

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Probenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Probenmaterial stammte von Rotfüchsen aus Ostbrandenburg, die im Rahmen der Tollwutdiagnostik im Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt in Frankfurt (Oder) zur Untersuchung kamen. Die Tierkörper wurden in der Regel im gefrorenen Zustand abgegeben.

3.1.1.1. Herkunft, Alter und Geschlecht der Füchse

Aus den Landkreisen mit hohen Prävalenzen von *B. burgdorferi* in Zecken (GUPTA, 1994) wurden insgesamt 100 Füchse untersucht (Abb. 3). 30 Tiere stammten aus dem Landkreis Oder-Spree (LOS), 26 aus dem Landkreis Uckermark (UM), 23 aus dem Landkreis Barnim (BAR) und 21 aus dem Landkreis Märkisch-Oderland (MOL). Unter den 91 Alt- und 9 Jungfüchsen waren 58 männliche sowie 42 weibliche Tiere (Tab. 2, siehe Anhang).

3.1.1.2. Probenentnahme

Die Probenentnahme fand im Zeitraum vom 01.06.1996 bis 30.10.1996 statt.

Die Untersuchung der Füchse erfolgte am Anlieferungstag, d.h. 1 bis 3 Tage (maximal 6 Tage) nach dem Erlegen. Aus dem Haarkleid wurden die Ektoparasiten abgesammelt und bis zur Bestimmung in Plastikgefäßen aufbewahrt. Anschließend wurden Hautproben vom Ohr (SINSKY and PIESMAN, 1989) und sofern vorhanden, von den Ansatzstellen der Zecken entnommen und unmittelbar danach untersucht. Zum Auffinden weiterer Ektoparasiten wurden dann die einzelnen Tierkörper für 24 Stunden über eine Kunststoffwanne, die bodenbedeckend mit Wasser gefüllt war, gehängt. Alle Ektoparasiten wurden nach Spezies und Entwicklungsstadium unter dem Stereomikroskop SM XX (Fa. Zeiss) nach ARTHUR (1963) bestimmt. Die

Anzahl der abgesammelten Ektoparasiten betrug maximal 20 Stück pro Fuchs. Im Rahmen der diagnostischen Untersuchung wurden darüber hinaus Herzkammerblut sowie Kieferknochen gewonnen. Die Kieferknochen wurden auf das Vorhandensein von Tetrazyklin als Indikator für die Aufnahme von Impfköder untersucht.

3.1.1.3. Aufbewahrung der Proben

Die Lagerung der Ektoparasiten und des Blutes erfolgte bei -20°C . Die Hautproben wurden bei -80°C aufbewahrt.



Abb. 3: Überblick über die Landkreise Brandenburgs

3.1.2. Bakteriologische Untersuchungen zum Nachweis von *B. burgdorferi* s.l.

3.1.2.1. Kultivierung

3.1.2.1.1. Präparation der Hautproben

Unmittelbar nach der Probenentnahme wurden die Hautproben von Haaren befreit und mit 70 %igem Alkohol abgerieben. Anschließend wurden sie für 1 min in 70 %igen Alkohol und 2x für jeweils 1 min in physiologische Kochsalzlösung getaucht.

Für die bakteriologische Untersuchung wurden Einzelproben (\varnothing 4mm) mit Hilfe einer Lochzange entnommen und mit einer sterilen Pinzette in die Kulturröhrchen gegeben.

Die restlichen Hautproben wurde bis zur Untersuchung mittels der PCR bei -80°C gelagert.

3.1.2.1.2. Nährmedien und Hemmstoffe

Zur Anzucht von *B. burgdorferi* wurden das modifizierte BSK II-Medium (SCHÖNBERG et al., 1988) und das MKP-Medium (PREAC-MURSIC et al., 1986) verwendet. Die Medien wurden frisch hergestellt (Rezeptur siehe Anhang), filtriert, in 200 ml-Schraubverschlussgefäße (Fa. Falcon) überführt und anschließend zur Sterilitätskontrolle für 24 Stunden bei 33°C bebrütet. Zur längeren Aufbewahrung wurden sie bei -20°C eingefroren.

Die Vorversuche haben gezeigt, dass es notwendig war, die vorhandenen Begleitkeime durch Antibiotika zu unterdrücken. Nachstehende Hemmstoffe wurden einzeln und in verschiedenen Kombinationen eingesetzt: Amphotericin B (Fa. Gibco), Bactrim (Fa. Roche), Fluorouracil (Fa. Lederle), Kanamycin (Fa. Gibco), Neomycin (Fa. Gibco), Polymyxin B (Fa. Sigma) und Rifampicin (Fa. Sigma).

Neomycin (4 μ g/ml) und Rifampicin (10 μ g/ml) als Einzelkomponenten haben sich nicht bewährt. Den Nährmedien wurden letztendlich folgende Hemmstoffkombina-

tionen zugesetzt, welche sich nicht nachteilig auf das Wachstum der Borrelien auswirken:

→ Rifampicin (30 µg/ml) + Polymyxin B (100 IU/ml) + Amphotericin B (2 µg /ml) + Bactrim (600 µg/ml)

→ Rifampicin (10 µg/ml) + 5-Fluorouracil (100 µg/ml) + Amphotericin B (2 µg/ml)
(SCHÖNBERG et al., 1992)

→ 5-Fluorouracil (200 µg/ml) + Kanamycin (8 µg/ml) (JOHNSON et al., 1984c)

Von diesen Medien wurden jeweils 6 ml in Schraubverschlussröhrchen (Fa. Falcon) abgefüllt, beschriftet und bei Raumtemperatur gelagert. Auf den Transportwegen zwischen den Entnahme- und Untersuchungsorten verhinderte ein Styroporbehälter starke Temperaturschwankungen der Kulturröhrchen.

3.1.2.1.3. Subkultivierung

Nach ca. 2 bis 4 Stunden wurde von allen Ausgangsröhrchen die erste Subkultur angelegt. Hierzu wurden jeweils 0,3 ml des Kulturmaterials in ein Röhrchen mit Hemmstoffen und in ein hemmstofffreies Röhrchen überimpft. Nach ca. 40 bis 46 Stunden wurde die zweite Subkultur nach gleichem Prinzip erstellt.

Die Inkubation aller Ansätze erfolgte bei 33°C über 8 Wochen.

3.1.2.2. Dunkelfeldmikroskopie

Nach einer makroskopischen Prüfung der Röhrchen hinsichtlich einer Farbveränderung von rot zu gelb, wurden alle Kulturen wöchentlich über einen Zeitraum von 8 Wochen auf das Wachstum von Spirochäten (charakteristische Schraubenform und Beweglichkeit) kontrolliert. Zu diesem Zweck wurde je ein Tropfen der Probe auf einen Glasobjektträger gebracht und unter dem

Dunkelfeldmikroskop (Fa. Zeiss) bei 160-400facher Vergrößerung durchmustert. Unklare Strukturen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Peter Schulze, BgVV Berlin, einer näheren Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop unterzogen.

3.1.3. Serologische Untersuchungen zum Antikörper-Nachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.1.3.1. Einsatz des Viramed®-Testkits

Der kommerzielle Testkit der Firma Viramed diente zum Nachweis von Anti-*Borrelia*-IgG beim Hund.

Zur Überprüfung der Sensitivität hinsichtlich des Einsatzes von Fuchsproben wurden uns freundlicherweise Seren von immunisierten Rotfüchsen vom Institut für epidemiologische Diagnostik der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Wusterhausen (Herr Dr. L. Geue) zur Verfügung gestellt.

Da im Hauptversuch Vollblut anstelle von Serum zur Untersuchung kam, wurden die Proben 1:50 verdünnt. Als AG wurde *B. burgdorferi* s.s., Stamm B 31 (ATCC 35 210), als Konjugat Anti-Hund-IgG-Peroxidase von der Ziege verwendet. Als Kontrollen kamen *B. burgdorferi*-positive und -negative Seren und ein Cut-off-Serum vom Hund zum Einsatz. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450 nm. Die Beurteilung der untersuchten Proben wurde nach folgendem Prinzip des Herstellers vorgenommen:

Ratio = $\frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{Cut-off}}$	Ratio < 0,6	negatives Ergebnis
	Ratio 0,6 - < 1,0	fragliches Ergebnis
	Ratio \geq 1,0	positives Ergebnis

3.1.3.2. Einsatz des laboreigenen ELISA-Testkits

In Zusammenarbeit mit Dr. Greiner vom parasitologischen Institut der FU Berlin wurde ein weiterer ELISA zum Nachweis spezifischer *Borrelia*-AK durchgeführt (GREINER et al., 1995). Als AG wurde *B. garinii*, Stamm 1 B 29 (SCHÖNBERG et al., 1988) verwendet.

3.1.4. Untersuchungen zum Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. in den Zecken mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT)

Von den Ektoparasiten wurden insgesamt 100 adulte *I. ricinus*-Weibchen im IIFT untersucht. Die Hälfte der Zecken stammte von Füchsen, die den Impfköder aufgenommen hatten und die andere Hälfte von tetrazyklinfreien Füchsen. Es wurden hauptsächlich vollgesogene Zecken ausgewählt.

Als Kontrollen dienten 17 negative und 4 positive Zecken aus dem parasitologischen Institut der FU Berlin, die sich an Kaninchen vollgesogen hatten.

3.1.4.1. Präparation der Zecken

Die einzelnen Zecken wurden in sterile Glaspetrischalen verbracht und nach Zugabe von je 90 µl PBS mit einem sterilen Glasobjektträger zerrieben. Anschließend wurden dem Zeckenhomogenat weitere 90 µl PBS zugesetzt. Die eine Hälfte dieser Suspension wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit weiteren 90 µl PBS vermengt und bis zur Untersuchung mittels der PCR bei -80°C eingefroren. Die andere Hälfte wurde mit 90 µl PBS/MgCl₂ vermischt und ebenfalls in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bis zur Untersuchung mit dem IIFT bei -80°C aufbewahrt.

3.1.4.2. Objektträgerbeschichtung

Auf den ersten beiden von zwölf Reaktionsflächen jedes Objektträgers (Fa. Medco) wurden als positive AG-Kontrolle *B. garinii*, Stamm 1 B 29, und als negative Kontrolle PBS bzw. Zeckenhomogenate aufgetragen. Die restlichen Felder wurden mit der beschriebenen Zeckensuspension jeweils unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:2 beschichtet. Es wurde darauf geachtet, dass jede Probe (10 µl) das Reaktionsfeld vollständig und gleichmäßig bedeckte. Anschließend wurden die Objektträger für eine Stunde unter einem Abzug getrocknet. Daran schloss sich eine 5-minütige Fixierung in Aceton bei -20°C mit nachfolgender Lufttrocknung an.

3.1.4.2.1. Einsatz polyklonaler Antikörper

Im Anschluss daran wurden je 10 µl eines Hyperimmunserums vom Kaninchen gegen *B. garinii*, Stamm 1 B 29, in einer Gebrauchsverdünnung von 1:200 aufgetragen. In einer feuchten Kammer erfolgte die 30-minütige Inkubation bei 33°C. Die Objektträger wurden danach 3x je 5 min in PBS gewaschen und vorsichtig zwischen Fliesspapier getrocknet.

3.1.4.2.2. Einsatz monoklonaler Antikörper

Die Beschichtung der Objektträger mit den monoklonalen AK L32 1F11 in einer Gebrauchsverdünnung von 1:2 erfolgte nach dem gleichen Prinzip (3.1.4.2.1.). Die monoklonalen AK sind OspA-spezifisch und erkennen Epitope gegen *B. burgdorferi* s.l. (FINGERLE et al., 1995). Sie wurden uns dankenswerterweise von Fr. PD Dr. Bettina Wilske, Pettenkofer-Institut München, zur Verfügung gestellt.

3.1.4.2.3. Konjugat

Die getrockneten Felder wurden mit jeweils 10 µl Fluorescein(DTAF)-Konjugat-Anti-Kaninchen IgG von der Ziege (Fa. dianova) bzw. FITC-Konjugat-Anti-Maus IgG vom Kaninchen (Fa. DAKO) beschickt und wieder für 30 min in der feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert, 3x je 5 min in PBS gewaschen und getrocknet. Im Vorversuch wurden die Gebrauchsverdünnungen von 1:200 für die polyklonalen AK bzw. 1:40 für die monoklonalen AK bestimmt.

3.1.4.3. Fluoreszenzmikroskopie

Jeder Objektträger wurde mit Glycerinpuffer (9 Vol. Glycerin zu 1 Vol. PBS) beschichtet, mit einem Deckglas versehen und in einem abgedunkelten Raum bei Zimmertemperatur in der Auflicht-Fluoreszenz untersucht.

Das optische System bestand aus einem großen Forschungsmikroskop Universal der Fa. Zeiss mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 200 W (Fa. Osram) als Erregerlichtquelle und einem Fluoreszenz-Auflichtkondensator III RS (Fa. Zeiss). Als Filtersystem kam eine Interferenz-Blaufilterkombination BP 450-490 (Erregerfilter), FT 510 (Strahlenfilter) und LP 520 (Sperrfilter) zum Einsatz. Es wurde mit einem Immersionsobjektiv 40/0,63 und einem Okular kpl. 10x gearbeitet.

3.1.4.4. Beurteilungskriterien

Zunächst erfolgte die Beurteilung der Kontrollansätze, um die Spezifität des IIFT zu überprüfen.

Die einzelnen Felder wurden mit positiv (+), fraglich (?) oder negativ (-) bewertet.

+ bis ++	≥ 3 fluoreszierende Spirochäten erkennbar
?	Fluoreszenz, keine eindeutige Schraubenform erkennbar
-	keine Spirochäten sichtbar

Bei fraglichem Resultat wurde der gesamte Test wiederholt.

3.1.5. Spezifischer *B. burgdorferi* s.l. DNS-Nachweis in den Zecken und Hautproben mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.5.1. Präparation der Zecken und Hautproben

Die Präparation der Zecken und Hautproben erfolgte wie in 3.1.4.1. bzw. in 3.1.2.1.1. beschrieben.

3.1.5.2. Isolierung der DNS mit Hilfe des QIAamp® Tissue Kits

Die DNS-Isolierung der Zeckenhomogenate (jeweils 180 µl) und Hautproben (je 25 mg in Puffer ATL) erfolgte nach Angabe des Herstellers (Qiagen GmbH):

Die aufgetauten Proben wurden zunächst mit Proteinase K versetzt, homogenisiert (Vortex) und bis zur vollständigen Auflösung bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von Puffer AL erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 10 min. Nach weiterem Zusatz von 96 %igem Äthanol und intensivem Schütteln wurden die Probenansätze in neue Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (6000 x g, 1 min). Anschließend wurden der Überstand verworfen, die Zentrifugate mit Waschpuffer AW gereinigt, zentrifugiert (6000 x g, 1 min), wiederholt gewaschen und zentrifugiert (6000 x g, 1 min). Die abschließende Zentrifugation erfolgte bei höchster Umdrehung (16000 x g) für 2 min. Die Reaktionsgefäße wurden in Eppendorfgefäße gesteckt und nach Zugabe von 10 mM Tris-HCL (pH: 9,0) bei 70°C für 5 min inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren (6000 x g, 1 min) erfolgte ein vollständiges Herauslösen der DNS.

Jeweils 10 µl des Eluats wurden in der PCR eingesetzt.

3.1.5.3. Durchführung der PCR

Zum Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. –DNS wurden in einem Vorversuch drei verschiedene PCR-Ansätze ausgetestet (Tab. 4), die bereits in anderen Arbeiten Einsatz fanden. Hierbei zeigte die nested-PCR die höchste Sensitivität und wurde daher für den Hauptversuch ausgewählt.

Die Spezifität wurde an 15 Stämmen von *B. burgdorferi* s.l. aus dem BgVV Berlin ermittelt.

Tab. 4: Überblick über die PCR-Primersätze

Primer	Zielsequenz (5' → 3')	Position	Länge
JS 1	AGA AGT GCT GGA GTC GA	690→	259 bp
JS 2	TAG TGC TCT ACC TCT ATT AA	948	
SL 1	AAT AGG TCT AAT AAT AGC CTT AAT AGC	21→47	308 bp
SL 2	CTA GTG TTT TGC CAT CTT CTT TGA AAA	328→302	
prZS 7/31-1	GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC C	18→39	662 bp
OspA-5	CAC TAA TTG TTA AAG TGG AAG T	679→658	
OspA-6	GCA AAA TGT TAG CAG CCT TGA CG	54→76	392 bp
OspA-8	CTG TGT ATT CAA GTC TGG TTC C	445→424	

23S rRNA-Gen-PCR (modifiziert nach MAIWALD et al., 1995):

Die Zielsequenz des Primersystems JS 1/2 liegt auf dem Gen für die 23S rRNA.

Jeder Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl bestand aus 10 µl Proben-DNS, 0,2 mM dNTP-Mix (dTTP, dATP, dCTP, dGTP, Fa. Boeringer), 5,0 M 10x PCR-Puffer (Fa. GeneAmp), 2,0 mM MgCl₂ (Fa. GeneAmp), 1,25 U *Taq*-DNS Polymerase (Fa. Appligene) und 0,5 µM je Primer. Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert und abschließend mit 50 µl Mineralöl (Fa. Sigma) überschichtet. Die Amplifikation (Tab. 5) erfolgte in einem TRIO-Thermoblock (Fa. Biometra).

Tab. 5: Zyklusparameter der 23 rRNA-Gen-PCR

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Schmelzen	95 °C	180 sec	1
Amplifikation			45
Schmelzen	95 °C	45 sec	
Primerbindung	50 °C	145 sec	
Verlängerung	50 °C		
Endverlängerung	70 °C	120 sec	1

OspA-Gen-PCR (modifiziert nach DEMAERSCHALCK et al., 1995):

Der Primersatz SL 1/2 erkennt die Sequenz, die für ein Fragment des OspA-Gens kodiert. Jeder Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl bestand aus 10 µl Proben-DNS, 0,2 mM dNTP-Mix (dTTP, dATP, dCTP, dGTP, Fa. Boeringer), 5,0 M 10x PCR-Puffer (Fa. GeneAmp), 1,5 mM MgCl₂ (Fa. GeneAmp), 1,00 U *Taq*-DNS Polymerase (Fa. Appligene) und 0,4 µM je Primer. Alle Ansätze wurden auf Eis

pipettiert und abschließend mit 50 µl Mineralöl (Fa. Sigma) überschichtet. Die Amplifikation (Tab. 6) erfolgte in einem TRIO-Thermoblock (Fa. Biometra).

Tab. 6: Zyklusparameter der OspA-Gen-PCR

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Amplifikation			35
Schmelzen	93 °C	1 min	
Primerbindung	55 °C	1 min	
Verlängerung	70 °C	1 min	
Endverlängerung	70 °C	10 min	1

nested-PCR (modifiziert nach MOTER et al., 1994):

Im Hauptversuch wurde eine OspA-spezifische nested-PCR durchgeführt, mit folgenden Primerpaaren: außen prZS 7/31-1 und OspA-5, innen OspA-6 und OspA-8.

Jeder äußere Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl bestand aus ca. 10 µl Proben-DNS, 0,1 mM dNTP-Mix (dTTP, dATP, dCTP, dGTP, Fa. Boeringer), 5,0 M 10x PCR-Puffer (Fa. GeneAmp), 1,5 mM MgCl₂ (Fa. GeneAmp), 1,5 U *Taq*-DNS Polymerase (Fa. Primezyme) und 0,25 µM je Primer. Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert, abschließend mit 50 µl Mineralöl (Fa. Sigma) überschichtet und im Thermozykler amplifiziert. Danach wurden von diesem Reaktionsgemisch je 5 µl für den inneren Ansatz verwendet. Das Gesamtvolumen von 50 µl bestand aus 0,1 mM dNTP-Mix (dTTP, dATP, dCTP, dGTP, Fa. Boehringler), 5,0 M 10x PCR-Puffer (Fa. GeneAmp), 1,5 mM MgCl₂ (Fa. GeneAmp), 1,5 U *Taq*-DNS Polymerase (Fa. Primezyme) und 0,125 µM je Primer. Alle Ansätze wurden mit 50 µl Mineralöl (Fa. Sigma) überschichtet. Die Zusammensetzung der beiden Ansätze ist der Tab. 7 zu entnehmen. Die Amplifikation (Tab. 8) erfolgte in einem TRIO-Thermoblock (Fa. Biometra).

Tab. 7: Pipettierschema der nested-PCR

Primer-paar	10xPuffer	MgCl ₂	Primer 1	Primer 2	dNTP-Mix	<i>Taq</i> -DNS Polymerase
Außen	5,0 M	1,5 mM	0,250 µM	0,250 µM	0,1 mM	1,5 U
Innen	5,0 M	1,5 mM	0,125 µM	0,125 µM	0,1 mM	1,5 U

Tab. 8: Zyklusparameter der nested-PCR

Zyklusschritt	Außen			Innen		
	Temp.	Dauer	Zyklen	Temp.	Dauer	Zyklen
Schmelzen	94 °C	180 sec	1	94 °C	180 sec	1
Amplifikation			30			25
Schmelzen	94 °C	90 sec		94 °C	90 sec	
Primerbindung	45 °C	60 sec		55 °C	60 sec	
Verlängerung	72 °C	120 sec		72 °C	120 sec	
Verlängerung	70 °C	10 min	1	70 °C	10 min	1

3.1.5.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte durch horizontale Flachbett-Gelelektrophorese in einer Agagel Mini-Kammer (Fa. Biometra) in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 4 %igem (JS 1/2) bzw. 2 %igem (SL 1/2; nested-PCR) Kompositgel (Fa. Biozym, Herstellung siehe Anhang).

Das Agarosegel wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt und mit 25 µl Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration: 0,5 mg/ml) versetzt. Anschließend wurden die Gummiblöcke auf die Enden des Geltaflets geklemmt, das Gel langsam eingegossen und zwei Käbme mit je 12 Zähnen eingehängt. Das Gel benötigte ungefähr 30 min zum Aushärten. In der Zwischenzeit konnte der Laufpuffer hergestellt werden. Dazu wurden 250 ml 1x Elektrophoresepuffer mit 250 µl Ethidiumbromidlösung vermengt.

Nach dem Erstarren des Gels wurden die Endblöcke entfernt und das Taflett in die Elektrophoresekammer gesteckt. Da die Laufrichtung des Gels von der negativen zur positiven Elektrode war, mussten die Probestaschen zur negativen Elektrode ausgerichtet sein.

Vor dem Entfernen der Käbme wurde die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben (je 10 µl) wurden mit Auftragspuffer (je 3 µl, siehe Anhang) gemischt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die gebrauchten Pipettenspitzen kamen zur Dekontamination in ein Gefäß mit 2 %iger Schwefelsäure. Zum Schluss wurde die Elektrophoresekammer mit dem Sicherheitsdeckel verschlossen und der Stromgeber (Fa. Biometra) eingeschalten.

Die Auftrennung der DNS erfolgte bei einer Gleichstromspannung von 50 V über ca. 1 Stunde. Zur Ermittlung der Bandengröße lief jeweils ein 100 bp DNS-

Längenstandard (Fa. Gibco, siehe Anhang) mit. Nach beendeter Elektrophorese wurden die aufgetrennten DNS-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Photo-Auswertungssystems (Polaroid) dokumentiert.

Die Entsorgung des kanzerogenen Ethidiumbromids erfolgte durch Bindung an Aktivkohle.

3.1.5.5. Southern-Blot-Verfahren

Die Spezifität der Amplifikate wurde nach Southern-Blot-Hybridisierung mit einer Peroxidase-markierten 392 bp-Sonde im ECL-Verfahren nach Angaben des Herstellers (Fa. Amersham) bestätigt.

Zur Herstellung der Gensonde wurde das Amplifikat von *B. garinii* mit Hilfe des QIAamp® Tissue Kits reamplifiziert, wie bereits in 3.1.5.2. beschrieben. Danach erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produktes mittels des QIAquick® PCR Purifikation Kits (Qiagen GmbH) gemäß den Angaben des Herstellers.

1. Southern-Blot-Transfer:

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit der Oberseite auf das befeuchtete Gel-Blotting-Papier (Fa. Schleicher & Schüll) gelegt und die Luftblasen ausgestrichen. Der Träger befand sich in einer Petrischale, die bis zu einer Höhe von ca. 1 cm mit 0,4 N NaOH gefüllt war. Eine der Gelgröße entsprechende Hybondnylonmembran (Fa. Amersham) wurde hinterher luftblasenfrei aufs Gel gelegt und mit etwas NaOH übergossen. Die nächsten Schichten bildeten 3 Lagen Gel-Blotting-Papier und ein ca. 4 cm hoher Stapel Saugpapier (Filterpapier oder Papierhandtücher). Zum Schluss wurde der Deckel der Petrischale mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Der Blottransfer dauerte mindestens 3 Stunden bzw. erfolgte über Nacht. Danach wurde die Membran unter Schwenken in 5x SSC 1 min gewaschen und bis zur Hybridisierung in Folie bei 4°C gelagert. Eine schematische Darstellung des Southern-Blot-Transfers ist Abb. 4 zu entnehmen.

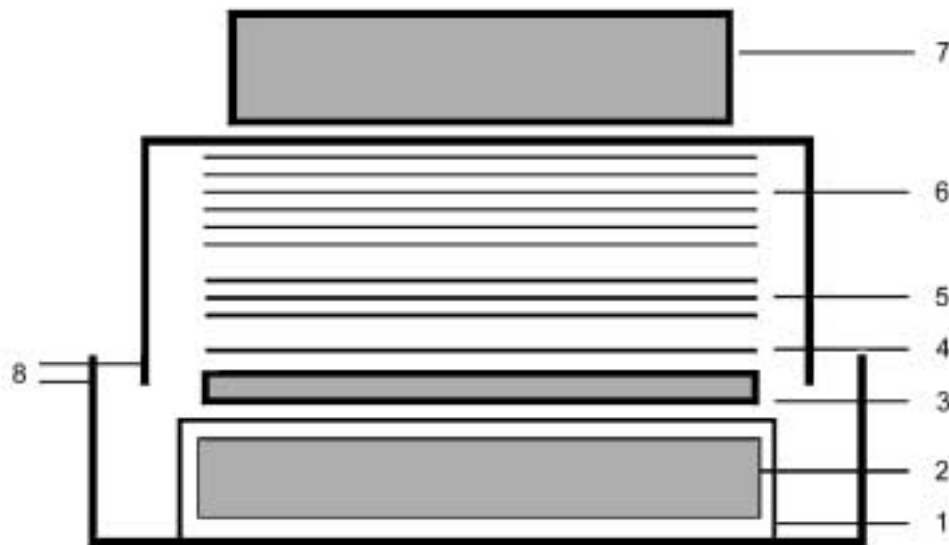


Abb. 4: Querschnitt des Aufbaus zum Southern-Blot-Verfahren

- | | |
|------------------------|------------------------|
| 1= Gel-Blotting-Papier | 5= Gel-Blotting-Papier |
| 2= Träger | 6= Saugpapier |
| 3= Agarosegel | 7= Gewicht |
| 4= Hybondnylonmembran | 8= Petrischale |

2. Sondenherstellung:

Die DNS-Konzentration des gereinigten PCR-Produktes wurde photometrisch bestimmt und auf 10 ng/ μ l eingestellt. Davon wurden 100 ng (10 μ l) für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert, anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Nach Zugabe von jeweils 10 μ l DNS-labelling-Reagenz und Glutaraldehydlösung wurde das Gemisch zentrifugiert und danach für 10 min bei 37°C inkubiert. Für eine Haltbarkeit von bis zu 6 Monaten (bei -15°C bis -30°C) wurden der Sonde 30 μ l Glycerin hinzugefügt.

3. Hybridisierung und Waschungen:

Vorab musste der Hybridisierungspuffer (inklusive NaCl und Blocking-Reagenz) auf 42°C erwärmt werden. Die Blotpapiere wurden mit 5x SSC benetzt und zusammengerollt in einem Nylonnetz in die Hybridisierungsröhrchen gesteckt. Es musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstanden. Nach Zugabe von etwas 5x SSC wurden die Blotpapiere wieder entrollt, ohne dass sie sich überlappten. Der Puffer wurde durch 42°C warmen Hybridisierungspuffer ersetzt und die Röhrchen für 15 min im Hybridisierungsofen (Fa. Biometra) vorhybridisiert. Anschließend wurden 50 µl der Sonde in den Puffer pipettiert, ohne die Membran zu benetzen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Ofen.

Am nächsten Tag mussten zuerst der Primary-wash-Puffer sowie 5x SSC auf 42°C und der Secondary-wash-Puffer auf Raumtemperatur erwärmt werden.

Der Hybridisierungspuffer wurde abgegossen und die Röhrchen mit 50-100 ml 5x SSC gefüllt, um sie dann für 5 min bei 42°C zu waschen. Nachdem 5x SSC durch Primary-wash-Puffer ersetzt wurde, schloss sich ein Waschen der Röhrchen für 20 min bei 42°C an. Der Puffer wurde durch die gleiche Menge frischen Puffer ersetzt und für weitere 10 min bei 42°C gewaschen. Nachdem der Ofen auf Raumtemperatur abkühlt war, wurden die Blotpapiere in sterile Petrischalen verbracht, mit Secondary-wash-Puffer bedeckt und für 5 min im Ofen geschüttelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt.

4. Entwicklung:

Zuerst wurden die Filme und Reagentien auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Blotpapiere wurden mit der DNS-Seite nach oben in ein sauberes Gefäß überführt und direkt mit der zuvor gemischten Detection-Reagenz (je 6 ml Reagenz 1 und 2) überschichtet. Nach dem 1-minütigen Inkubieren durch leichtes Schwenken wurden die Blotpapiere möglichst ohne Luftblasen in Folie eingeschlagen und anschließend in die Filmkassette eingelegt. Die nächsten Arbeitsschritte fanden bei Infrarotbeleuchtung statt. Autoradiographiefilme (Fa. Amersham) ähnlicher Größe wurden direkt auf die Blotpapiere gelegt, dann die Filmkassette geschlossen. Nach abgelaufener Belichtungszeit konnten die Filme entnommen und standardisiert entwickelt werden.