

3.1.5 Gensonden

Die für die Hybridisierungsversuche eingesetzten, auf die 16S rRNA der jeweiligen *Lactobacillus*-Spezies zielgerichteten Gensonden wurden von der MWG-Biotech AG, D-85556 Ebersberg, als Auftragsarbeit synthetisiert. Die Sonden wurden am 3'-Ende mit Digoxigenin (DIG) markiert, das nach der Bindung von Anti-Digoxigenin-AP-Fragmenten und Zugabe der Substrate NBT/X-Phosphat die kolorimetrische Detektion von Nukleinsäuren ermöglicht. Lediglich die *L. gasseri*-Sonde wurde nach einer ebenfalls von der MWG Biotech AG als Auftragsarbeit durchgeführten partiellen Sequenzanalyse des 1960 von REUTER isolierten *L. gasseri*-Stammes DSM 20077 bzw. ATCC 19992 (F164) mit der PCR-Technik selbst hergestellt und DIG-markiert. Die Benennung der Gensonden erfolgte in Anlehnung an den Vorschlag von WHEELER ALM et al. (1996). Weiterführende Angaben zu den eingesetzten Gensonden sind in Tab. 17 und Anhangstab. 4 aufgeführt.

Tab. 17: Angaben zu den Gensonden

Gensonde ^a	Sondensequenz (5' → 3')	Zielregion ^b
S-S-Lacid-2519-a-A-20	CCG TAT CTC TAC GGA TTG CA	2519-2538
S-S-Lgass-2592-a-A-108	TCG.....GGT*	2592-2699
S-S-Ljohn-1580-a-A-27	TAG TTT CAT TTA GTG CAA GCA CTA AAA	1580-1606
S-S-Lpara-1597-a-A -19	TTC CAT GTT GAA TCT CGG T	1597-1615
S-S-Lrham-1586-a-A-23	AGC ACC TTT CAA TAA TCA GAA CT	1586-1608
S-S-Lzeae-1587-a-A-18	CCG TTC ATC GAC CAA AAC	1587-1604

^a: Gensondenbenennung nach WHEELER ALM et al. (1996); ^b: entsprechende 16S rRNA-Position des *E. coli*-numbering Systems (BROSIUS et al., 1981);

*: die Gesamtsequenz umfaßt 108 Nukleotide und ist in der Anhangstab. 5 beschrieben

3.1.6 Technische Geräte und sonstiges Material

1. Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 C (Fa. Eppendorf, 5415 26315)
2. Schüttelwasserbad Typ 3047 (Fa. Köttermann)
3. Schüttelgerät: IKA Vibro Fix VF 1 (Fa. Schmid, 444A2100)
4. DNA-Fluorometer TKO 100 (Fa. Hoefer)
5. Horizontalschütteltisch: Certomat HK (Fa. Braun)
6. Thermomixer 5436 (Fa. Eppendorf)
7. Blockthermostat BT 200 (Fa. Kleinfeld)
8. Hybridisierungssofen OV 3 (Fa. Biometra, 052-200)
9. Borosilikat-Hybridisierungsgefäße (Fa. Biometra, 052-002)
10. UV-Crosslinker UVC 500 (Fa. Hoefer)
11. Magnetrührer MR 2002 (Fa. Heidolph)
12. verschiedene Pipetten mit verstellbarem Volumenbereich (Fa. Eppendorf)
13. Pipettenspitzen:
 - 0,5-10 µl (Fa. Eppendorf, 0030001.168)
 - 10-100 µl (Fa. Eppendorf, 003003.004)
 - 100-1000 µl (Fa. Eppendorf, 0030015.002)
14. Reaktionsgefäße 1,5 ml (Fa. Eppendorf, 0030120.086)
15. Hi-yield Reaktionsgefäße (Fa. Robbins Scientific, 1046-00-0)
16. Gram-Färbe-Kit (Fa. Difco, 332832)
17. Mehrfachfiltrationsgerät Minifold I SRC 96 D (Schleicher & Schuell, 447910)
18. Gel-Blottingpapier (Schleicher & Schuell, 424896)
19. Optitran BAS-S 83 Nitrozellulosefilter, Porengröße 0,2µm (Schleicher & Schuell, 439386)
20. elektronisches Wasserbad / Umwälzthermostat (Fa. Julabo, 0000F26)
21. Personal Computer mit Internet-Zugang

Arbeitsgeräte und sonstiges Material für die PCR und Gelelektrophorese

1. Arbeitstisch: Mod. HF 48 (Fa. Gelaire Flow Laboratories)
2. mechanisches Schüttelgerät: IKA Vibro Fix VF 1 (Fa. Schmidt, 444A2100)
3. Schüttelwasserbad Typ 3047 (Fa. Köttermann)
4. DNA Thermal Cycler Trio-Thermoblock (Fa. Biometra, Göttingen)
5. Elektrophoresekammer: Compact Midi 8 (Fa. Roth, A 560,1)
6. Netzgerät: Power Pack Pm 25 (Fa. Biometra)
7. Eppendorf Reaktionsgefäße: safe-lock 1,5 ml (Fa. Eppendorf, 30121708)
8. verschiedene Pipetten mit verstellbarem Volumenbereich (Fa. Eppendorf)

9. Videokamera: Intas GDS-System
10. Videoprinter: Mitsubishi P68 E mit Photopapier Mitsubishi K 65 HM
11. Transilluminator-UV-Licht-Gelview / Uvis 20 (Fa. Hoefer/Bios Pharmacia)

3.2 Methoden

3.2.1 Klassische phänotypische Identifizierung der Laktobazillenstämme

Die Identität sämtlicher in die Untersuchungen einbezogener Laktobazillenstämme wurde anhand eingehender physiologischer und biochemischer Tests nach den Vorgaben von LERCHE und REUTER (1960, 1962) und REUTER (1964) überprüft.

Die auf MRS-Nährboden (DE MAN et al., 1960) angezüchteten Laktobazillen wurden zunächst auf das Vorliegen einer Reinkultur überprüft und gegebenenfalls zusätzlich auf dem Selektivnährboden Lactobacillus sorbic acid Agar (LaS) nach LERCHE und REUTER (1960) und Humanblutagar (Biogarde[®]-Agar) (REUTER, 1985, 1990) bei $37\pm 1^\circ\text{C}$ in mikroaerobem Milieu subkultiviert. Nach Beurteilung der Koloniemorphologie wurde von den jeweiligen Kulturen ein Gram-Präparat angefertigt. Die Fähigkeit, H_2O_2 zu spalten, wurde anhand eines Katalase-Tests (3%ige H_2O_2 -Lösung) überprüft. In einer vom zweiten bis zum siebenten Tag täglich abgelesenen biochemischen Differenzierungsreihe wurden die Fermentationsmuster der Bakterien gegenüber 12 Reaktionskörpern ermittelt sowie folgende Reaktionen geprüft: Gasbildung aus Glukose, Koagulation von Briggs-Milch, Säuerung sowie Koagulation und Reduktion von Lackmusmilch, Wachstumsverhalten bei $15\pm 0,5^\circ\text{C}$ (Prüfung nach 3 Tagen), $20\pm 0,5^\circ\text{C}$ (Prüfung nach 2 Tagen) und bei $45\pm 0,5^\circ\text{C}$ (Prüfung nach 1 Tag).

3.2.2 Isolierung der bakteriellen DNA

Die Isolierung der bakteriellen DNA erfolgte nach POT et al. (1993) mit einigen Modifikationen. Mit einer Platinöse wurden aus Reinkulturen 3 bis 4 Einzelkolonien der jeweiligen Laktobazillen von MRS-Agar in 5 ml MRS-Flüssigmedium eingebracht und für 18 bis 20 h bei $37\pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet.

Von dieser Übernachtkultur wurden jeweils 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 10000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden zwei weitere Male 1,5 ml der jeweiligen

Übernachtskultur in das entsprechende Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend zentrifugiert. Die sich anschließenden Arbeitsschritte sind in Tab 18 aufgeführt.

Tab 18 DNA-Extraktion (modifiziert) nach POT et al. (1993)

Zellwandlysis

Resuspension des Bakterien-Pellets:	200 µl Extraktionspuffer (50mM, Tris-HCl, pH 8; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA)
Zugabe von:	50 µl Lysozym-Lösung (50 mg/ml, gelöst in Extraktionspuffer) 30 µl Mutanolysin (3000 U/ml, gelöst in A. bidest.)
Inkubation:	ca. 18 h bei 37°C im Schüttelwasserbad
Zugabe von:	13 µl SDS (25%)
Inkubation:	30 min. bei 55°C
Zugabe von:	5 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml A. bidest.)
Inkubation:	1 h bei 50°C, danach 10 min bei 65°C
Ausfällung von Zelldetritus:	Zugabe von 170 µl NaCl, mischen, 1h auf Eis stellen, 15 min zentrifugieren, Überstand (400 µl) in neues Reaktionsgefäß überführen

DNA-Reinigung

Zugabe von:	400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) schütteln
Zentrifugation:	5 min bei 14000 rpm Überstand in "Hi-yield" - Reaktionsgefäß überführen

DNA-Präzipitation

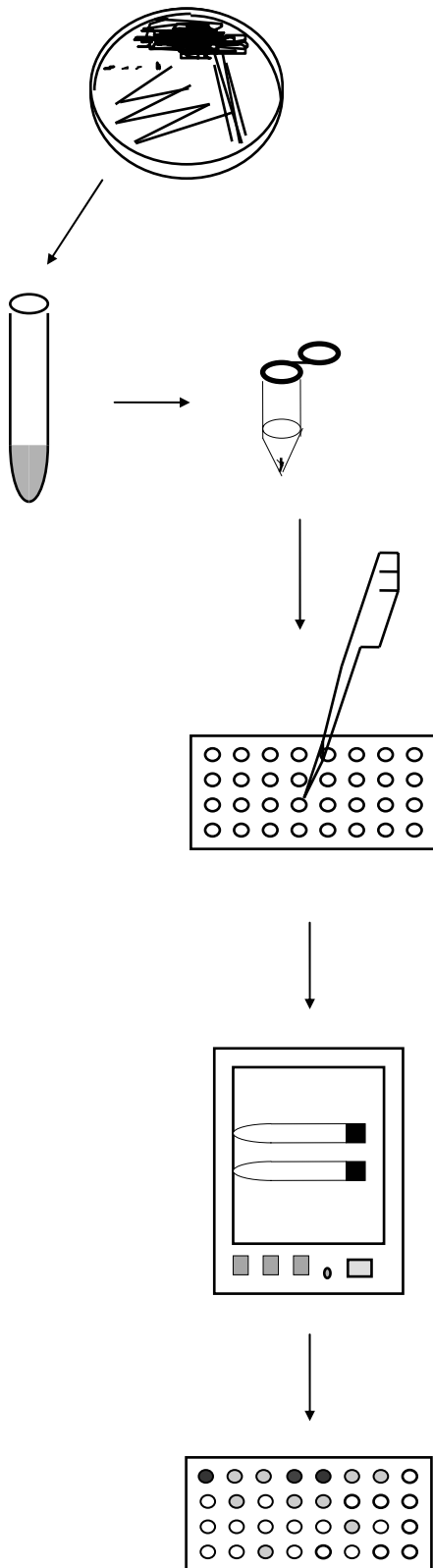
DNA-Ausfällung:	Zugabe von 300 µl Isopropanol (eisgekühlt) mischen
Zentrifugation:	5 min bei 14000 rpm Überstand dekantieren
Zugabe von:	300 µl Ethanol (70%, eisgekühlt) mischen
Zentrifugation:	5 min bei 14000 rpm Überstand dekantieren
Trocknung:	30 min bei 37°C
Resuspension in:	100 µl A. bidest.

3.2.3 Messung der DNA-Konzentration

Nach Isolierung und Reinigung der bakteriellen DNA erfolgte die fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes. Hierzu wurde das Fluorometer (TKO 100, Fa. Hoefer) mit Kälberthymus-DNA geeicht. Die auf die Nitrozellulosemembran aufzutragende Standard DNA-Menge pro Probe wurde auf 500ng festgelegt. Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen ist hinsichtlich der Reproduktion der Versuchsansätze von besonderer Bedeutung.

3.2.4 Dot Blot-Hybridisierungstechnik

Die Spezifität der Gensonden wurde anhand der Dot Blot-Hybridisierungstechnik überprüft. Der Transfer der mikrobiellen Nukleinsäure auf Nitrozellulosefilter erfolgte unter Verwendung eines Mehrfachfiltrationsgerätes (Fa. Schleicher und Schuell), das die gleichzeitige Filtration von bis zu 96 Proben ermöglicht. Entsprechend der DNA-Konzentration der jeweiligen Laktobazillenstämme wurde die DNA in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit A. bidest. verdünnt, um eine DNA-Menge von 500 ng / Probenbehälter (dot) in einem Volumen von 50 µl / Probe zu erhalten. Vor dem Auftragen in die Probenbehälter des Mehrfachfiltrationsgerätes wurde die DNA für ca. 10 min bei $105 \pm 1,0^\circ\text{C}$ in einem Blockthermostat denaturiert, mit 200µl 20x SSC verdünnt und sofort auf Eis gestellt. Nach Vorbereitung der Blotting-Apparatur (Spülen der Probenbehälter mit 20x SSC, Einlegen von Gel-Blottingpapier und des Nitrozellulosefilters) erfolgte das Einbringen der jeweiligen als Einzelstrang vorliegenden Laktobazillen-DNA in definierte Probenbehälter. Der Kapillar-Transfer wurde unter Verwendung eines durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugten Vakuums beschleunigt. Unmittelbar nach Abschluß der Filtration wurde die DNA durch sogenanntes UV-cross-linking mit $2 \times 12000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ auf dem Nitrozellulosefilter fixiert. Nach 5 minütigem Schwenken in 2x SSC konnte der Nitrozellulosefilter für die Hybridisierung eingesetzt werden. Die Aufarbeitung der Bakterienstämme sowie die Durchführung der Dot Blot-Hybridisierung ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.



Anzucht der zu untersuchenden Bakterienstämme auf MRS-Nährböden unter definierten Bedingungen (Anaerobic-jar-Methode, 48 ± 1 h, $37 \pm 1^\circ\text{C}$) und anschließendes Überimpfen in MRS-Bouillon und Inkubation (18 ± 1 h, $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

Überführen der Bakteriensuspension (ca. $10^9/\text{ml}$) in 2 ml - Reaktionsgefäße mit anschließender Zentrifugation. Nach enzymatischer Lysis der Bakterienzellwände mit Mutanolysin erfolgt die DNA-Extraktion nach POT et al. (1993) mit Modifikationen.

Nach fluorometrischer Messung der DNA-Konzentration, erfolgt der Auftrag der extrahierten DNA (500ng DNA/dot) auf Nitrozellulosefilter (max. 96 Proben/Filter) und die sofortige UV-Fixation.

Nach erfolgter Prähybridisierung (2h) erfolgt die Zugabe der DIG-Gensonde(n) und die Inkubation im Hybridisierungsofen bei sondenspezifischer Temperatur (48 bis 72°C) für 18 ± 1 h.

Nach Blockier- und Waschschrinen sowie nach Zugabe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern, erfolgt die Färbung und Auswertung des Nitrozellulosefilters.

● = positiv ○ = schwach positiv/zweifelhaft
○ = negativ

Abb. 1: Aufarbeitung der Bakterienstämme und Durchführung der Dot Blot-Hybridisierung

Prähybridisierung

Der Nitrozellulosefilter wurde mit A. bidest. angefeuchtet und mit der Oberseite in zentripetale Richtung zeigend in ein Borosilikat-Hybridisierungsgefäß überführt. Hierbei war darauf zu achten, daß es zu keiner Luftblasenbildung zwischen der Rückseite des Filters und der Innenwand des Hybridisierungsgefäßes kam. Nach Zugabe von 10 ml bereits auf Hybridisierungstemperatur erhitzter Hybridisierungslösung (5x SSC, 0,1% N-Lauroyl-Sarkosin, 0,2% SDS, 1% Blockierungsreagens) / 100 cm² Filter, erfolgte die 2h andauernde Prähybridisierung. Sowohl die Prähybridisierung als auch die Hybridisierung wurde bei sondenspezifischer Temperatur durchgeführt, wobei die vom Gensondenhersteller angegebene Schmelztemperatur (T_m) der jeweiligen Sonde als Orientierung zugrunde gelegt wurde und bei einer Temperatur von ca. 10°C unter der jeweils angegebenen T_m prähybridisiert und hybridisiert wurde. Die Hybridisierungstemperatur der per PCR-Technik hergestellten *L. gasseri*-Sonde wurde experimentell ermittelt. Eine Übersicht der experimentell optimierten (Prä-)/Hybridisierungstemperaturen sowie der jeweils verwendeten Gensondenkonzentrationen ist in Anhangstab. 4 dargestellt.

Hybridisierung

Nach Beendigung der Prähybridisierung wurde die Hybridisierungslösung erneuert und nach Zugabe der in A. bidest. gelösten und für 10 min bei 105±1,0°C erhitzten Sonde für 18±1 h hybridisiert.

Blockierung und Färbung

Die Durchführung des Blockierens, der DIG-Anti-DIG-Antikörper-Komplex-Bildung und der Färbungsreaktion ist in Tab. 19 dargestellt. Mit Ausnahme der Farbreaktion, erfolgten sämtliche Inkubationen des Filters unter leichtem Schütteln. Um eine möglichst effiziente Waschwirkung zu erzielen, wurden für das Waschen des Filters mindestens 100 ml Lösung/100 cm² Filter verwendet. Die in Tab. 19 angegebenen Volumina für die Herstellung der Blockier-, Anti-Digoxigenin-Antikörper-, sowie der Färbelösung, beziehen sich ebenfalls auf eine Filtergröße von 100 cm². Die Inkubation des gleichmäßig mit Färbelösung überschichteten Filters erfolgte im Dunkeln. Die Auswertung des entwickelten und noch feuchten Filters wurde unmittelbar nach Durchführung des letzten Waschschrittes vorgenommen.

Tab.19: Blockieren, DIG-Anti-DIG-AK-Komplex-Bildung, Farbreaktion

verwendete (Puffer-) Lösung	Durchführung des Arbeitsschrittes	Dauer	Temperatur
Waschen: 2x SSC, 0,1% SDS	2x	5 min	der jeweiligen Hybridisierungstemp. entsprechend
Puffer 1 = 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl	1x	10 sec	RT
Blockieren: Puffer 2 = 50 ml Puffer 1 mit 1% Blocking-Reagens	1x	10 min	RT
Waschen: Puffer 1	1x	10 sec	RT
Inkubation mit Konjugat: Anti-DIG-Antikörper-AP: [1/5000] (gelöst in 40 ml Puffer 1)	1x	10 min	RT
Entfernen des Konjugates: Puffer 1	5x	2 min	RT
Äquilibrieren mit Färbelösung: Puffer 3 = 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂	1x	5 min	RT
Färbung/Entwicklung: 90 µl NBT und 70 µl X-Phosphat / 20 ml Puffer 3	1x	variabel	RT
Stoppen der Farbreaktion: Puffer 4 = 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA	1x	5 min	RT

DIG: Digoxigenin, NBT: Nitroblautetrazoliumchlorid, RT: Raumtemperatur; SDS: Natrium-Dodecyl-Sulfate, SSC: Standard Saline Citrate, Anti-DIG-AK-AP: Anti-DIG-Antikörper-Alkalische Phosphatase; X-Phosphat: 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, 4-Toluidin-Salz

3.2.5 Entwicklung der eingesetzten Gensonden

Gensonden für die Spezies *L. acidophilus*, *L. johnsonii* (*L. acidophilus*-Gruppe) und für *L. zeae*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* (*L. casei*-Gruppe) wurden unter Zuhilfenahme der über das Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - zuletzt besucht am 01.07.2001) verfügbaren Datenbank der *NCBI-Library/GenBank* (National Center for Biotechnology Information) selbst entwickelt. Partielle DNA-Sequenzen der für die 16S rRNA codierenden Gene der jeweiligen Laktobazillen-Spezies wurden zunächst ermittelt (*nucleotide query*, s. Anhangsabb. 1), wobei die Sequenzen auf den in Tab. 20 aufgeführten Referenzstämmen basieren.

Tab. 20: *Lactobacillus*-Spezies bzw. Typ-/ Referenzstämmen, deren 16S rRNA-Sequenz als Grundlage für die Gensondenentwicklung verwendet wurde

Spezies	Sequenzierter Stamm	NCBI/GenBank Zugangs-Nr.
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356 ^T	M58802
<i>L. gasseri</i>	DSM 20077 (ATCC 19992)	—*
<i>L. johnsonii</i>	BMF 6Lb6	M99704
<i>L. zeae</i>	ATCC 15820 ^T	D86516
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	JCM 8130	D79212
<i>L. rhamnosus</i>	ATCC 7469 ^T	D16552

ATCC: American Type Strain Culture Collection, Rockville, MD, USA; BMF: Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel, Deutschland; DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland; JCM: Japan Collection of Microorganisms, Hiroshima, Japan; NCBI: National Center for Biotechnology Information; ^T: Typstamm; *: eigene Sequenzierungsdaten

Nachfolgend wurden die zuvor ermittelten DNA-Sequenzen der untersuchten *Lactobacillus*-Spezies (bzw. deren Typ-/Referenzstämmen) unter Verwendung des ebenfalls über das *NCBI* verfügbaren *BLAST*-Programm *Advanced BLAST* Version 2.0 (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, ALTSCHUL et al., 1990 - zuletzt besucht am 01.07.2001) mit sämtlichen in der *NCBI*-Datenbank verfügbaren prokaryotischen 16S rRNA-Sequenzen verglichen. Als Zielsequenzen für die Gensonden wurden Sequenzabschnitte mit kennzeichnenden Unterschieden, sogenannten *mismatches* (= unterschiedliche Nukleotidabfolgen), der abzugrenzenden Spezies ausgewählt.

Als zusätzliche Kriterien bei der Auswahl der Gensonden wurden die Länge des jeweiligen Basensequenzabschnittes sowie der Guanin-Cytosin-Gehalt berücksichtigt, da beide Faktoren die Hybridisierungstemperatur beeinflussen.

Sequenzabschnitte mit möglichst vielen *mismatches* wurden anschließend mit einem weiteren Computer-Programm (*Probe Match / Check Probe* Version 2.1r3 - Internet-Adresse: <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/analyses.html> - zuletzt besucht am 01.07.2001) auf Einsetzbarkeit als Gensonde überprüft (s. auch Anhangsabb. 2). Das Programm war vom *RDP (Ribosomal Database Project)* (MAIDAK et al., 1997) der Michigan State University (USA) entwickelt worden und ermöglicht es, die Spezifität der zu prüfenden Gensonde für sämtliche in dieser Datenbank geführten Mikroorganismen, bzw. deren für die 16S rRNA codierenden Basensequenzabschnitte, zu ermitteln. Ferner prüft dieses Programm, ob gewisse Bereiche der Gensonde zu sich selbst komplementär sind, was die Bindung der Sonde an die Zielsequenz beeinträchtigen oder gar unmöglich machen würde.

Für die Hybridisierungen bei sondenspezifischen Temperaturen wurde die Dot Blot-Technik im Mikrotiter-Format angewandt (Abb. 1 / Anhangsabb. 3). Das Dot Blot-Verfahren bietet die Möglichkeit, die DNA von 96 Stämmen pro Filter in einem Hybridisierungsansatz zu untersuchen. Die Synthese der am 3' -Ende mit Digoxigenin markierten Gensonden wurde von der MWG Biotech AG, D-85560 Ebersberg, als Auftragsarbeit durchgeführt. Weiterführende Angaben zu den eingesetzten Sonden sind in Tab. 17 und Anhangstab. 4 aufgeführt.

3.2.5.1 Entwicklung der *L. gasseri*-Sonde

Da die mit den Sequenzierungsdaten des *L. gasseri*-Typstammes entwickelte *L. gasseri*-Sonde zu unspezifischen Ergebnissen in Form von falsch positiven Reaktionen führte, wurde auf der Grundlage einer ebenfalls von der MWG Biotech AG als Auftragsarbeit durchgeführten partiellen Sequenzanalyse der 16S rRNA des 1960 von REUTER aus Faeces isolierten *L. gasseri*-Stammes DSM 20077 bzw. ATCC 19992 mit der PCR-Technik eine weitere Gensonde selbst hergestellt.

Die für die Amplifikation des zu sequenzierenden 16S rRNA-Abschnitts eingesetzten Primer (Lb-RNA-16F und Lb-RNA-1257R) wurden mit dem Primer-Suchprogramm des *Whitehead Institute for Biomedical Research* (ROZEN und SKALETSKY, 1996, 1997) ermittelt. Als Grundlage für die Primer-Suche dienten die Sequenzierungsdaten des

L. gasseri-Typstammes (DSM 20243^T), die in der Datenbank des *NCBI/GenBank* (BENSON et al., 1999) verfügbar sind (Accession-No.: M58820). Die Ergebnisse der von der MWG Biotech AG durchgeführten Sequenzanalyse ermöglichten dann unter Einsatz eines weiteren Primers (Lb-RNA-124R) die Synthese einer speziell auf den *L. gasseri*-Stamm DSM 20077 bzw. ATCC 19992 zielgerichteten Sonde mit der PCR-Technik. Auch für diese Gensonde wurde ein Sequenzbereich mit einer maximalen Anzahl von Unterschieden zu den abzugrenzenden Laktobazillen-Spezies ausgewählt. Die Reaktionsansätze für die PCR/Digoxigenin-Markierung, die Sequenzen der eingesetzten Primer sowie die verwendeten Thermocycler-Programme sind in den Tabellen 21 bis 23 aufgeführt. Tab. 21: Reaktionsansatz (50 µl) für die PCR-Amplifikation eines partiellen 16S rRNA-Abschnittes von *L. gasseri* (DSM 20077 / ATCC 19992)

A. bidest.	38,3 µl
10x Polymerase-Puffer (Mg ²⁺ -frei)	5 µl
50 mM Mg ²⁺	3,0 µl
10 mM dNTP	0,8 µl
Lb-RNA-16F* (5'- GTG CCT AAT ACA TGC AAG TC-3')	0,4 µl
Lb-RNA-1257R* (5'-TGT AGC CCA GGT CAT AAG GG-3')	0,4 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Template-DNA / <i>L. gasseri</i> (DSM 20077 / ATCC 19992)	2,0 µl
Mineralöl	1 Tropfen

*: für die PCR-Amplifikation des partiellen 16S rRNA-Abschnittes eingesetzte Primer

Tab. 22: Reaktionsansatz (100 µl) für die PCR-Amplifikation der *L. gasseri*-Sonde mit Digoxigenin-Markierung

A. bidest.	71 µl
10x Polymerase-Puffer (Mg ²⁺ -frei)	10 µl
50 mM Mg ²⁺	6,0 µl
10 mM dATP	1,0 µl
10 mM dGTP	1,0 µl
10 mM dCTP	1,0 µl
10 mM dTTP	0,65 µl
1 mM DIG-11-dUTP	3,5 µl
Lb-RNA-16F* (5'- GTG CCT AAT ACA TGC AAG TC-3')	0,8 µl
Lb-RNA-124R* (5'-TTA CCC ACG TGT TAC TCA CC-3')	0,8 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Template-DNA** / <i>L. gasseri</i> (DSM 20077 / ATCC 19992)	4,0 µl
Mineralöl	1 Tropfen

*: für die PCR-Amplifikation der *L. gasseri*-Sonde eingesetzte Primer, **: die Template DNA-Isolierung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben

Tab. 23: Thermocycler-Programm für die PCR-Amplifikation der partiellen 16S-rRNA-Sequenz von *L. gasseri* (DSM 20077 / ATCC 19992) und für die DIG-markierte *L. gasseri*-Sonde*

Wiederholungen	Dauer	Temperatur
40 x	10 min	95°C
	30 sec	94°C
	60 sec	68°C / 64°C*
	60 sec	72°C
1 x	6 min.	72°C

*: Thermocycler-Programm für die PCR-Amplifikation der DIG-markierten *L. gasseri*-Sonde mit Ausnahme der Annealing-Temperatur identisch