

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Von an DD erkrankten Rindern aus 7 landwirtschaftlichen Milchviehbeständen aus den Ländern Brandenburg, Sachsen-Anhalt und Bayern wurden von typischen Läsionen im palmaren und plantaren Bereich oberhalb des Kronsaumes am Übergang von der behaarten zur unbehaarten Haut Biopate entnommen. Bereits am Tag der Entnahme wurde mit den molekulargenetischen Untersuchungen begonnen. Die Isolierung von Treponemen aus den Biopateproben wurde zur selben Zeit eingeleitet. Alle Biopate wurden von Juli bis Oktober 1996 entnommen.

3.1.2 Geräte

Schüttelinkubator	HT, Infors AG, Schweiz
Brutschränke	Heraeus Instruments
Hybridisierungsöfen	Micro-4, Hybaid
Elektrophoresekammern	MWG-Biotech
Elektronenmikroskop	Philips EM 400
Filme	Kodak Ektrachrome HC 400
Kühlzentrifuge	Heraeus Labofuge 400R
Mikroskop für die Dunkelfeldmikroskopie	Olympus BH2-RFCA, Olympus
Mikroskop für die <i>In situ</i> -Hybridisierung	Epifluoreszenz-Axioskop
PCR-Gerät	BIOMETRA Trio-Thermoblock, MWG
pH-Meter	Mikroprozessor pH-Meter, WTW
Pipetten	Eppendorf, Varipette
Sterilwerkbank	Antair BSK
Sequenziergerät	LI-COR dna sequencer model 4000, MWG- Biotech
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 C
Transilluminator	Eagle Eye™ Stratagene
Vakuum-Blot-System	Membranpumpe, Dot Blot 96, Biometra

3.1.3 Chemikalien, Nährmedien und Lösungen

Chemikalien

– Folgende “Testkits” wurden von nachfolgenden Firmen bezogen:

SDS Gel Casting Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Gene Amp</i> ®	PERKIN ELMER, Weiterstadt
DIG Luminescent Detection Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Life Science, Freiburg

– Enzyme und Primer stammten von folgenden Firmen:

Boehringer Mannheim (Mannheim), Gibco BRL (Karlsruhe), MWG-Biotech (Ebersberg)

Nährmedien

- TB-Medium (Terrific Broth)
 - 12 g Bacto-Trypton
 - 24 g Bacto-Hefeextrakt
 - 4 ml Glycerin
 - ad 900 ml Aqua bidest.,
 - 15 min 121 °C, anschließend Zugabe von
 - 50 ml 170 mM KH₂PO₄ (autoklaviert) und
 - 50 ml 720 mM K₂HPO₄ (autoklaviert).

- TB-Agarplatten
 - 1 l TB-Medium
 - 17 g Agar.

- TB-Agar-Platten (X-Gal-IPTG-Ampicillin)
 - 1 l TB-Medium
 - 17 g Agar,
 - 15 min 121 °C, Abkühlen auf 45 °C, anschließend Zugabe von
 - X-Gal (Endkonzentration 0,004 %),
 - IPTG (Endkonzentration 0,5 mM),
 - Ampicillin (50 mg/l).

- | | | | |
|---|-----------------------------------|--|--|
| – OMIZ-Pat Medium
(AnaeroGen™, Oxoid, Wesel) | | nach WYSS (1992),
vor der Verwendung Vorreduzierung für 3-4
Stunden bei 37 °C im anaeroben Milieu. | |
| – OMIZ-Pat-Agarplatten | 500 ml
17 g | Aqua bidest.
Agar, | |
| | | 15 min 121 °C, Abkühlen auf 45 °C,
anschließend Zugabe von, | |
| | 500 ml | 2x konzentriertes OMIZ-Pat-Medium. | |
| – SOC-Medium | 20 g
5 g
0,5 g
ad 950 ml | Trypton
Hefeextrakt
NaCl
Aqua bidest., | |
| | 10 ml | 250 mM KCl,
anschließend Einstellen mit NaOH auf einen
pH Wert von 7,0 | |
| | ad 980 ml | Aqua bidest., | |
| | | 15 min 121 °C, anschließend Zugabe von | |
| | 10 ml | 1 M MgCl ₂ (autoklaviert) | |
| | 10 ml | 2 M Glucose (filtriert). | |

Antibiotikazusätze für Medien und Nährböden

- | | |
|--------------|----------|
| – Ampicillin | 50 mg/l |
| – Rifampicin | 100 mg/l |
| – Fosfomycin | 1 mg/l |

Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach dem Autoklavieren und anschließender Abkühlung auf 45 °C.

Lösungen

3.1.3.1 Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA

- | | | | |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------------|--------|
| – Lösung 1 (Lagerung bei 4 °C) | 25 mM
10 mM
50 mM | Tris-HCl
EDTA
Glucose. | pH 8,0 |
| – Lösung 2 (frisch angesetzt) | 0,2 M
1,0 % | NaOH
SDS. | |

- | | | | |
|--------------------------------|----------|------------------|--|
| – Lösung 3 (Lagerung bei 4 °C) | 60,00 ml | 5 M Kaliumazetat | |
| | 11,50 ml | Eisessig. | |

Für die Lösungen 1-3 wurde Aqua bidest. verwendet.

3.1.3.2 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese (DNA)

- | | | | |
|----------------------------|------------|----------------|--------|
| – 10x TBE | 108 g | Tris-Base | |
| | 55 g | Borsäure | |
| | 40 ml | 0,5 M EDTA | pH 8,0 |
| | ad 1000 ml | Aqua bidest. | |
| – 1x TBE | 100 ml | 10x TBE | |
| | ad 1000 ml | Aqua bidest. | |
| – Stop-Lösung | 9,5 ml | Formamid | |
| | 0,4 ml | 500 mM EDTA | pH 8,0 |
| | 5,0 mg | Bromphenolblau | |
| | 5,0 mg | Xylencyanol FF | |
| | 0,1 ml | Aqua bidest. | |
| – Agarose | 1-1,2 g | Agarose | |
| | ad 100 ml | 1x TBE. | |
| – Ethidiumbromidlösung 1%. | | | |

3.1.3.3 Lösungen für die Gelelektrophorese (Proteine)

Verwendung des SDS Gel Casting Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg)

- | | | | |
|-----------------------|--------|----------|--------|
| – SDS-Lauf-Puffer 10x | 0,25 M | Tris | |
| | 1,92 M | Glycine | |
| | 1 % | SDS. | |
| – Trenngelpuffer 4X | 1,5 M | Tris-HCl | pH 8,8 |
| | 0,4 % | SDS | |
| | 0,4 % | TEMED. | |
| – Sammelgelpuffer 4X | 0,5 M | Tris-HCl | pH 6,8 |
| | 0,4 % | SDS | |
| | 0,4 % | TEMED. | |

– Acrylamid	30 % 0,8 %	Acrylamid Bis-acrylamid.	
– Probenpuffer 2X	0,125 M 4 % 20 % 2 mM 0,02 %	Tris-HCl SDS Glyzerol EDTA pH 8,0 Bromphenolblau.	pH 6,8

Polyacrylamid-Gellösungen:	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid	3,3 ml	0,44 ml
Trenngelpuffer 4X	2,5 ml	—
Sammelgelpuffer 4X	—	0,83 ml
H ₂ O	4,1 ml	2,06 ml
10 % APS	0,1 ml	0,02 ml
Endvolumen	10 ml	3,35 ml

– Coomassie blue-Färbelösung:	6 Tabletten (25 mg) 24,5 ml ad 500 ml	Coomassie blue R250 Perchlorsäure Aqua bidest.
-------------------------------	---	--

3.1.3.4 Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

– dNTP	10 mM	each dNTP, PCR-Nucleotide Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Boehringer Mannheim.	
– 10 x PCR buffer II ¹	10 mM 50 mM	Tris-HCl KCl.	pH 8,3
– <i>AmpliTaq</i> ® DNA Polymerase ¹	5 U/μl.		
– MgCl ₂ Solution ¹	25 mM.		
– Mineralöl.			

¹ *Gene Amp*®, PERKIN ELMER, Roche Molecular Systems, Weiterstadt

3.1.3.5 Lösungen für die Dot blot-Hybridisierung

Zusammensetzung der Lösungen unter Verwendung des DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim)

– Maleinsäure-Puffer, pH 7,5	0,1 M 0,15 M	Maleinsäure NaCl.	
– Blocking stock solution (10%ig)	20 g	Blocking Reagenz	
ad	200 ml	Maleinsäure-Puffer.	
– 10%iges SDS	20 g	SDS	
ad	200 ml	Aqua. bidest.	
– 20 x SSC	300 ml	1 M Na-citrat	
ad	1000 ml	NaCl.	
– Standard-Hybridisierungspuffer	1,0 % 0,1 % 0,02 % 5x	Blocking Reagenz 10 % N-Lauroylsarkosin 10 % SDS SSC.	
– Waschpuffer (WP) 0	5x 0,2 %	SSC SDS.	
– Waschpuffer (WP) 1	2x 0,1 %	SSC SDS.	
– Waschpuffer (WP) 2	0,1x 0,1 %	SSC SDS.	
– Waschpuffer (WP) 3	6x 0,2 %	SSC SDS.	
– Blocking Working Solution (je Reaktion 12,5 ml)	2,5 ml 10,0 ml	Blocking stock solution Maleinsäure-Puffer.	
– Detektion Puffer 3 pH 9,5	0,1 M 0,1 M	Tris-HCl NaCl,	pH 8,0
		anschließend mit NaOH auf pH 9,5 einstellen.	
– Substratlösung	2 ml 13 µl	Detektion Puffer 3 CSPD.	

- | | | | |
|--------------------|-------|------|--|
| – Stripping-Puffer | 0,2 M | NaOH | |
| | 0,1 % | SDS. | |

Zur Herstellung aller Lösungen wurde Aqua bidest. verwendet.

3.1.3.6 Lösungen für die DNA-Sequenzanalyse

- | | | | |
|------------------|------------|--|--|
| – DMSO-Lösung | 18 µl | 50 % DMSO | |
| | 234 µl | 2 % DMSO | |
| | 288 µl | H ₂ O. | |
| – 10x TBE-Puffer | 108,0 g | Tris Base | |
| | 55,0 g | Borsäure | |
| | 7,4 g | Na ₂ EDTA•2 H ₂ O. | |
| – 1x TBE-Puffer | 100 ml | 10x TBE-Puffer | |
| | ad 1000 ml | Aqua bidest. | |

3.1.3.7 Lösungen für die Fluoreszenz *In situ*-Hybridisierung (FISH)

- | | | | |
|-------|--------------|--|--|
| – PBS | 8,0 g | NaCl | |
| | 0,2 g | KCl | |
| | 3,63 g | Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O | |
| | 0,24 g | KH ₂ PO ₄ | |
| | ad 1000,0 ml | Aqua bidest., | |

auf pH 7,2-7,4 mit HCl einstellen.

- | | | | |
|-------------------------|---------|-----------|--------|
| – Hybridisierungspuffer | 0,9 M | NaCl | |
| | 20,0 mM | Tris-HCl | pH 7,2 |
| | 0,01 % | SDS | |
| | 0-20 % | Formamid. | |

3.1.3.8 Weitere verwendete Lösungen und Puffer

- | | | | |
|---------------|--------|----------|---------|
| – Lysispuffer | 500 mM | Tris-HCl | pH 9,0 |
| | 20 mM | EDTA | pH 8,0 |
| | 10 mM | NaCl | |
| | 1 % | SDS. | |
| – TE-Puffer | 10 mM | Tris | |
| | 1 mM | EDTA | pH 8,0. |

Tabelle 2: EMBL-Registrierungsnummer der 16S rRNA-Sequenzen

Spezies	EMBL-Registrierungsnummer
<i>Treponema medium</i>	Y09959
<i>Treponema phagedenis</i>	M57739
<i>Treponema denticola</i>	M71236
<i>Treponema pallidum</i>	M88726
<i>Spirocheta sp.</i>	M71240
<i>Treponema maltophilum</i>	X87140
<i>Treponema pectinovorum</i>	M71237
<i>Treponema bryantii</i>	M57737
<i>Treponema saccharophilum</i>	M71238
<i>Treponema sp.</i>	M59294
<i>Treponema succinifaciens</i>	M57738
<i>Spirocheta aurantia</i>	M57740
<i>Spirocheta isovalerica</i>	M88720
<i>Borrelia burgdorferi</i>	L36160
<i>Borrelia anserina</i>	M72397
<i>Borrelia hermsii</i>	M60968
<i>Brachyspira aalborgi</i>	Z22781
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	M57742
<i>Brachyspira innocens</i>	M57744
<i>Leptonema illini</i>	Z21632
<i>Leptospira biflexa</i>	Z12821
<i>Leptospira interrogans</i>	X17547
<i>Escherichia coli</i>	J01859
rekombinante Klone	EMBL-Registrierungsnummer
DDKL-3 *	Y08893
DDKL-4 *	Y08894
DDKL-12*	Y08895
DDKL 13 *	Y08896
DDKL-20*	Y08897

* (CHOI et al., 1997)

3.1.5 Oligonukleotid-Sonden und -Primer

Im Anschluß sind die Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Neben den allgemein üblichen Abkürzungen wurden die folgenden Buchstabenkürzel für nicht näher spezifizierte Basenpositionen verwendet: M = C/A; R = A/G; Y = C/T; K = G/T.

Tabelle 3: Oligonukleotidsequenzen für die Dot blot-Hybridisierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	<i>E. coli</i> 16S rRNA-Position
DDK2 #	GGCTTTATCCGTATAAGCGTATTC	1246-1267
DDK3 #	CCCTTATTCACATGATTACCGT	481-502
DDK12 #	ACCCTCTCCACAAGAATATAAG	182-204
DDK20 #	GGGCTCCTATCTAGGCGAAG	213-233
TRE I ‡	ACGCAAGCTCATCCTCAAG	220-238
TRE II ‡	GCTCTTTTCCTCATTTACCTTTAT	69-93
TRE IV ‡	CGGTCACATTCGGTATTACCTACT	213-235
DDK5/3 †	CCTCACAGCTCTCTAACCTC	184-204

CHOI et al., 1997
 ‡ MOTER et al., 1998
 † SCHRANK et al., 1999

Tabelle 4: Oligonukleotid-Primer für die DNA-Sequenzanalyse

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	<i>E. coli</i> 16S rRNA-Position	Annaelings-temperatur
SPU1 +	GTYTAAAGCATGCAAGTCG	46-64	55 °C
RTU2 *	TGCCTCCCGTAGGAGTYTGG	353-334	66 °C
RTU5 *	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	926-907	55 °C
RTU6 *	ATTGTAGCACGTGTGTMGCCC	1240-1220	63 °C
TPU2 +	CCARACTCCTACGGGAGGCA	334-353	66 °C
TPU5 +	AAACTYAAAKGAATTGACGG	907-926	55 °C
M13(24)R ^	AACAGCTATGACCATG	universelle Zielregion	55 °C
M13 (20)F ^	GTAAAACGACGGCCAGT	universelle Zielregion	55 °C

* RTU - Strangprimer für konservierte Bereiche der 16S rRNA-Gene
 + TPU - Gegenstrangprimer für konservierte Bereiche der 16S rRNA-Gene
 ^ universelle Sequenzierprimer

Tabelle 5: Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	<i>E. coli</i> 16S rRNA-Position
RE-SPU1*	CCGAATTCGTCGACAACGTYTTAAGCATGCAAGTCG	46-64
RTU8 ¹	AAGGAGGTGATCCA KCCRCA	1541-1522
RE-RTU8*	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCA KCCRCA	1541-1522
TPU1 ¹	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	8-28

1 Einsatz auch als biotinylierter Primer (am 5' Ende)

* Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease für die Klonierung (WEISBURG et al., 1991), Sequenz CCGAATTCGTCGACAAC = enthält Erkennungssequenzen für *EcoRI* und *SalI* und Sequenz CCCGGGATCCAAGCTT = enthält Erkennungssequenzen für *HindIII*, *BamHI* und *XmaI*.

3.2 Methoden

3.2.1 Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Die Hautbioplate bildeten die Grundlage für die Durchführung der verschiedenen Verfahren. Diese Bioplate wurden kurz über dem Bunsenbrenner abgeflammt und danach mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke (0,5 x 0,5 mm) zerschnitten. Das zerkleinerte Material wurde je Probe in 3-5 ml vorreduziertes OMIZ-Pat Medium gegeben und für eine Stunde aerob mit einer Schüttelbewegung von 200 rpm bei 37 °C inkubiert. Der Überstand war das Ausgangsmaterial für den Kulturversuch.

Von den Hautbioplaten Nr. 12-14 wurden zusätzlich je Probe ein 1x1 cm großes Stück zerschnitten, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, das anschließend mit Lysispuffer (siehe Punkt 3.1.3.8.) bis zum Rand aufgefüllt wurde. Dem verwendeten Lysispuffer war Proteinase K in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugesetzt. Nach der Lysis wurde dieses Material für die Erstellung einer 16S rDNA-Genbank verwendet.

3.2.2 DNA-Isolierung

– DNA-Extraktion aus Treponemenreinkulturen

Jeweils 10 ml OMIZ-Pat-Medium wurden mit 300 µl einer gut bewachsenen Treponemenvorkultur beimpft. Die Treponemenreinkultur inkubierte ca. 3-5 Tage je nach Spezies anaerob (AneroGen™, Oxoid) bei 37 °C. Das Kulturröhrchen wurde anschließend zentrifugiert (1305 g, 4 °C, 10 min) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde mit 400 µl Lysispuffer (siehe Punkt 3.1.3.8) und 40 µl Proteinase K (ca. 20 mg/ml) resuspendiert und 1-2 Stunden bei 52 °C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender DNA-Fällung wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer (siehe Punkt 3.1.3.8) aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

– DNA-Extraktion aus Klauenbioptatmaterial

Das gemäß 3.2.1 vorbereitete 15 ml Falcon-Röhrchen wurde über Nacht bei 53 °C inkubiert und danach zentrifugiert (1305 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde abpipettiert und in Eppendorfgefäße (2 ml) verteilt. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender DNA-Fällung wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

– Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Mini-Präparation

TB-Medium (jeweils 3 ml, 50 mg/l Ampicillin) wurden mit plasmidhaltigen *E. coli*-Kolonien beimpft, über Nacht aerob bei 37 °C unter schütteln inkubiert (200 rpm) und danach zentrifugiert (1305 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde dekantiert und die restliche Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde mit 200 µl Lösung 1 resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. Dazu wurden 400 µl Lösung 2 gegeben, das Gefäß 5x geschwenkt und kurz auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 300 µl Lösung 3 wurde das Eppendorfgefäß einmal geschwenkt und inkubierte anschließend 5 min im Eisbad. Nach dieser Zeit wurde das Gefäß zentrifugiert (13792 g, 4 °C, 5 min), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) pipettiert und mit 0,6 Volumenteilen gekühltem Isopropanol versetzt. Einer

Inkubation von 2 min bei Raumtemperatur folgte eine weitere Zentrifugation (13792 g, 4 °C, 10 min). Das erhaltene Pellet wurde in der Speedvac etwa 10 min lang im Vakuum getrocknet und dann in 25 µl TE-Puffer gelöst. Der Lösung wurden anschließend RNase in einer Endkonzentration von 5 U zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde eine DNA-Fällung durchgeführt und anschließend das Pellet in 25 µl TE-Puffer gelöst.

Die isolierten Plasmide wurden mit Restriktionsendonukleasen (siehe Punkt 3.2.3) geschnitten und auf ein Agarosegel (1,2%) aufgetragen, um so die Größe der Fragmente zu kontrollieren.

(Alle verwendeten Lösungen siehe unter 3.1.3.1)

– **Phenol/Chloroform-Extraktion**

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion wurde durchgeführt, um Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen. Die Nukleinsäurelösungen wurden mit gleichem Volumen Phenol versetzt, für 2 min geschüttelt und danach zentrifugiert (13792 g, Raumtemperatur, 10 min). Die obere Phase ohne die weiße Interphase wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Anschließend wurde dieser Vorgang mit der Zugabe des gleichen Volumens Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) und in einem weiteren Schritt nur mit Chloroform wiederholt. Aus der erhaltenen oberen Phase wurde anschließend die DNA gefällt.

– **DNA-Fällung**

Zur Fällung der DNA aus einer Lösung wurde diese mit 2 Volumen Ethanol (100%, reinst, eiskalt) und 1/10 Volumenteile Natriumacetatlösung (3M, pH 4,9) versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach anschließender Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in der Speedvac im Vakuum für 10 min getrocknet und in TE-Puffer (Punkt 3.1.3.8) resuspendiert.

3.2.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*I wurden Plasmid-DNA, aufgereinigte PCR-DNA und der Plasmidvektor pUC19 gespalten. Der Ablauf erfolgte nach folgendem Reaktionsschema:

	PCR-DNA (16 µl) Plasmidvektor pUC19 (4 µg)	Plasmid-DNA	
DNA	x µl	2 µl	
10 x Puffer	2 µl	1 µl	react 3; Gibco BRL
<i>Bam</i> HI	10 U	2 U	10 U/µl; Gibco BRL
<i>Sal</i> I	10 U	2 U	10 U/µl; Gibco BRL
Aqua bidest.	ad 20 µl	ad 10 µl	

Die Spaltungszeit betrug eine Stunde bei 37 °C.

3.2.4. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese (MANIATIS et al., 1982)

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung handelt es sich um ein kontinuierliches Trennverfahren von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe unter Verwendung eines Agarosegels.

Agarose (1,2 g) wurde durch Aufkochen in 100 ml 1x TBE-Puffer (Punkt 3.1.3.2) gelöst. Nach Zugabe von 1 µl einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung wurde die Gellösung danach vorsichtig in eine mit Klebeband abgedichtete Gelkammer gegossen, in der sich zwei Probenaschenkämme mit einer Taschenbreite von 0,5 cm befanden. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Kämme vorsichtig entfernt, das Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer gelegt, die mit 1x TBE-Puffer gefüllt war und das Gel vollständig bedeckte.

Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden anschließend mit Probenladungspuffer (Stop-Lösung, ca. 1/3 Volumen der DNA-Probe, Punkt 3.1.3.2) gemischt und in die Probenaschen pipettiert. An die Gelkammer wurde ein elektrisches Feld angelegt, so daß die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung Anode wanderten. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 120 V für 45 min. Danach wurde das ethidiumbromidgefärbte Gel mit Hilfe eines Transilluminators (Eagle Eye™

Stratagene, Heidelberg) visualisiert und anschließend fotografiert.

Bei jeder Elektrophorese wurde ein DNA-Molekulargewichtsstandard mitgeführt, um eine Größenermittlung der DNA-Fragmente zu ermöglichen.

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden Nukleinsäuresequenzen *in vitro* enzymatisch mittels zweier Primer und Taq-DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert.

Als Template-DNA (Matrizen-DNA) wurden dafür chromosomale als auch Plasmid-DNA verwendet. Die Primer sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die an komplementäre DNA-Einzelstrangbereiche binden. Die Wahl geeigneter Primer ermöglichte einen Einbau von Restriktionsschnittstellen und nichtradioaktiven Markierungen (z.B. Biotin am 5'-Ende).

– Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (auf Eis pipettieren):

25 bzw. 30	pmol	je Reaktionsprimer
10,0	µl	10x PCR Buffer II
20,0	nmol	dNTPs (Desoxynukleotidgemisch)
2,5	U	Ampli Taq-DNA-Polymerase
2,0	mM	MgCl ₂ (25mM Stammlösung)
1-3	µl	Template-DNA
ad	100,0 µl	Aqua bidest.

Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit 40 µl Mineralöl überschichtet. Nach kurzem Schütteln des PCR-Ansatzes wurde kurz hochtourig zentrifugiert und in den auf 95 °C vorgeheizten BIOMETRA Trio-Thermoblock (BIOMETRA, Göttingen) gestellt.

– Programm des Thermocyclers:

Schritt 1:	Denaturierung der doppelsträngigen DNA	95 °C 5 min
Schritt 2:	Denaturierung der doppelsträngigen DNA	95 °C 1 min
Schritt 3:	Anlagerung der Primer an den DNA-Einzelstrang	
	Annealing	x °C* 1 min
Schritt 4:	Extension - Amplifikation	72 °C 2 min
	Schritt 2- 4: 30 x	
Schritt 5:	Extension	72 °C 5 min

Lagerung des PCR-Produktes bei 4 °C.

- * Abhängigkeit der DNA-Annealing-Temperatur vom verwendeten Primer, Berechnung aus der Länge und dem GC-Gehalt der Primer, $T_m = 69,3 + 0,4 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/\text{Länge des Primers}$ (T_m = Schmelztemperatur des Oligonukleotids).

Bezeichnung	Annealing-Temperatur
RE-SPU1	55 °C
RTU8	59 °C
RE-RTU8	55 °C
TPU1	59 °C

Nachfolgend wurde eine Agarosegelelektrophorese zur Ermittlung der Fragmentgröße durchgeführt (siehe Punkt 3.2.4).

3.2.6 DNA-Elutions- und Reinigungstechniken

3.2.6.1 Elution von DNA-Fragmenten mittels QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden)

Die amplifizierten rDNA-Fragmente und der Plasmidvektor pUC19 wurden über Agarosegelelektrophorese (1%) aufgetrennt, die entsprechenden Banden aus dem Gel geschnitten und mit dem Gelextraktionskit (QIAquick Gel Extraktions Kit, Qiagen, Hilden) eluiert. Das Vorgehen ist nachfolgend beschrieben:

Zu einem Volumenteil Gel wurden 3 Volumenteile Puffer QX1 gegeben (100 mg ~ 100 µl). Anschließend wurde im Wasserbad 10 min bei 50 °C inkubiert, wobei der

Ansatz alle 2-3 min geschüttelt wurde. Dem Gelvolumenteil entsprechend wurde 100%iges Isopropanol danach hinzugegeben und gemischt. Dieses Gemisch wurde in einer QIAquick-Säule zentrifugiert (13792 g, Raumtemperatur, 1 min). Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule anschließend 2x gewaschen. Der erste Waschschrift wurde mit 0,5 ml Puffer QX1 und der zweite Waschschrift mit 0,75 ml Puffer PE (13792 g, Raumtemperatur, 1 min) durchgeführt. Nach diesen Waschvorgängen wurde die QIAquick-Säule nochmals zentrifugiert (13792 g, Raumtemperatur, 1 min). Anschließend wurden mit 50 µl Aqua bidest. die DNA-Fragmente eluiert. Nach anschließender Fällung (3.2.2) wurde die DNA in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen.

3.2.6.2 DNA-Reinigung mittels Dynabeads®

Mittels Dynabeads® (Dynabeads® M-280 Streptavidin, DYNAL, Hamburg) wurden die am 5'-Ende mit Biotin markierten einzelsträngigen DNA-Matrizen vom Gesamt-PCR-Produkt getrennt.

Dazu wurde das PCR Produkt (10 µl) mit Dynabeads® versetzt, kurz geschüttelt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Eppendorfgefäße wurden in einen magnetischen Partikelkonzentrator (MPC) gestellt, der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Partikel wurden mit Waschpuffer B&W gewaschen und danach zur Denaturierung der Doppelstrang-DNA mit 0,1 M NaOH für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads® noch 3x gewaschen. Als Waschpuffer dienten folgende Lösungen: (1) 0,1 M NaOH, (2) Waschpuffer B&W und (3) TE-Puffer. Nach jedem Waschschrift wurde das Eppendorfgefäß in den MPC gestellt, um die Dynabeads® von der Lösung zu trennen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden mit dem gleichen Volumen wie das PCR-Produkt durchgeführt.

Im Anschluß wurden die Partikel in 22,5 µl 2%iger wäßriger DMSO-Lösung aufgenommen, um anschließend eine DNA-Sequenzanalyse durchzuführen.

(Die Zusammensetzung alle verwendeten Lösungen wurde unter Punkt 3.1.3.8 beschrieben.)

3.2.7 Klonierung amplifizierter rRNA-Genfragmente

– Spaltung der PCR-Produkte mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung der PCR-Produkte (SPU1-RERTU8; ca. 1500 bp; mittels Gelextraktionskit eluiertes PCR-Produkt, siehe Punkt. 3.2.6.1) erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*I. Anschließend wurde der Ansatz durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit nachfolgender DNA-Fällung gereinigt (3.2.2). Das DNA-Pellet wurde im Vakuum 10 min (Speedvac) getrocknet und in 20 µl Aqua bidest. resuspendiert.

– Spaltung des Plasmidvektors pUC19 mit Restriktionsendonukleasen

Der Plasmidvektor pUC19 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*I geschnitten und linearisiert. Der Reaktionsansatz (siehe 3.2.3) wurde elektrophoretisch auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die Vektor-DNA aus dem Gel geschnitten und eluiert (3.2.6.1), anschließend gefällt, im Vakuum getrocknet und in 20 µl Aqua bidest. resuspendiert (200 ng/µl).

– Ligation mit T4-Ligase

Die DNA-T4-Ligase stellt eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5' Phosphat-Ende eines Nukleotids und dem 3' OH-Ende des benachbarten Nukleotids her. Das Einbringen fremder DNA-Fragmente (Insert) in einen linearisierten Vektor (pUC19) wurde dadurch möglich.

Der linearisierte Plasmidvektor pUC19 und die Insert-DNA wurden in einem Verhältnis von 1 : 3 eingesetzt. Der Ligationansatz umfaßte 15 µl.

– Reaktionsansatz:	0,5 µl	Vektor-DNA (100 ng)
	10,0 µl	Insert-DNA (ca. 300 ng)
	1,0 µl	T4-DNA Ligase (1 U/µl, Gibco BRL)
	1,5 µl	10 x Ligase-Puffer (Gibco BRL)
	ad 15,0 µl	Aqua bidest.

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C im BIOMETRA Trio-Thermoblock (BIOMETRA, Göttingen) inkubiert und anschließend direkt zur Transformation eingesetzt.

– Transformation

Bei der Transformation wird DNA in eine Bakterienzelle eingeschleust. Aufgrund physiologischer Eigenschaften kompetenter Zellen können diese DNA-Matrizen besonders leicht aufnehmen. Die exogene DNA wird an Plasmide der Bakterien gekoppelt, wodurch die inkorporierte DNA repliziert und anschließend wieder reextrahiert werden kann.

Kompetente *E. coli*-Zellen (100 µl, Epicurian coli SURE 2 Supercompetent cells, Stratagene, Heidelberg) wurden mit 4 µl des Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für 30 sec wurde der Ansatz im Eisbad abgekühlt. Nach der Zugabe von 0,9 ml SOC-Medium folgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 Stunde unter schütteln bei 225-250 rpm. Anschließend wurden 100-200 µl des Transformationsansatzes auf TB-Agarplatten supplementiert mit Ampicillin, IPTG und X-Gal (siehe Punkt 3.1.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.8 Nichtradioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin sowie Fluoreszenzfarbstoffen

Die Oligonukleotide wurden nach Anweisung des Herstellers mit dem DIG Oligonucleotide 3`End Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) enzymatisch markiert. Am 3' Ende der Oligonukleotide wurde Digoxigenin-markierte ddUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim) bzw. Cy3-markierte dCTP (Fluoro Link™ Cy3™-dCTP, Amersham, Braunschweig) mit Hilfe der Terminalen Transferase angelagert. Bei der Digoxigeninmarkierung wurden 100 pmol Oligonukleotide verwendet, dagegen 200 pmol bei der Markierung mit Cy3-dCTP.

– Markierungsreaktionen:

DIG -ddUTP	Cy3 -dCTP	
4 µl	8 µl	tailing buffer
4 µl	8 µl	CoCl ₂ -Lösung (25 mM)
1 µl	2 µl	DIG-ddUTP-Lösung / Cy3-dCTP-Lösung
100 pmol	200 pmol	Oligonukleotid
1 µl	2 µl	Terminale Transferase (50 U/µl)
ad 20 µl	ad 40 µl	Aqua bidest.
- Inkubation 15 min bei 37 °C		
2,0 µl	4 µl	Stop-Lösung (siehe Punkt 3.1.3.2)
2,5 µl	5 µl	4M LiCl
75 µl	150 µl	Ethanol 100%
- Inkubation über Nacht bei -20 °C		
- Zentrifugation (13792 g, 4 °C, 10 min)		
- Überstand dekantieren		
50 µl	200 µl	Ethanol 70%-Waschen (13000 U/min, 4 °C, 10 min)
- 10 min im Vakuum (Speedvac) trocknen		
20 µl	15 µl	Resuspendierung in Aqua bidest.

Lagerung der markierten Oligonukleotide bei -20 °C.

Tabelle 6: Spezifität der verwendeten Oligonukleotidsonden
* rekombinante Klone (CHOI et al., 1997)

Oligonukleotidsonden für die Dot blot- und <i>In situ</i> -Hybridisierung	Identifizierung
TREPS	Treponemen-gattungsspezifisch
DDK2	DDKL-4* (<i>T. phagedenis</i> -ähnlich)
DDK3	DDKL-3* (<i>T. denticola</i> -ähnlich)
DDK12	DDKL-12*
DDK20	DDKL-20*
DDK5/3	Isolat DD5/3 ^T (<i>T. brennaborensis</i>)
TRE I	orale Treponemen der Gruppe I
TRE II	orale Treponemen der Gruppe II
TRE IV	orale Treponemen der Gruppe IV

3.2.9 Hybridisierungstechniken

3.2.9.1 Dot blot-Hybridisierung

Die Dot blot-Hybridisierung wurde für die Untersuchung der 16S rDNA-Genbank (Plasmid-DNA) eingesetzt.

– Dot blot

Der DNA-Transfer auf die Nylon-Membran (Hybond™-N, Amersham, Braunschweig) erfolgte durch Pipettieren. Die Plasmid-DNA wurde zuvor in einem Eppendorfgefäß (500 µl) 5 min bei 98 °C denaturiert. Nach schneller Abkühlung im Eisbad wurden 2-3 µl auf eine Nylon-Membran transferiert und die Nukleinsäuren auf der Membran nachfolgend mittels UV-Bestrahlung (Transilluminator, MWG-Biotech, Ebersberg; $\lambda = 312 \text{ nm}$) je 3 min pro Seite fixiert.

– Dot blot-Hybridisierung (Lösungen siehe Punkt 3.1.3.5):

Die Hybridisierungen wurden unter ständiger Rotation der Hybridisierungsröhren in einem Hybridisierungssofen (Hybaid-Micro-4, MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die Nylon-Membranen wurden für 30 min mit dem Standard-Hybridisierungspuffer (ca. 10 ml) prähybridisiert. Der Prähybridisierungspuffer wurde dekantiert und durch die Hybridisierungslösung (15 pmol Oligonukleotidsonde in 10 ml Standard-Hybridisierungspuffer) ersetzt. Nach 1½ Stunden Hybridisierung wurde diese Lösung in ein 50 ml Falcon-Gefäß gegossen und bei -20 °C für weitere Hybridisierungen aufbewahrt.

Die Temperaturen der Prä- und Hybridisierung waren identisch und abhängig von der verwendeten DIG-markierten Oligonukleotidsonde (siehe Tabelle 6,7).

Anschließend wurden zwei Waschschriffe (I und II) für je 15 min mit Waschpuffer durchgeführt. Die Wahl der Temperatur und der Waschpuffer waren von der verwendeten Oligonukleotidsonde abhängig (siehe Tabelle 7). Die Stringenz wurde durch die Temperatur und den Salzgehalt des Waschpuffers erreicht. Je höher die Temperatur und je niedriger die Salzkonzentration einer Waschlösung, desto stringenter sind die Waschbedingungen. Der Waschpuffer wurde zuvor auf die entsprechende Temperatur erwärmt.

– Nachweis gebundener Sonden:

Alle folgenden Schritte wurden bei 37 °C durchgeführt. Die Membranen wurden für 30 min mit der Blocking Working Solution inkubiert und anschließend für 30 min mit Anti-DIG-antikörperhaltiger Lösung (Anti-DIG, Boehringer Mannheim, 2 µl in 12,5 ml Blocking Working Solution) inkubiert. Es folgte unmittelbar danach ein zweimaliger Waschschriff mit Maleinsäurepuffer (je 15 min) und im Anschluß daran eine Äquibrierung mit 5 ml Detektionspuffer (5 min). Nach der Äquibrierung wurde die Membran 5 min mit Substratlösung inkubiert. Nach kurzem Abtropfen wurden die Membranen so zwischen zwei Klarsichtfolien eingeschlagen, daß sich zwischen Membranen und Folie möglichst keine Luftblasen befanden. Die so verpackten Membranen wurden in eine Röntgenfilmkassette auf einen Röntgenfilm gelegt und für ca. 45-60 min bei 37 °C exponiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm im Entwicklungsautomaten (HyperprocessorX-2, Amersham, Braunschweig) entwickelt.

Eine mehrfache Verwendung der Nylon-Membranen wurde durch Entfernung der

gebundenen Oligonukleotide durch zweimaliges Waschen für 10 min mit Stripping-Puffer ermöglicht.

Tabelle 7: Hybridisierungsbedingungen der verwendeten Oligonukleotidsonden
* der oralen Treponemen

Sonde	Hybridisierungstemperatur (°C)	Waschtemperatur (°C)	Waschpuffer (Wp)		Identifizierung
			I	II	
DDK2(4)	59	59	Wp0	Wp0	<i>T. phagedenis</i>
DDK3	55	57	Wp0	Wp0	<i>T. denticola</i> -like
DDK12	55	57	Wp0	Wp0	rekombinanter Klon 12
DDK20	60	62	Wp0	Wp0	rekombinanter Klon 20
Trel	54	60	Wp0	Wp0	Gruppe I*
TREII	54	62	Wp0	Wp0	Gruppe II*
TREIV	54	59	Wp0	Wp0	Gruppe IV*
DDK5/3	54	56	Wp0	Wp0	Isolat DD5/3
RTU3	54	54	Wp0	Wp0	Bacteria
1114F	37	52	Wp3	Wp3	Bacteria

3.2.9.2 Fluoreszenz *In situ*-Hybridisierung (FISH)

Vorbereitung des Untersuchungsmaterial

– Fixierung der Zellen (GERSDORF et al., 1993)

In Eppendorfgefäße (1,5 ml) wurden 1 ml Treponemenflüssigkultur pipettiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS pH 7,4 (3939 g, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in 900 µl PBS pH 7,4 resuspendiert und mit 100 µl Formaldehyd (37%) fixiert. Die Lagerung des fixierten Materials erfolgte bei -20 °C.

Pro Reaktionsfeld wurden je 2 µl des fixierten Flüssigmateri als nach dem Auftauen auf einen Objektträger mit 6 Reaktionsfeldern (Superior, Marienfeld) getropft und gleichmäßig über der Reaktionsfläche verteilt. Nach anschließender Lufttrocknung

des Objektträgers wurden die Zellen über eine aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 80% und 100% Ethanol für je 3 min) fixiert und dehydriert.

***In situ*-Hybridisierung**

– Vorbereitung der Hybridisierungslösung und der Objektträger:

Die Hybridisierungslösung (Endvolumen 10 µl) wurde aus zwei fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (50 ng pro Sonde) und Hybridisierungspuffer hergestellt. Bei Objektträgern mit 6 Reaktionsfeldern wurden 10 µl dieser Hybridisierungslösung pro Feld eingesetzt.

Der Hybridisierungspuffer (siehe 3.1.3.7) wurde in einer Formamidkonzentration von 0-20% bei einer Temperatur von 46 °C verwendet. Die Formamidkonzentration war ausschlaggebend für die Stringenz der Hybridisierung. Durch Erhöhung der Konzentration erhöhte sich die Stringenz. Die Objektträger wurden ebenfalls auf 46 °C vorinkubiert.

– *In situ*-Hybridisierung:

Die Objektträger wurden für 2½ Stunden bei 46 °C mit der Hybridisierungslösung in einer dunklen Feuchtkammer inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Hybridisierungslösung mit Aqua bidest. abgespült, die Objektträger getrocknet und jeweils mit einem Tropfen Eindeckmedium Citiflour AF 1 (University of Kent, AT Canterbury, Großbritannien) und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

– Mikroskopie der FISH:

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl-Zeiss, Jena; 10x, 40x, 100x/Ölimmersion Neofluar Objektiv). Das Mikroskop war mit einer Hochdruck-Quecksilberlampe (HBO 50 W, Osram) und dem Schmalbandfilterset HQ-F41-007 und HQ-F41-001 (AHF, Tübingen) ausgestattet. Kodak Ektrachrome HC 400 Filme wurden für die Mikrofotografie verwendet.

3.2.10 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der Einzelstrang-DNA wurde mit Hilfe der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach SANGER et al. (1977) durchgeführt.

Plasmid-DNA und aufgereinigte PCR-Produkte wurden unter Verwendung des Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham, Braunschweig) sequenziert. Die Markierung erfolgte über infrarotmarkierte Primer (IR-Primer, LANE et al., 1985).

– Vorbereitung der DNA-Ansätze für die Sequenzierreaktion (Lösungen 3.1.3.6; Primer 3.1.5.):

(1) Plasmid-DNA: 6-12 μ l DNA und 2 pmol IR-Primer wurden mit 2%iger wäßriger DMSO-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 32 μ l aufgefüllt.

(2) Aufgereinigte PCR-Produkte (Dynabeads®): Zu 22,5 μ l DNA-DMSO-Lösungs-Gemisch wurden 1,5 μ l IR-Primer (3 pmol) pipettiert.

– Sequenzierreaktion:

2 μ l von den Terminatoren (A, T, G und C reagent) wurden jeweils in ein Eppendorfgefäß (500 μ l) pipettiert. Der DNA-Ansatz (siehe Vorbereitung) wurde auf die vier vorbereiteten Reaktionsgefäße gleichmäßig verteilt und anschließend mit Mineralöl überschichtet (1 Tropfen, ca. 25 μ l). Der Reaktionsansatz wurde in den auf 95 °C vorgewärmten BIOMETRA Trio-Thermoblock gestellt.

– Programm des Thermocyclers:

Schritt 1:	Denaturierung der doppelsträngigen DNA	95 °C	5 min
Schritt 2:	Denaturierung der doppelsträngigen DNA	95 °C	30 sec
Schritt 3:	Annealing	55 °C	30 sec
Schritt 4:	Extension	70 °C	1 min

Schritt 2- 4: 28 x

Anschließend wurde die Reaktion mit 6 μ l Stop-Lösung abgestoppt. Die Proben wurden bis zum Auftragen auf das Sequenziergel auf Eis gestellt bzw. bei -20 °C gelagert.

– Herstellung des Sequenziergels:

Das Sequenziergel (LongRanger, Biozym, Oldendorf) wurde nach folgendem Schema hergestellt und anschließend nach Vorschrift des Herstellers gegossen.

	21	g	Harnstoff
	6	ml	10x TBE-Puffer
	5	ml	Rapid Gel XL (40%)
	500	µl	DMSO (98%)
ad	50	ml	Aqua bidest.
	bei ca. 40 °C lösen und anschließend filtrieren		
	292	µl	APS (10%)
	30	µl	TEMED

Nach der Polymerisation wurde das Gel vertikal in den automatischen Sequenzierer (LI-COR Dna Sequencer Model 4000, MWG-Biotech, Ebersberg) eingehängt. Die Kammern wurden mit 1xTBE gefüllt. Nicht polymerisiertes Material wurde mit Puffer aus den Taschen gespült und die Proben (je 2 µl) aufgetragen. Unter Verwendung des Programms BasemagIR-Data Collection DEV1 Version 2.21 wurde die Sequenzierung gestartet und die Daten über Nacht gespeichert.

3.2.11 Sequenzauswertung

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte unter Verwendung des Programms BasemagIR-Image Analysis Version 2.21 (LI-COR-Software package). Mit Hilfe des Sequenz-Analysen-Programms HUSAR 4.0 (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) wurden die ermittelten 16S rDNA-Sequenzen mit den in öffentlichen Datenbanken hinterlegten Sequenzen verglichen.

Die phylogenetische Einordnung der 16S rDNA-Sequenzen wurde unter Nutzung des TREECON Software-package (Version 3.1., van de PEER u. de WACHTER, 1993) durchgeführt. Zunächst wurde eine Gruppierung von Sequenzen (Alignment) unter Nutzung des Sequenz-Analysen-Programms HUSAR 4.0 erstellt.

Die vergleichende Matrix wurde nach der Korrekturformel von JUKES u. CANTOR (1969) errechnet. Phylogenetische Stammbäume wurden nach der Neighbor-Joining Methode von SAITOU u. NEI (1987) konstruiert.

3.2.12 Isolierung von Treponemen aus Klauenbioptaten

Das Ausgangsmaterial für die Isolierung von Treponemen war der Überstand der Bioptatproben nach einstündiger Inkubation bei 37 °C. Der Überstand jedes Untersuchungsmaterials wurde in den Versuch einbezogen. Die Kultivierung wurde in Mikrotiterplatten (Mikrotiterplatten-steril, NuncClone, Delta) anaerob (Anaerocult® A, Merck, Darmstadt) bei 37 °C durchgeführt. In jede Vertiefung wurden zuvor 200 µl vorreduziertes OMIZ-Pat-Medium gegeben, welches mit Fosfomycin (1 mg/l) und Rifampicin (100 mg/l) supplementiert war. In die erste Vertiefung wurden anschließend 100 µl des Überstandes pipettiert. Eine zehnfache Verdünnungsreihe schloß sich an.

Nach einer Inkubation von ca. 2-3 Wochen wurden diejenigen Proben, in denen Spiralbakterien in der Dunkelfeldmikroskopie sichtbar waren, zur Gewinnung einer Reinkultur auf 1,7%igem OMIZ-Pat-Agar ausgestrichen, die einzelnen Kolonien in Flüssigmedium überimpft und anschließend wieder ausplattiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Flüssigkultur wurde zur Aufbewahrung im Anschluß in einer Endkonzentration von 15% Glycerol bei -80 °C eingefroren.

3.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970)

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen handelt es sich um eine diskontinuierliche Vertikalgelelektrophorese. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung des Trärgels wird eine sehr schmale Startbande erzeugt, die durch Konzentrierung der Probe im Sammelgel entsteht.

– Herstellung der Zell-Lysate

10 ml Treponemenreinkulturen wurden zentrifugiert (1305 g, 4 °C, 10 min) und der Überstand verworfen. Die Sedimente wurden anschließend in 300 µl Lysispuffer aufgenommen.

– Proteinbestimmung der Zell-Lysate

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zell-Lysate wurde nach der Lowry-Methode (DC Protein Assay, Fa. BIO-RAD, München) in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Zur Ermittlung der Eichkurve wurde Rinderserum Albumin (BSA, Serva) verwendet. Unter Verwendung von 4 Bezugspunkten (Standard= 1500 mg/ml,

750 mg/ml, 375 mg/ml, 187,5 mg/ml) wurde die Eichkurve ermittelt. Der Einsatz des Zell-Lysates bei dieser Bestimmung betrug 5 µl.

– Pipettierschema des Meßansatzes

Reagenzien	Leerwert	Bezugskurve	Probe
Lysispuffer	5 µl	—	—
Standard	—	5 µl	—
Probe- Zell-Lysat	—	—	5 µl
Gebrauchslösung A (20 ml Reagenz S + 1000 µl Reagenz A)	25 µl	25 µl	25 µl
Reagenz B	200 µl	200 µl	200 µl
kurz mischen			
gut mischen			
15 min Inkubation bei Raumtemperatur			

Die Bestimmung der Extinktion (OD) erfolgte bei 650 nm.

– Durchführung der Elektrophorese (Lösungen siehe 3.1.3.3)

Zwei gut gereinigte Glasplatten wurden in einem Abstand von 2 mm zusammengeklammert und vertikal aufgestellt. Das 10%ige Trenngel wurde bis 1,5 cm vom oberen Rand der Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet, damit es nicht austrocknet. Nach einstündiger Polymerisation bei Raumtemperatur wurde die restliche Flüssigkeit vorsichtig mit Fließpapier entfernt, das 5%ige Sammelgel darauf gegossen und der Gelkamm mit einer Taschenbreite von 0,5 mm sofort nach dem Gießen in den Spalt zwischen den Platten geschoben. Nach der Polymerisation des Sammelgels von einer Stunde bei Raumtemperatur konnte der Gelkamm entfernt und das fertige Gel in eine Gelkammer vertikal eingespannt werden. Die Gelkammer wurde mit 1x SDS-Lauf-Puffer gefüllt.

Die Proteinproben (12 µg) wurden mit gleichem Volumen 2X Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 98 °C denaturiert, auf dem Eisbad abgekühlt und anschließend in die Geltasche gefüllt. Proteinmolekulargewichtsgrößenstandards (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) wurden in einer Tasche parallel bei jedem Lauf mitgeführt, um eine Größenbestimmung der Proteinbanden vornehmen zu können. Die

Elektrophorese begann mit 30 V für 15 min und weiter mit 100 V für ca. eine Stunde.

Die SDS-komplexierten Proteine wanderten zur Anode.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Färbung mit Coomassie blue.

– Coomassie blue-Färbung

Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden mit Coomassie blue dargestellt.

Das Gel wurde vorsichtig von den 2 Glasplatten abgelöst und in 20%iger Trichloressigsäure (TCA) für 10 min fixiert. Danach wurde das Gel in die Färbelösung (3.1.3.3) gelegt und über Nacht unter Schüttelbewegungen bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert.

3.2.14 Mikroskopische Untersuchungen

3.2.14.1 Dunkelfeldmikroskopie

Im Dunkelfeld wurden Flüssigkulturen (15 µl) mit Ölimmersion in 400facher Vergrößerung mikroskopiert (Olympus BH2-RFCA, Olympus).

3.2.14.2 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde im Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Grund durchgeführt. Untersucht wurden sowohl Flüssig- als auch Festkulturen. Für die Rasterelektronenmikroskopie wurde die Kultur nach der OTOTO-Methode (KELLEY et al., 1973) fixiert, mit Peldri II (Fa. Ted. Pella, Inc.) getrocknet und mit einer 5 nm Gold-Palladium-Schicht bedampft (SC 501, Emscope).

Material von Kolonien oder Flüssigkulturen wurden auf Collodium-befilmten, kohlebedampften Trägernetzen abgeklatscht oder adsorbiert für die Transmissionselektronenmikroskopie. Nach der Negativ-Kontrastierung (NERMUT, 1973) der Präparate wurden die Träger entweder direkt oder nach kurzer Fixierung mit Glutaraldehyddampf in einer feuchten Kammer mit 2%iger Phosphorwolframsäure (PWS, 1-5 min) und mehrmaligen Waschvorgängen mit PBS und Aqua bidest. luftgetrocknet. Die Mikroskopie erfolgte mit einem Philips EM 400.

3.2.15 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivitäten der Treponemenreinkultur wurden unter Verwendung des API-ZYM- und rapid ID 32 A-System (BIO MÉRIEUX SA, Frankreich) mehrfach (3x) bestimmt. Weiterhin wurde die Katalaseaktivität untersucht.

– Vorbereitung des Inokulums:

In der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Kulturen (30 ml) wurden zentrifugiert (1305 g, 4 °C, 10 min) und die Sedimente in Aqua bidest. resuspendiert. Eine Suspension entsprechend McFarland Standard 5 wurde hergestellt. Das Beimpfen und das Ablesen der Streifen erfolgte laut Vorschrift des Herstellers.

– API-ZYM:

Mit einer Pipette wurden zwei Tropfen des Inokulums in jedes Mikroröhrchen des Streifens pipettiert. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer wurde in jedes Mikroröhrchen ein Tropfen ZYM A und ZYM B-Reagenz gegeben und nach 5 min unter Verwendung einer Ablesetabelle nach Angaben des Herstellers beurteilt.

– rapid ID 32 A

In jede Vertiefung der Streifen wurden 55 µl des Inokulums pipettiert. Die Reaktionskammer Urease (URE) wurde mit 2 Tropfen Paraffinöl überschichtet. Anschließend wurde der Streifen aerob 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden verschiedene Reagenzien nach folgendem Schema in folgende Reaktionskammern pipettiert:

- NIT: NIT 1- und NIT 2-Reagenz
- IND: JAMES Reagenz
- PAL bis SerA: FB Reagenz

Die Streifen wurden nach 5 min abgelesen und mit der Identifizierungssoftware (ATB, bioMerieux) ausgewertet.

– Katalaseaktivität:

Zur Überprüfung der Katalaseaktivität wurden auf einem Objektträger Zellsedimente mit 3%iger H₂O₂ vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (Blasenbildung = positives Ergebnis).