

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Es wurden insgesamt 150 *E. coli*-Isolate von an Kolibazilliose erkrankten und verendeten Hühnern unterschiedlichen Alters untersucht. Es handelte sich um Legehennen (105), Legehennen-Elterntiere (3), Broiler (7), Broilerküken (2), Masttiere (3), Mast-Elterntiere (11), Puten (6) und Puten-Elterntiere (1). Von 12 Isolaten ist lediglich bekannt, dass es vom Geflügel stammt. Diese 150 *E. coli*-Feldstämme wurden über einen Zeitraum von 11 Jahren von verschiedenen Betrieben in Deutschland, aber auch in Ägypten, Großbritannien und Jordanien isoliert. In der Regel stammen ein bis sechs Isolate vom gleichen Betrieb, lediglich in drei Betrieben wurden 10, 11 sowie 12 *E. coli*-Stämme isoliert. Näheres über die geographische Herkunft sind der Tab. 2 sowie der Abb. 2 zu entnehmen

Abb. 2 / Tab. 2: Herkunft aviärer pathogener *E. coli*-Isolate (n = 150)



Herkunft (Land / Region)	Häufigkeit n	Prozent %
Deutschland / Nordwesten (NW)	92	61,4
Deutschland / Nordosten (NO)	17	11,4
Deutschland / Südwesten (SW)	15	10,0
Deutschland / Südosten (SO)	14	9,3
Ägypten	3	2,0
Großbritannien	2	1,3
Jordanien	5	3,3
unbekannt	2	1,3
<b>Gesamt</b>	<b>150</b>	<b>100</b>

- **Nordwesten:** Cuxhaven (55 *E. coli*-Isolate), Kiel (1), Neumünster (7), Nienburg (3), Osnabrück (13), Paderborn (3), Rotenburg/Wümme (4), Vechta (3), Weser-Ems (4)
- **Nordosten:** Berlin (4), Berlin-Potsdam (4), Halberstadt (1), Jerichower Land (1), Leipziger Land (1), Ludwigslust (1), Magdeburg (1), Ostvorpommern (1), Potsdam-Mittelmark (1), Riesa (1), Stendal (1)
- **Südwesten:** Darmstadt (4), Frankfurt (1), Kaiserslautern (4), Neckar-Odenwaldt (1), Schwäbisch Hall (3), Stuttgart (2)
- **Südosten:** Freising (3), Gotha (3), München (4), Ostthüringen (4)

### 3.1.2 Geräte

Brutschränke	Heraeus, Typ B6060
Elektrophoresekammern	AGS; Hybaid; MWG
Film (inkl. Negativ)	Polaroid Polapan 665PN ISO 80/20°
Filmkassetten	Kodak BioMax Cassette
Fluorometer	Hofer DyNA Quant <sup>TM</sup> 200
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30
Objektträger	Roth 76 x 26 mm
pH-Meter	Knick 766 Calimatic
Photo-Kamera	Polaroid MP4+ Instant Camera System
Photospektrometer	Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec <sup>®</sup> 3000 pro
Pipetten	Eppendorf Research
Pulsfeld-Gelelektrophorese-kammer	Rad Chef-DR <sup>®</sup> III System; Electrophoresis Cell; BioRad-Cooling Module
Röntgenfilme	Kodak X-OMAT AR
Schüttler	IKA Labortechnik KS 250 basic
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, C 24 Incubator Shaker
Spannungsgerät	Hybaid PS 250
Sterilwerkbank	Steag Laminarflow-Prozeßtechnik
Thermocycler	Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D
Transilluminator	Herolab; E.A.S.Y. 429K; ICU-1; Video-Graphik Printer UP 890 CE
UV-Tisch	Biometra TI 1
Vortexer	IKA MS2 Minishaker
Waage	Sartorius LA 230S und BP 2100
Wärmeschrank	WTC Binder
Wasserbäder	Julabo; Th. Karow GmbH

### **3.1.3 Chemikalien, Nährmedien und Lösungen**

#### **3.1.3.1 Chemikalien**

Folgende Kits wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen:

- MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit      Epicentre, Biozym, Hessisch Oldendorf
- High Pure PCR Product Purification Kit      Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- PCR DIG Probe Synthesis Kit      Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- DIG Luminescent Detection Kit      Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Die Enzyme und Oligonukleotid-Primer stammen von folgenden Firmen:

- Qbiogene, Heidelberg und MWG Biotech, Ebersberg

Bezugsfirmen für weitere in dieser Arbeit verwendete organische und anorganische Reagenzien waren Acila GMNmbH, Walldorf, BioRad, München, Life Technologies™, Karlsruhe, Merck AG, Darmstadt, New England Biolabs® GmbH, Schwalbach/Taunus, Oxoid Unipath GmbH, Wesel, Promega GmbH, Mannheim, Roth® GmbH & Co., Karlsruhe, Serva, Heidelberg sowie Sigma®, Deisenhofen

## 3.1.3.2 Nährmedien

<b>- LB-Medium (Luria Broth)</b>	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
		pH 7,0±0,2

autoklaviert bei 121 °C, 15 min

<b>- LB-Agar (Luria Bertani)</b>	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	1 N NaOH	1,00 ml
	Agar	15,00 g/l
		pH 7,0±0,2

autoklaviert bei 121 °C, 15 min

<b>- Wasserblau-Metachrom-Agar nach Gassner, modifiziert</b>	Pankreatisches Pepton (Fleisch)	4,40 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	4,40 g/l
	Hefeextrakt	2,70 g/l
	Lactose	10,00 g/l
	Saccharose	10,00 g/l
	NaCl	5,00 g/l
	Metachromgelb	0,40 g/l
	Agar	10,00 g/l
		pH 7,0±0,2

autoklaviert bei 121 °C, 15 min

<b>- Blutagar (Nähragar I)</b>	Pankreatisches Pepton (Fleisch)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Gelantine)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	5,00 g/l
	Eiweißhydrolysat	3,50 g/l
	Hefeextrakt	3,50 g/l
	NaCl	5,00 g/l
	Agar	10,00 g/l
		pH 7,0±0,2

autoklaviert bei 121 °C, 15 min  
abkühlen auf 45-50 °C  
anschließend Zugabe von  
5 % defribiniertem Schafblut

### 3.1.3.3 Lösungen

#### 3.1.3.3.1 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNS)

<b>- TBE-Puffer Stamm-Lösung (10 x konz.)</b>	Tris	890 mM	107,82 g
	Borsäure	890 mM	55,03 g
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	18,62 g
	eingestellt mit NaOH		auf 100 ml
			davon 40 ml auf 1000 ml A. bidest
<b>- Stop-Lösung</b>	Formamid		9,50 ml
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	0,40 ml
	Bromphenolblau		5,00 mg
	Xylencyanol FF		5,00 mg
	A. bidest		0,100 ml
<b>- Agarose</b>	Agarose		1,00 – 1,50 g auf 100 ml 1 x TBE
<b>- Ethidiumbromidlösung 1 %</b>			

#### 3.1.3.3.2 Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

<b>- 10 x PCR buffer<sup>1</sup></b>	Tris-HCl, pH 8,4	200 mM
	KCl	500 mM
<b>- Taq DNA Polymerase<sup>1</sup></b>		5 U/μl
<b>- Magnesium Chlorid Solution<sup>1</sup></b>		50 mM
<b>- dNTP<sup>2</sup></b>	PCR Nucleotide Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	each dNTP 10 mM

<sup>1</sup> GIBCO BRL®, Life Technologies

<sup>2</sup> Promega Corporation

### 3.1.3.3.3 Lösungen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

<b>- ESP-Puffer</b>	EDTA	500 mM	18,62 g
	Sarcosyl	3,4 mM	1,00 g
	pH 9,5 eingestellt mit NaOH		auf 100 ml A. bidest
	PorteinaseK		1,80 mg/ml
<b>- TE Puffer</b>	Tris	10 mM	1,21 g
	EDTA	10 mM	3,72 g
	pH 7,5		auf 1000 ml A. bidest
<b>- TBE-Puffer Stamm-Lösung (10 x konz.)</b>	Tris	890 mM	107,82 g
	Borsäure	890 mM	55,03 g
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	18,62 g
	eingestellt mit NaOH		auf 100 ml davon 40 ml auf 1000 ml A. bidest
<b>- Enzypuffer für XbaI</b>	Tris	10 mM	0,12 g
	NaCL	50 mM	0,06 g
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	0,20 g
	pH 8,0 eingestellt mit NaOH		
	Mercaptoethanol	10 mM	0,78 ml
			auf 100 ml A. bidest
	Bovines Serumalbumin		0,1 mg/ml

### 3.1.3.3.4 *Lösungen für die DNS-DNS-Hybridisierung*

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

<b>- Maleinsäure-Puffer</b>	Maleinsäure (100 mM)	1 M	100 ml
	NaCl (150 mM)	1 M	150 ml
	pH 7,5, eingestellt mit NaOH		auf 1000 ml A. bidest
<b>- Blocking Reagenz Stock Solution (BRSS), 10 x konz.</b>	Blocking Reagenz	10 %	10,00 g auf 100 ml Maleinsäurepuffer
			Erhitzen bis 65 °C, autoklavieren Lagerung bei 4 °C
<b>- SDS (10 %ig)</b>	SDS	10 %	20,00 g auf 200 ml A. bidest
<b>- SSC (20 x)</b>	Na-Citrat	1 M	300 ml auf 1000 ml NaCl
<b>- Hybridisierungspuffer</b>	SSC (5 x)	20 x	12,50 ml
	BRSS (1 %)	10 x	5,00 ml
	N-Lauroylsarcosine (0,1 %)	10 %	1,00 ml
	SDS (0,02 %)	10 %	0,10 ml auf 50 ml A. bidest
<b>- Stringenz I</b>	SSC (2 x)	20 x	40,00 ml
	SDS (0,1 %)	10 %	4,00 ml auf 400 ml A. bidest
<b>- Stringenz II</b>	SSC (0,1 x)	20 x	2,00 ml
	SDS (0,1 %)	10 %	4,00 ml auf 400 ml A. bidest

---

<b>- Waschpuffer 1</b>	Maleinsäurepuffer Tween <sup>®</sup> 20	0,3 %	100 ml 0,30 ml
<b>- Blocking Solution (1 x)</b>	BRSS	10 x	10,00 ml auf 100 ml Maleinsäurepuffer
<b>- Detektionspuffer</b>	Tris (100 mM) NaCl (100 mM) pH 9,5, eingestellt mit HCl	1 M 1 M	10,00 ml 10,00 ml  auf 100 ml A. bidest
<b>- Strippingpuffer</b>	NaOH (0,2 M) SDS (0,1 %)	3 M 10 %	33,3 ml 5,00 ml auf 500 ml A. bidest

Das Anti-Dig-AP Konjugat sowie die CSPD<sup>®</sup> Lösung wurden entsprechend den Angaben des DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) verdünnt und eingesetzt.



### 3.1.4 Oligonukleotid-Primer und DNS-Sonden

#### 3.1.4.1 Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation

Sämtliche Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

**Tab. 3** Überblick über Sequenzen und Spezifitäten der Oligonukleotid-Primer zum Nachweis der virulenzassoziierten Gene *astA*, *stx2f*, *fyuA*, *irp2*, *iss*, *hlyE*, *papC*, *fimC*, *iucD* und *tsh* in APEC-Stämmen

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Gen	Lokalisation im Gen	Referenz
EAST-1 s	TGCCATCAACACAGTATATCC	<i>astA</i>	135-155	
EAST-1 as	TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGC	<i>astA</i>	219-245	121
STX2f s	AGATTGGGCGTCATTC	<i>stx2f</i>	519-542	
STX2f as	TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	<i>stx2f</i>	924-947	98
FyuA s	GCGACGGGAAGCGATGACTTA	<i>fyuA</i>	786-806	
FyuA as	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	<i>fyuA</i>	1540-1560	99
HMWP-2 s	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	<i>irp2</i>	241-261	
HMWP-2 as	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	<i>irp2</i>	508-528	99
HLYE s	TCGGCATCCACATTAGTTG	<i>hlyE</i>	163-181	
HLYE as	AATCGAGTTGTTTCCGCTCTCT	<i>hlyE</i>	739-759	92
ISS s	TCTGGCAATGCTTATTACAGG	<i>iss</i>	333-353	
ISS as	AGTGATAAAACCGAGCAATCC	<i>iss</i>	532-552	diese Arbeit
PAPC s	TGATATCACGCAGTCAGTAGC	<i>papC</i>	1284-1304	
PAPC as	CCGGCCATATTCACATAA	<i>papC</i>	1749-1766	58
FIMC s	GGGTAGAAAATGCCGATGGTG	<i>fimC</i>	215-235	
FIMC as	CGTCATTTTGGGGTAAGTGC	<i>fimC</i>	671-691	58
AERA s	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	<i>iucD</i>	239-259	
AERA as	CCTGATCCAGATGATGCTC	<i>iucD</i>	913-931	58
TSH s	GTGATAAACAAGTCGGCAACA	<i>tsh</i>	2992-3012	
TSH as	GCATTGAGACATCCATTCC	<i>tsh</i>	3778-3796	58

s = sense

as = antisense

Die folgenden Tabellen 4 und 5 geben einen Überblick über die in den jeweiligen Nachweissystemen eingesetzten Positivkontrollen sowie die in der DNS-DNS-Hybridisierung eingesetzten Negativkontrollen:

**Tab. 4** Liste der zur Evaluierung der Nachweissysteme verwendeten Referenz- und Kontrollstämme

Stamm	Serovar	Virulenzassoziierte Gene	Referenz
17-2	O3:H2	<i>astA, fyuA, irp2</i>	99, 110
H10407	O78:K80:H11	<i>astA, fyuA, irp2</i>	36, diese Arbeit
ATCC 9610	O8, Biovar 1b	<i>fyuA, irp2</i>	diese Arbeit
IMT 663	O78:K80	<i>tsh, iucD</i>	58
IMT 2467	O1:K1	<i>fimC, papC</i>	58
964660	O78	<i>hlyE</i>	92
5998	unbekannt	<i>stx2f</i>	98
IMT 2540	O1:H	<i>astA, fyuA, irp2, tsh, iucD, fimC, papC, iss</i>	diese Arbeit

**Tab. 5** Liste der in der DNS-DNS-Hybridisierung eingesetzten Negativkontrollen

Stamm	Serovar	Spezies	Herkunft (Tierart)
DSM 1104	unbekannt	<i>Staphylococcus aureus</i>	unbekannt
1166/00	unbekannt	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Huhn
705/1/00	unbekannt	<i>Salmonella pullorum</i>	Huhn
X491/1-99	unbekannt	<i>Campylobacter jejuni</i>	Huhn
BgVV607	unbekannt	<i>Campylobacter jejuni</i>	Geflügel
DSM 5283 CCUC24141	Serotyp A1	<i>Mannheimia haemolytica</i>	unbekannt
AFA 14	A (F2) 1:1280	<i>Pasteurella multocida</i>	Ziege

### 3.1.4.2 Oligonukleotid-Sonden für die DNS-DNS-Hybridisierung

Zum Nachweis der virulenzassoziierten Gene *astA*, *stx2f*, *fyuA*, *irp2*, *hlyE*, *iss*, *papC*, *fimC*, *iucD* und *tsh* in APEC-Stämmen wurden DNS-Sonden mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ hergestellt. Die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden entsprechend den Herstellerangaben des o. g. Kits durchgeführt. Als Template wurde die mittels „Master Pure Genomic DNA Purification Kit“ isolierte DNS der jeweiligen, in der Tabelle 4 aufgeführten Referenz- und Kontrollstämme verwendet, die Negativkontrollen sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Nach durchgeführter PCR wurden die markierten DNS-Sonden mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ aufgereinigt und anschließend durch die Firma AGOWA, Berlin, sequenziert. Die Sequenzanalyse und der Vergleich mit den bekannten Gensequenzen erfolgte mittels des HUSAR/GCG-Programmpakets (Biocomputing Unit des DKFZ-Heidelberg) oder mit dem Programm DNASIS<sup>TM</sup> (Hitachi Software Engineering Co., Ltd. San Francisco, USA).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Anzucht und Stammhaltung der Bakterien**

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte auf Gassner- sowie Blutagarplatten bei 37 °C. Jeweils eine Kolonie einer über Nacht (ü. N.) bebrüteten Blutagarplatte wurde in ein mit 5 ml LB-Medium gefüllten Reagenzröhrchen geimpft und bei 37 °C ü. N. unter Schütteln inkubiert. Von dieser Bakterienkultur wurden 1,3 ml entnommen, mit 0,5 ml Glycerin (Rotipuran<sup>®</sup>, Glycerol, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) vermischt und in einem 2 ml Cryo-Röhrchen (Cryovial<sup>®</sup>, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) bei -20 °C sowie -70 °C gelagert.

### **3.2.2 DNS-Isolierung**

#### **Hitze-Lyse**

Diese Methode ermöglicht es, auf einfache und schnelle Weise genomische DNS aus Bakterien zu gewinnen und in der Polymerase-Kettenreaktion einzusetzen. Eine Kolonie einer ü. N. bebrüteten LB-Agarplatte wurde in 5 ml LB-Medium geimpft und bei 37 °C ü. N. unter Schütteln inkubiert. 50 µl dieser Übernacht-Bouillon-Kultur wurden mit 150 µl A. bidest in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (Typ „safe-lock“, Eppendorf, Hamburg) überführt, gemischt und für 10 min in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) bei 100 °C gekocht. Nach anschließender kurzer Zentrifugation (30 sec, Raumtemperatur (RT), 16.000 x g) wurden 5,0 µl des Überstandes für einen 50 µl-PCR-Ansatz bzw. 2,0 µl für einen 25 µl-Multiplex-PCR-Ansatz als DNS-Template (Matrizen-DNS) eingesetzt.

### **3.2.3 Serotypisierung**

Die Serotypisierung beruht auf der An- oder Abwesenheit von Antigenen auf der Zelloberfläche (O-Antigene), von Geißeln (H-Antigene) und von Kapseln (K-Antigene) und deren Reaktion mit spezifischen Antisera.

Die APEC-Stämme wurden mittels Objektträger-Schnellagglutination auf das Vorhandensein der O-Gruppen O1, O2 und sowie des Serovars O78:K80 untersucht. Es wurden die entsprechenden koagulierenden Reagenzien (KR) von *E. coli* vom Geflügel verwendet (BVTECH, BioVac Company, Beaucozé, Frankreich). Hierzu wurden ein Tropfen physiologische Kochsalzlösung sowie ein Tropfen der jeweiligen KR auf einen Objektträger gegeben. Eine Öse Kulturmaterial wurde in der physiologischen Kochsalzlösung

verrieben und anschließend vorsichtig mit dem Serum breitflächig vermischt. Der Objektträger wurde dann vorsichtig geschwenkt. Nach ca. 20 sec konnte das Ergebnis, im positiven Fall eine Schlierenbildung, abgelesen werden.

### 3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein bestimmter DNS-Bereich *in vitro* enzymatisch mittels zweier Oligonukleotid-Primer sowie der Taq-DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert.

Als Template-DNS wurde chromosomale DNS verwendet, die mittels Hitzelyse (s. Punkt 3.2.2) isoliert wurde. Nach erfolgter thermischer Denaturierung der Template-DNS binden die Primer, kurze synthetisch hergestellte Oligonukleotide (18-26mer), bei entsprechenden Annealing-Temperaturen an die komplementären DNS-Einzelstrangbereiche. Mithilfe der Taq-DNA-Polymerase findet dann die Elongation statt, wobei die Länge des Amplifikates exakt dem Abstand der beiden Primer entspricht. Da jedes Amplifikat eine neue Matrizen-DNS darstellt, werden bis zu  $2^{28}$  Kopien (bei 30 Zyklen) der ursprünglichen DNS synthetisiert [7].

Der auf Eis pipettierte Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 µl	10 x PCR Puffer
2,5 mM	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
0,2 mM each	dNTPs
10 pmol	je Reaktionsprimer
0,5 U	Taq DNA Polymerase
5,0 µl	Template DNS
ad 50 µl	A. bidest

Der PCR-Ansatz wurde nach Schütteln kurz hochtourig zentrifugiert und in den auf 94 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Die Programme des Thermocyclers für die jeweils eingesetzten Primer sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tab. 6: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktionen zum Nachweis von virulenzassoziierten Genen in APEC-Stämmen**

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen			Zykluszahl
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
<i>astA</i>	EAST-1 s / EAST-1 as	94 °C, 40''	50 °C, 80''	72 °C, 60''	25
<i>stx2f</i>	STX2f s / STX2f as	94 °C, 30''	57 °C, 60''	72 °C, 60''	30
<i>fyuA</i>	FYUA s / FYUA as	94 °C, 60''	65 °C, 60''	72 °C, 60''	30
<i>irp2</i>	HMWP-2 s / HMWP-2 as	94 °C, 60''	55 °C, 60''	72 °C, 60''	30
<i>hlyE</i>	HLYE s / HLYE as	94 °C, 60''	52 °C, 60''	72 °C, 60''	30
<i>iss</i>	ISS s / ISS as	94 °C, 60''	58 °C, 60''	72 °C, 60''	30
<i>papC</i>	PAPC s / PAPC as	94 °C, 60''	59 °C, 60''	72 °C, 90''	30
<i>fimC</i>	FIMC s / FIMC as	94 °C, 60''	59 °C, 60''	72 °C, 90''	30
<i>iucD</i>	AERA s / AERA as	94 °C, 60''	55 °C, 60''	72 °C, 60''	30
<i>tsh</i>	TSH s / TSH as	94 °C, 60''	55 °C, 60''	72 °C, 60''	30

s = sense  
as = antisense

Um mehrere für die Kolibazilliose relevante virulenzassoziierte Gene nachzuweisen, wurde eine Multiplex-PCR etabliert. Diese ermöglicht es, mit nur einem PCR-Ansatz zwei und mehr DNS-Fragmente gleichzeitig zu identifizieren. Folgende Primerpaare (sense und antisense) wurden zum Nachweis der entsprechenden Gene in der Multiplex-PCR eingesetzt: EAST, ISS, HMWP-2, PAPC, AERA sowie TSH. Die entsprechenden Sequenzen, Lokalisationen und Referenzen sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Der Reaktionsansatz für die Multiplex-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	10 x PCR Puffer
4,0 mM	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
0,8 mM each	dNTPs
20 pmol	je Reaktionsprimer
2,5 U	<i>Taq</i> DNA Polymerase
2,0 µl	Template DNS
ad 25 µl	A. bidest

Der Ansatz für die Multiplex-PCR wurde nach Schütteln kurz hochtourig zentrifugiert und in den auf 94 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt.

Programm des Thermocyclers:

<b>Schritt 1</b>	Denaturierung der doppelsträngigen DNS	94 °C	4 min
<b>Schritt 2</b>	Denaturierung der doppelsträngigen DNS	94 °C	30 sec
<b>Schritt 3</b>	Anlagerung der Primer an den DNS-Einzelstrang -Annealing-	58 °C	30 sec
<b>Schritt 4</b>	Extension – Amplifikation	68 °C	3 min
<b>Schritt 2 – 4 25x</b>			
<b>Schritt 5</b>	Extension	72 °C	10 min

Zur Ermittlung und Identifizierung der Fragmentgröße wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (s. Punkt 3.2.5).

### 3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und sehr effektive Methode, DNS-Fragmente zu separieren, identifizieren und aufzureinigen; diese werden nach ihrer Größe aufgetrennt.

1,0–1,5 g Agarose wurde durch Aufkochen in 100 ml 1 x TBE gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55 °C und Zugabe von 1 µl einer Ethidiumbromidlösung (1%-ig) zum Zwecke der Sichtbarmachung der DNS-Banden auf einem UV-Tisch wurde die flüssige Agarose in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Probenaschenkamm mit 12 bis 24 Taschen befand. Nach dem Erhärten wurde das Gel in die entsprechende, mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Nachdem 10 µl des PCR-Produktes, vermischt mit 2 µl der Stop-Lösung, sowie der 100 bp DNA Ladder (Life Technologies<sup>TM</sup>, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) in die einzelnen Probenaschen pipettiert worden waren, wurde ein elektrisches Feld von 90 V für 90 min bzw. 120 min (Multiplex-PCR) an die Elektrophoresekammer angelegt. Anschließend wurden die DNS-Banden mittels eines Transilluminators (s. Punkt 3.1.2) visualisiert und fotografiert.

### 3.2.6 Contour-clamped homogeneous electric field – Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE)

Diese Methode beschreibt ein Verfahren, mit welchem *E. coli*-Stämme unterhalb der Speziesebene typisiert werden können.

Von einer 5 ml Übernacht-Kultur der *E. coli*-Isolate in LB-Bouillon (37 °C, Schüttelinkubator) wurden 1 ml entnommen. Anschließend wurde unter Zugabe einer 0,9%-igen Kochsalzlösung photometrisch eine optische Dichte OD<sub>600nm</sub> von 1,0 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 1,5 ml in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1,0 ml sowie nach erneuter Zentrifugation in 0,5 ml Kochsalzlösung resuspendiert. Nach der Zugabe dieser 500 µl Bakteriensuspension zu 750 µl einer 1,2%-igen, auf ca. 56 °C temperierten Agarose (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad, München) und guter Durchmischung wurden ca. 100 µl zügig und ohne Bildung von Luftblasen in die entsprechenden Gießformen für Agaroseblöckchen pipettiert. Nachdem die Blöckchen erstarrt waren, wurden sie vorsichtig aus der Gießschablone entfernt und jeweils in 500 µl ESP-Lösung mit 1,8 mg/ml Proteinase K bei 56 °C für 24 h im Wasserbad inkubiert.

Die so in den Agaroseblöckchen freigesetzte und der nachfolgenden Restriktion zugänglich gemachte DNS wurde am nächsten Tag dreimal mit jeweils 14 ml TE-Puffer bei 4 °C unter vorsichtigem Schwenken in einen 100 ml Erlenmeyerkolben jeweils 90 min gewaschen. Anschließend wurden die Blöckchen halbiert und entweder unmittelbar für die Restriktion vorbereitet oder in TE-Puffer bei 4 °C gelagert. Zur Durchführung des DNS-Restriktionsendonuklease-Verdau wurde jeweils ein halbiertes Gelblöckchen in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur 30 min in 600 µl Enzympuffer für *Xba*I inkubiert. Anschließend wurde der Enzympuffer entnommen und die halbierten Blöckchen wurden nach erneuter Zugabe von 150 µl des Enzympuffers vermischt mit 20 Einheiten des Enzyms *Xba*I (Qbiogene, Heidelberg) über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach Beendigung der Restriktion wurden die Blöckchen vorsichtig mit einem Spatel in die Taschen eines 1%-igen Agarosegels überführt. Die Taschen wurden mit der entsprechenden Agarose versiegelt. Die elektrophoretische Auftrennung der restringierten DNS-Fragmente wurde in einer Contour-clamped homogeneous-electric field-Kammer



(CHEF DR III; BioRad, München) in 0,5 x TBE unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Laufzeit: 22 h; Temperatur: 14 °C; Winkel: 120 °; Spannung: 6 V; Pulszeit: 5–50 sec. Die Auswertung erfolgte nach 20-minütiger Färbung in einer Ethidiumbromidlösung mit anschließender Wässerung in A. bidest und Photographieren der Gele unter UV-Licht (Transilluminator TI, Biometra, Wiesbaden; Photo-Kamera Polaroid MP4+ Instant Camera System). Die Verwandtschaftsanalyse, basierend auf den Positionen der DNS-Banden, wurde mit dem Computerprogramm Gelcompar® (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Belgien; Herolab, Wiesloch) durchgeführt.

### **3.2.7 DNS-DNS-Hybridisierung**

Mit Hilfe der DNS-DNS-Hybridisierung lassen sich gleiche oder sehr ähnliche Sequenzen der zu untersuchenden Nukleinsäure und der markierten Sonden nachweisen.

Durch den Hybridisierungsvorgang kommt es zu einem Kontakt zwischen einer DNS-Sonde und der auf der Membran gebundenen denaturierten DNS, so dass die Sonde während der Inkubation an die entsprechenden übereinstimmenden Bereiche bindet. Es bilden sich sogenannte „Hybrid-Moleküle“, die nach Entfernung der nicht gebundenen DNS-Sonde sichtbar gemacht werden können (s. Punkt 3.2.7.3).

#### **3.2.7.1 Dot-Blot**

Für die Herstellung eines Dot-Blot wurden 2 ml einer 5 ml Übernacht-Kultur in LB-Bouillon (37 °C, Schüttelinkubator) in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß (Typ „safe-lock“, Eppendorf, Hamburg) überführt und 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde anschließend in 1 ml sowie nach erneuter Zentrifugation in 200 µl A. bidest resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde 10 min bei 100 °C im Wasserbad gekocht und danach sofort auf Eis gestellt. Von dieser bakteriellen DNS wurden 3 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) punktförmig aufgetropft. Nach kurzer Trocknung der Membran wurde die DNS anschließend durch Inkubation bei 120 °C für 30 min fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **3.2.7.2 Sondenherstellung mittels PCR**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNS-Sonden wurden durch den Einbau von Dig-dUTP im Rahmen einer PCR markiert. Die Markierung wurde unter Verwendung eines „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Mittels einer Agarosegelelektrophorese wurde festgestellt, ob die Markierung der Sonden erfolgreich durchgeführt wurde, da das Laufverhalten des markierten Amplifikates gegenüber dem nicht markierten verändert ist.

### **3.2.7.3 Hybridisierungsvorgang und Visualisierung**

Der Hybridisierungsvorgang und die Visualisierung wurden entsprechend den Vorschriften des „DIG Luminescent Detection Kit“ durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien und Puffer sind unter Punkt 3.1.3.3.4 aufgeführt.

Die hybridisierten DNS-Blots wurden in Zellophanfolie verpackt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Anschließend wurden sie in einer lichtdichten Filmkassette je nach verwendeter Sonde zwischen 30 min und 3 h exponiert. Anhand der Schwärzung der Röntgenfilme konnte die Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen werden.