTATGCC	18146-18165	<i>escV</i>	diese Arbeit / AF453441
III-System as	TTTACAAACTTCATCGCCCC	18300-18281	<i>escV</i>	diese Arbeit / AF453441

s = sense, as = antisense

Tab. 14: Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation der 16S rRNS von [*P.*] *haemolytica*-Isolaten

Angaben zu den Oligonukleotidprimern		Angaben zur Spezifität der PCR
Name	Sequenz (5' - 3')	
UF	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Universalprimer für prokaryotische 16S rRNS-Gene
UR	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Universalprimer für prokaryotische 16S rRNS-Gene

F = Forward, R = Reverse

Tab. 15: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis virulenzassoziierter Gene in *Pasteurella multocida* ssp. und spp.-Stämmen

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen (°C/sec)			
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	Anzahl Zyklen
<i>capA</i>	CapA s/CapA as	94/40	56/40	72/80	30
<i>capB</i>	CapB s/CapB as	94/30	56/30	72/60	25
<i>capD</i>	CapD s/CapB as	94/30	56/30	72/60	25
<i>capE</i>	CapE s/CapE as	94/30	56/30	72/40	25
<i>capF</i>	CapF s/CapF as	94/30	56/30	72/60	25
<i>exbBD-tonB</i>	MhPm exbBs/Pm tonB as	94/40	55/40	72/90	30
<i>hgbA</i>	HgbA s/HgbA as	94/30	53/30	72/30	25
<i>hgbB</i>	HgbB s/HgbB as	94/30	54/30	72/45	25
<i>kmt</i>	KMT s/KMT as	94/40	57/40	72/60	30
<i>nanB</i>	NanB s/NanB as	94/30	58/30	72/60	25
<i>nanB</i>	NanB1 s/NanB1 as	94/30	56/30	72/45	25
<i>nanH</i>	NanH s/NanH as	94/30	58/30	72/60	30
<i>nanH</i>	NanH1 s/NanH1 as	94/30	53/30	72/30	25
<i>ompH</i>	OmpH s/OmpH as	94/40	57/40	72/60	30
<i>ompH</i>	OmpH2 s/OmpH2 as	94/40	57/30	72/90	30
<i>ompH</i>	Past-li [<i>KpnI</i>]/Past-re[<i>SacI</i>]	94/40	56/40	68/90	30
<i>oma87</i>	Oma87 s/Oma87 as	94/40	53/30	72/150	30
<i>oma87</i>	Oma87 s/Oma87-1 as	94/40	55/30	72/60	25
<i>pfhB2</i>	PfhB1 s/PfhB1 as	94/30	56/30	72/30	25
<i>pfhB2</i>	PfhB s/PfhB as	94/30	55/30	72/90	30
<i>psl</i>	P6 s/P6 as	94/40	50/40	72/60	30
<i>ptf</i>	Fim4 s/Fim4 as	94/30	55/30	72/60	25
<i>sodA</i>	MhPmsodA s/Pm sodA as	94/30	55/30	72/40	25
<i>sodC</i>	Pm sodC s/Pm sodC as	94/30	55/30	72/30	25
<i>tbPA</i>	PmTbPA s/PmTbPA as	94/30	57/30	72/60	25
<i>toxA</i>	ToxA s/ToxA as	94/60	55/40	72/80	30
<i>toxA</i>	ToxA2 s/ToxA2 as	94/40	51/60	72/300	30

s = sense; as = antisense

Tab. 16: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis virulenzassoziierter Gene in *Mannheimia*- und *Pasteurella trehalosi*-Stämmen

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen (°C/sec)			
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	Anzahl Zyklen
<i>lktA</i>	MhLktA s/MhLktA as	94/40	55/30	72/60	25
<i>lktA</i>	LktA s/LktA as	94/40	54/30	72/60	30
<i>pomA</i>	Mh pomA s/Mh pomA as	94/40	52/40	72/60	25
<i>trbpB</i>	TrbPB s/TrbPB as	94/40	53/40	72/60	25
<i>trbpBA</i>	TrbPBA s/TrbPBA as	94/40	52/30	72/40	25
<i>gcp</i>	Gcp s/Gcp as	94/40	55/40	72/60	25
<i>irp</i>	Irp s/Irp as	94/40	56/40	72/60	25
<i>exbBD-tonB</i>	MhPm exbD s/Mh tonB as	94/40	56/30	72/80	25
<i>sodA</i>	MhPm sodA s/Mh sodA as	94/40	55/30	72/60	25
<i>sodC</i>	Mh sodC s/Mh sodC as	94/40	55/30	72/40	25

s = sense; as = antisense

Tab. 17: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung virulenzassoziierter Gene in *Haemophilus influenzae*- und *Escherichia coli*-Isolaten

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen (°C/sec)			
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	Anzahl Zyklen
<i>iga</i>	Hiiga s/Hiiga as	94/40	54/30	72/60	25
<i>hia</i>	Hiadh s/Hiadh as	94/40	53/30	72/30	25
<i>escV</i>	III-System s/III-System as	94/40	57/30	73/45	25

s = sense; as = antisense

Tab. 18: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung der 16S rRNS in *Pasteurella*-Spezies

Zielregion	Primer	Reaktionsbedingungen (°C/sec)			
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	Anzahl Zyklen
16S rRNS	UF/UR	94/45	58/45	72/45	30

3.4.3 DNS-DNS-Hybridisierungstechniken

3.4.3.1 Herstellung von nicht-radioaktiv-markierten Oligonukleotid-Sonden

Die Markierung fand durch den Einbau von Dioxigenin-11-2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat (Dig-11-dUTP) statt. Diese Markierungsreaktion erfolgte durch eine normale PCR-Amplifikation unter Verwendung markierter Nukleotide. Der Reaktionsansatz wurde nach Angaben des Herstellers („PCR DIG Probe Synthesis Kit“; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Zur Überprüfung der Markierungsreaktion wurde das veränderte Laufverhalten der markierten DNS zu einer Kontroll-DNS im Agarosegel-Elektropherogramm beurteilt. Anschließend wurde die markierte DNS aufgereinigt (s. Kap. 3.4.1.3)

3.4.3.2 Dot-Blot-Technik

Für die Herstellung der Dot Blots wurden Ansätze 10 min bei 100°C im Wasserbad gekocht und danach sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNS zu verhindern. Die so denaturierte DNS (2,5 µl) wurde durch Auftropfen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) transferiert. Die Membran wurde luftgetrocknet und die DNS durch Erwärmen der Membran auf 120°C für 20 min auf der Membran fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei + 4°C aufbewahrt.

3.4.3.3 Hybridisierung mit Dioxigenin-(DIG)-markierten Oligonukleotidsonden

Die Nylonmembran mit den fixierten DNS-Proben wurde für 2 – 3 h in Prähybridisierungslösung (20 ml/100 cm² Membran) und anschließend über Nacht in 2 – 4 ml Hybridisierungslösung bei 68°C rotierend inkubiert. Die Anteile der ungebundenen Sonde wurden anschließend durch zwei Waschschriffe bei RT bzw. bei 68°C abgelöst. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

3.4.3.4 Nachweis gebundener markierter Sonden

Für den Nachweis der an die DNS gebundenen markierten Sonden wurde die Membran mit Blocking-Reagenz-Lösung blockiert, mit einem Antikörper-Konjugat (Anti-DIG, Ro-

che) inkubiert und nochmals in Waschlösung I gewaschen. Anschließend wurde durch Hinzufügen von Substratlösung die DIG-markierte Sonde sichtbar gemacht. Der Nachweis erfolgte mit chemolumineszierenden Substraten.

3.4.3.5 Chemolumineszenz

Chemolumineszierende Substrate bewirkten über eine katalytische Reaktion eine Lichtemission, die mit Hilfe von Röntgenfilmen nachgewiesen wurde. Auf die Nylonmembran wurden 0,5 ml/100 cm² Substratlösung gleichmäßig aufgetragen. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in Zellophanfolie verpackt. Auf die derart verpackte Membran wurde in einer Röntgenfilmkassette ein Röntgenfilm gelegt und je nach Sonde nach 10 bis 120-minütiger Exposition entwickelt. Die Schwärzung der Röntgenfilme im Bereich der aufgetropften DNS, deren Intensität mit den Kontrollstämmen verglichen wurde, indizierte die erfolgte Chemolumineszenzreaktion.

3.4.3.6 Aufreinigung und Waschen von Membranen

Die Nylonmembranen konnten nach dem Nachweis markierter, gebundener Oligonukleotid-Sonden mittels Chemolumineszenz bis zu dreimal wieder verwendet werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran gründlich für ca. 1 min in 2 x SSC bei RT gewaschen und anschließend dreimal für 15 min mit Stripping-Puffer bei 37°C rotierend im Ofen inkubiert. Die Reste des Stripping-Puffers wurden durch zweiminütiges Schwenken der Membran in 2 x SSC bei RT entfernt. Für eine spätere Verwendung wurden die Membranen getrocknet und in Whatman-Papier bei +4°C aufbewahrt. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

3.4.4 DNS-Klonierung

3.4.4.1 Verwendete Plasmide

Für die Klonierung der *Pasteurella ompH*-Gene wurden die Plasmide pMOK (Mologen AG, Berlin; Plasmid-Karte s. Abb. 1) und pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Diese wurden in *E. coli*-Stämmen unter Zugabe von 30 µg/ml Kanamycin (pMOK) bzw. 50 µg/ml Ampicillin propagiert.

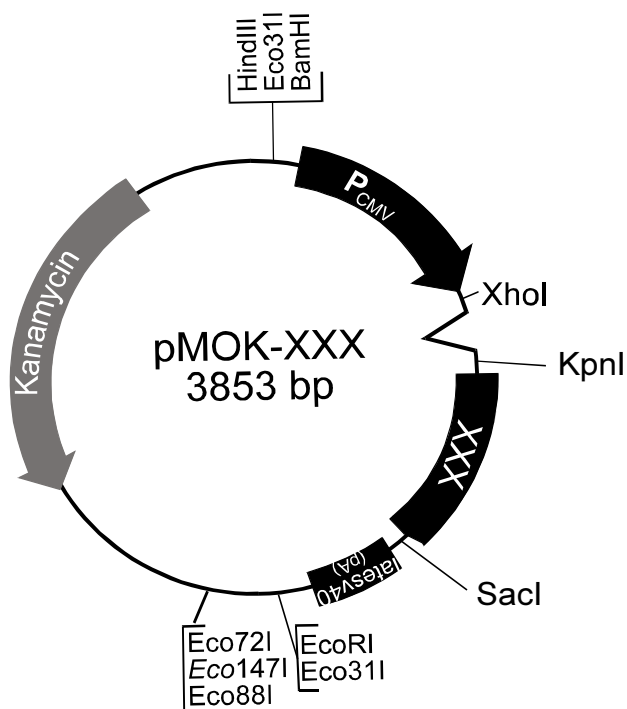


Abb. 1: Vektorkarte des Klonierungsvektors pMOK

3.4.4.2 PCR-Amplifizierung des *Pasteurella* ssp.- und spp. *ompH*-Gens

Zur Klonierung und DNS-Sequenzanalyse der *ompH*-Gene verschiedener *Pasteurella*-Spezies und -Subspezies wurden die in der folgenden Tab. 19 aufgeführten Oligonukleotid-Primer verwendet, die alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden.

Tab. 19: Oligonukleotid-Primer für die Klonierung der *Pasteurella* ssp. und -ssp. *ompH*-Gene

Angaben zu den Oligonukleotidprimern			
Name	Sequenz (5' - 3')	Lokalisation im Gen ⁴	Verwendungszweck
OmpH Mol s	ATGAAAAAGACAATCGTAGCTAGC	1-26	Klonierung des PCR-Fragmentes in pCR2.1 TOPO-Vektor
OmpH Mol as	TTAGAAGTGTACGCGTAAACC	1057-1032	
Past-li [<i>KpnI</i>]	CGGATAAGGTACCATGAAAA GAACAATCGTA	1-20	Amplifikate zur Ligation in Vektor pMOK [<i>KpnI</i> , <i>SacI</i>]
Past-re [<i>SacI</i>]	TTCTCAGAGCTCTTAGAAGTG TACGCGTAAACC	1057-1032	

3.4.4.3 DNS-Restriktion

Bei der Restriktionsenzymanalyse wird DNS durch Restriktionsendonukleasen an spezifischen Stellen geschnitten. Auf diese Weise kann die DNS z.B. für nachfolgende Klonierungsarbeiten vorbereitet werden bzw. es werden bestimmte Restriktionsmuster von Genomen oder DNS-Bereichen erstellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend der empfohlenen Protokolle der Hersteller eingesetzt (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus), die Reaktionsansätze wurden Standardprotokollen entsprechend pipettiert [11].

Die Klonierung von *Pasteurella ompH*-Genen erfolgte zunächst mit dem Klonierungsvektor pMOK, später aus Gründen der Zeitersparnis mit dem pCR2.1 TOPO-Vektor. pMOK wurde zur Vorbereitung der Ligationsreaktion mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *SacI* geschnitten. Ebenso wurden die *ompH*-Gene, die mit entsprechenden Oligonukleotidprimern (s. Tab. 19) amplifiziert wurden, mit diesen beiden Enzymen restringiert, um anschließend mit dem Klonierungsvektor ligiert zu werden (s. Kap. 3.4.4.4).

3.4.4.4 Ligation

Bei der Ligation handelt es sich um das Einbringen eines fremden DNS-Fragmentes (Insert) in einen zuvor linearisierten Vektor mit Hilfe des Enzyms T4-Ligase. Durch einen

⁴ Die Lage im Gen wird angegeben im Verhältnis zu dessen offenem Leserahmen. Als Referenz wurde die unter der Accession-Nummer U50907 bei <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> abrufbare *ompH*-Gensequenz zugrunde gelegt.

Restriktionsendonukleaseverdau wird die gewünschte Vektor-DNS mit zuvor bestimmten Endonukleasen linearisiert und anschließend aufgereinigt (s. Kap. 3.4.1.3 und Kap. 3.4.4.3). Auf gleiche Weise wird der zu klonierende DNS-Bereich restringiert, so dass bei Vektor und Insert zueinander kompatible Enden geschaffen werden. Das restringierte Insert wird anschließend gereinigt bzw. das entsprechende DNS-Fragment aus dem Agarosegel nach dessen gelelektrophoretischer Auftrennung eluiert (s. Kap. 3.4.1.3).

Ligationsansatz

Der Ansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Insert-DNS wurde in einer Menge von 10 – 100 ng eingesetzt. Die Konzentration der Vektor-DNS wurde in der Weise auf die Insert-DNS abgestimmt, dass die Anzahl der freien Enden des Inserts denen des Vektors entsprachen. Dem Ansatz wurden außerdem 2 μl 10-fach konzentrierter Ligase-Puffer, 2 μl ATP (10 mM) und 1 μl T4-DNS-Ligase zugesetzt, bevor er mit ACILA-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt wurde. Der gesamte Ansatz wurde ein bis drei Stunden bei RT inkubiert. 5 μl dieses Ansatzes wurden für die Transformation verwendet, das restliche Volumen konnte bei -20°C über mehrere Wochen gelagert und für eine weitere Transformation verwendet werden.

3.4.4.5 Transformation

In dieser Arbeit wurde die Elektroporation zum Einbringen von Plasmidkonstrukten in kompetente *E. coli* (XL-1 bluestrain, TOP10, DH5 α) angewendet. Dabei werden die Zellen mittels eines kurzen, starken Stromimpulses, bei dem die Zellwand permeabilisiert wird, transformiert. 40 μl elektrokompente Zellen je Ansatz wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 μl der zu transformierenden DNS in einer eisgekühlten Küvette luftblasenfrei vermischt. Nach der Transformation in einem Elektroporator (Geräteeinstellungen: 25 μF , 400 Ω , 2,5 kV) wurde die Bakterienlösung in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, zunächst eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach auf entsprechenden Antibiotika-Selektionsplatten ausgestrichen und weitere 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Je nach der Transformationseffizienz wurden am Tag darauf von mindestens zwei bis maximal 10 Klonen eine Plasmidaufarbeitung (Miniprep) wie unter Pkt. 3.4.1.2 beschrieben, durchgeführt.

3.4.4.6 DNS-Sequenzanalyse

Die DNS-Sequenzanalysen wurden von der Firma AGOWA GmbH, Berlin, mittels der Kettenabbruchmethode nach F. Sanger durchgeführt. Bei dieser automatisierten Methode dienen synthetische Oligonukleotide als Primer einer *in vitro*-DNS-Synthese. Dabei stellt der zu sequenzierende Strang die Matrize dar. Das synthetisierte DNS-Molekül wird mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Zu einem statistisch möglichst gleichmäßigen, basenspezifischen Kettenabbruch kommt es durch Einbau eines 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphates (ddNTPs). Diesen Nukleotiden fehlt die zur weiteren Kettenverlängerung notwendige 3'-Hydroxylgruppe. So werden vier verschiedene Reaktionen benutzt, die jeweils eines der vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) neben den üblichen dNTPs enthalten. Das statistische Auftreten der Kettenabbruch-Reaktionen an der entsprechenden Position der DNS (ddTTP gegenüber A; ddCTP gegenüber G und so weiter) führt zu unterschiedlich großen DNS-Fragmenten. Durch die Größenauftrennung in einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Sichtbarmachen der einzelnen Banden durch Fluorographie werden die Positionen des Kettenabbruchs sichtbar gemacht. Das Ablesen dieser Sequenzleitern führt zu den entsprechenden Sequenzinformationen. Zur DNS-Sequenzanalyse wurden die in Tab. 20 aufgeführten Sequenzierungs-Primer verwendet.

Die DNS-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Lasergene Edit Sequence und Megalign (DNASTAR, Copyright © 2003) analysiert und abgeglichen. Ein phylogenetischer Baum der *ompH*-Gensequenzen verschiedener *Pasteurella*-Spezies wurde mit Hilfe der Programme TREECON (Copyright © 1994-2001) und MEGA 2 (Copyright © 1993-2000) erstellt.

Tab. 20: Oligonukleotid-Primer zur DNS-Sequenzanalyse der *Pasteurella ompH*-Gene

Angaben zu den Oligonukleotidprimern		
Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendungszweck
M13 s	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung der <i>ompH</i> -Gene in pCR2.1 TOPO-Vektor
M13 as	CAGGAAACAGCTATGAC	
pMOK fw	AGACAGAGAAGACTCTTGCG	Sequenzierung der <i>ompH</i> -Gene in pMOK-Vektor
early late	TCCCCCTGAACCTGAAACAT	