

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Partielle COI-Sequenzen von *A. perfoliata*, *P. mamillana* und *M. expansa* nach Sequenzanalyse

Partielle COI-Sequenz von *Anoplocephala perfoliata*

```

1   TTTTTTGGGC ATCCTGAGGT TTATGTTTTG ATTTTGCCCG GTTTTGGGGT
51  AATAGGACAT ATTTGTTGAT GTATGAGAGC TGCTTCGGAT GTTTTTGGAT
101 TTTATGGGTT ATTATTTGCT ATGTTTTCTA TTGTGTGTTT GGGTAGTAGA
151 GTTTGAGGGC ATCATATGTT TACTGTGGGT TTGGATGTTA AGACTGCTGT
201 TTTTTTTAGA TCTGTTACTA TGATTATAGG GGTACCCACA GGTATTAAGG
251 TGTTTACTTG GTTGATATAT CTAATGAATT CTAATGTTAG TAAGTGGGAT
301 CCTGTTTTGT GGTGATTGAT TTCGTTTATA GTTCTTTTTA CGTTTGGTGG
351 TGTTACTGGT ATAGTATTAT CTGCTTGTGT TCTTGATAAA GTTTTACATG
401 AACTTTGATT TGTTGTAGCA CATTTCATT ATG

```

Länge der Sequenz: 433 bp

Partielle COI-Sequenz von *Paranoplocephala mamillana*

```

1   TTTTTTGGGC ATCCTGAGGT TTATGTTTTA ATTTTACCAG GGTTTGGTAT
51  AATAGGGCAT ATTTGTTTGA GTTTAAGTAT GATGTCAGAT GTGTTTGGAT
101 TCTATGGTTT ATTATTTGCG ATGTTTTCTA TCGTGTGTTT AGGTAGTAGG
151 GTTTGAGGCC ATCACATGTT TACAGTGGGT CTTGTTGTTA AGACAGCTGT
201 CTTTTTTAGT TCTGTTACTA TGATTATAGG GGTACCAACT GGCATAAAGG
251 TATTTACATG ATTGTACATG TTATTA AAAAT CTAGAGTTAG AAAGAGAGAA
301 CCGATTTTAT GGTGGATAGT CTCCTTTATA GTTCTTTTTA CATTGGTGG
351 GGTAACTGGC ATTGTATTAT CTGCTTGTGT GTTGGATAAT ATTTTACATG
401 AACTTTGATT TGTTGTTGCG CATTTCATT ATG

```

Länge der Sequenz: 433 bp

Die dem spezifischen Primer AP 67L/341R komplementären Regionen sind fett hervorgehoben. Unterstrichen sind die Regionen, die dem spezifischen Primer AP 72L/341R komplementär sind, da diese dem Primer AP 67L/341R bis auf vier fehlende

Basen am 5'-Ende und vier zusätzliche Basen am 3'-Ende gleichen. Ein Vergleich der Anordnung der einzelnen Basen von *A. perfoliata* und *P. mamillana* ergab eine Übereinstimmung von 83 %.

Partielle COI-Sequenz von *Moniezia expansa*

```

1   TTTTTTGGGC  ATCCTGAGGT  TTATGTTTTA  ATTATTCCAG  GGTTTGGTAT
51  GATTAGCCAT  ATATGTTTTA  GTTAAAGAAT  GGTGTCTGAT  GTTTTTGGAT
101 TTTATTGGTTT  GTTGTTTGCT  ATGTTTGCTA  TTGTGTGCCT  TGGTAGAAGT
151 GTTTGGGGGC  ATCATATGTT  TACTGTTGGT  TTAGATGTGA  AGACGGCGGT
201 ATTTTTTAGT  TCTGTTACTA  TGATTATTGG  TGTGCCTACT  GGTATAAAGG
251 TGTTTACTTG  ATTGTACATG  TTATTGAAAT  CTAAAGTGAG  GAAGTGAGAT
301 CCAGTGTTGT  GGTGAGTGAT  TTCTTTTATA  GTTCTTTTTA  CTTTTGGCGG
351 TGTTACTGGT  ATTATTTTAT  CTGCTTGTGT  GTTAGATAAA  ATATTACATG
401 ATACTTGAT

```

Länge der Sequenz: 409 bp

Die partielle COI-Sequenz vom *M. expansa* wurde bestimmt, um deren Basenabfolge und Länge mit den COI-Sequenzen von *A. perfoliata* und *P. mamillana* zu vergleichen, da vermutet wurde, dass sich diese sehr ähnlich sind. Es stellte sich jedoch heraus, dass die COI-Sequenzlänge von *M. expansa* nur 409 bp beinhaltet. Der Sequenzunterschied gegenüber *A. perfoliata* liegt bei 65 Basen und gegenüber *P. mamillana* bei 67 Basen.

## 4.2 Primerkonstruktion

Mit einem zum Design von Primern entwickelten Computerprogramm (Oligos<sup>®</sup> 1999-2002, Version 9.4) wurden für die Amplifikation der variablen Region des COI-Gens von *A. perfoliata* und *P. mamillana* spezifische Primer konstruiert.

Die zu konstruierenden Primer sollten außerhalb der COI-Primersequenzen liegen und ihre Länge sollte 20 - 30 Basen nicht überschreiten. Basenwiederholungen sollten vermieden werden. Die vier Basen sollten im gleichen Verhältnis zueinander im Primer vorhanden sein. In Anlehnung an die COI-Primer sollte die theoretische Schmelztemperatur bei ca. 50 °C liegen. Die Primerpaare sollten an den 3'-Enden weder

inter- noch intramolekular komplementär sein. Dies verhindert die Bildung von Primerdimeren, welche auftreten können, wenn die DNA-Polymerase den einen Primer komplementär zum anderen Primer oder sich selbst synthetisiert, wodurch ein kurzes falsches DNA-Stück entstehen kann.

Nachdem das Oligos<sup>®</sup>-Programm mehrere mögliche Primerpaare konstruiert hatte, die die oben genannten Bedingungen erfüllten, wurden die Primerpaare ausgewählt, die große Unterschiede in ihrer Basenabfolge untereinander besaßen. Wichtig war außerdem, dass sie für unterschiedliche Produktlängen synthetisieren, um den Nachweis in der Gelelektrophorese zu vereinfachen. Synthetisiert wurden diese Primer von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland).

Tabelle 4: Sequenzdaten und Schmelztemperatur des Primers zur Amplifikation von *Anoplocephala perfoliata* (AP 67L/341R)

Primer	Länge [bp]	Sequenz	Produkt [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
<b>AP 67L</b>	21	<b>TGATGTATGAGAGCTGCTTCG</b>	294	50,6
<b>AP 341R</b>	20	<b>ACCAGTAACACCACCAAACG</b>		50,2

Tabelle 5: Sequenzdaten und Schmelztemperatur des Primers zur Amplifikation von *Anoplocephala perfoliata* (AP 72L/341R)

Primer	Länge [bp]	Sequenz	Produkt [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
<b>AP 72L</b>	20	<b>TATGAGAGCTGCTTCGGATG</b>	289	51,1
<b>AP 341R</b>	20	<b>ACCAGTAACACCACCAAACG</b>		50,2

Tabelle 6: Sequenzdaten und Schmelztemperatur des Primers zur Amplifikation von *Paranoplocephala mamillana* (PM 26L/346R)

Primer	Länge [bp]	Sequenz	Produkt [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
<b>PM 26L</b>	21	<b>TTTTAATTTTACCAGGGTTTG</b>	340	51,2
<b>PM 346R</b>	20	<b>ACAATGCCAGTTACCCACC</b>		53,9

### 4.3 Optimierung der PCR für die spezifischen Primer

#### 4.3.1 MgCl<sub>2</sub>-Konzentration

Im allgemeinen verringert eine ungenügende Mg<sup>2+</sup>-Konzentration die Produktausbeute in der PCR, während überschüssige Mg<sup>2+</sup>-Ionen die Bildung unspezifischer Produkte fördern. In mehreren Versuchsdurchläufen wurden Konzentrationen von 1,5 - 3,0 mM getestet. Eine Konzentration von 2,5 mM bzw. 3,0 mM erwies sich als optimal (siehe Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12).

#### 4.3.2 Primer-Anlagerungs- (Annealing) Temperatur

Die Höhe der Bindungstemperatur des spezifischen Primers lässt sich auf Basis seiner Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) abschätzen. Die ideale Temperatur sollte etwa 3 - 4 °C über der errechneten Schmelztemperatur liegen. Mit einer Versuchsreihe wurden Annealing-Temperaturen zwischen 50 °C und 60 °C getestet. Eine Temperatur von 54 °C erwies sich als optimal (siehe Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12). Die mit dem Programm Oligos<sup>®</sup> bestimmten Annealing-Temperaturen lagen nur wenige Grad (50,6 °C für AP-Primer und 50,9 °C für PM-Primer) unterhalb der empirisch ermittelten Annealing-Temperatur.

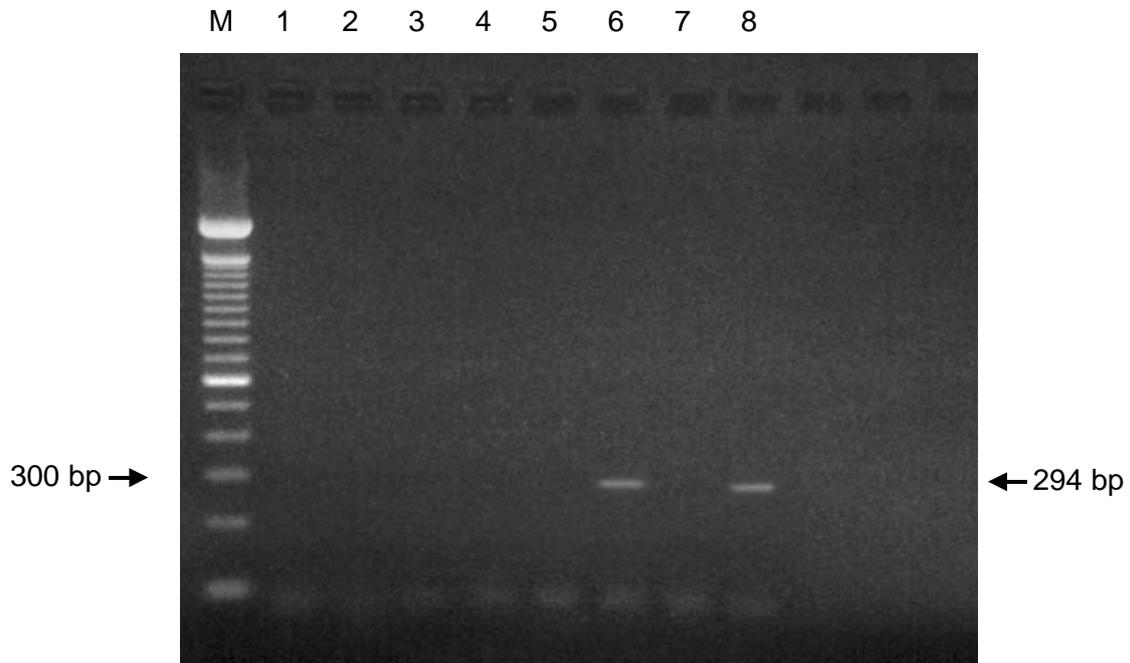


Abbildung 10: Test zur Optimierung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und Annealing-Temperatur für den spezifischen Primer AP 67L/341R

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H <sub>2</sub> O
2	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide; 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 52 °C
3	H <sub>2</sub> O
4	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide; 3,0 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 52 °C
5	H <sub>2</sub> O
6	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide; 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 54 °C
7	H <sub>2</sub> O
8	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide; 3,0 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 54 °C

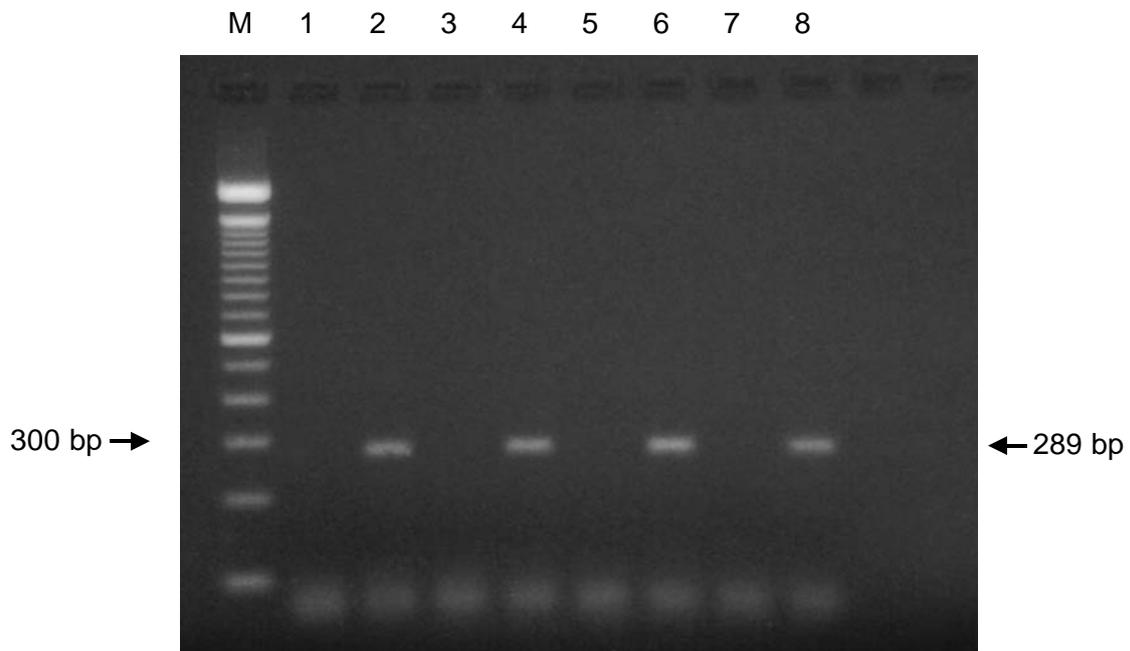


Abbildung 11: Test zur Optimierung der  $MgCl_2$ -Konzentration und Annealing-Temperatur für den spezifischen Primer AP 72L/341R

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H <sub>2</sub> O
2	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide; 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 52 °C
3	H <sub>2</sub> O
4	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide; 3,0 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 52 °C
5	H <sub>2</sub> O
6	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide; 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 54 °C
7	H <sub>2</sub> O
8	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide; 3,0 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 54 °C

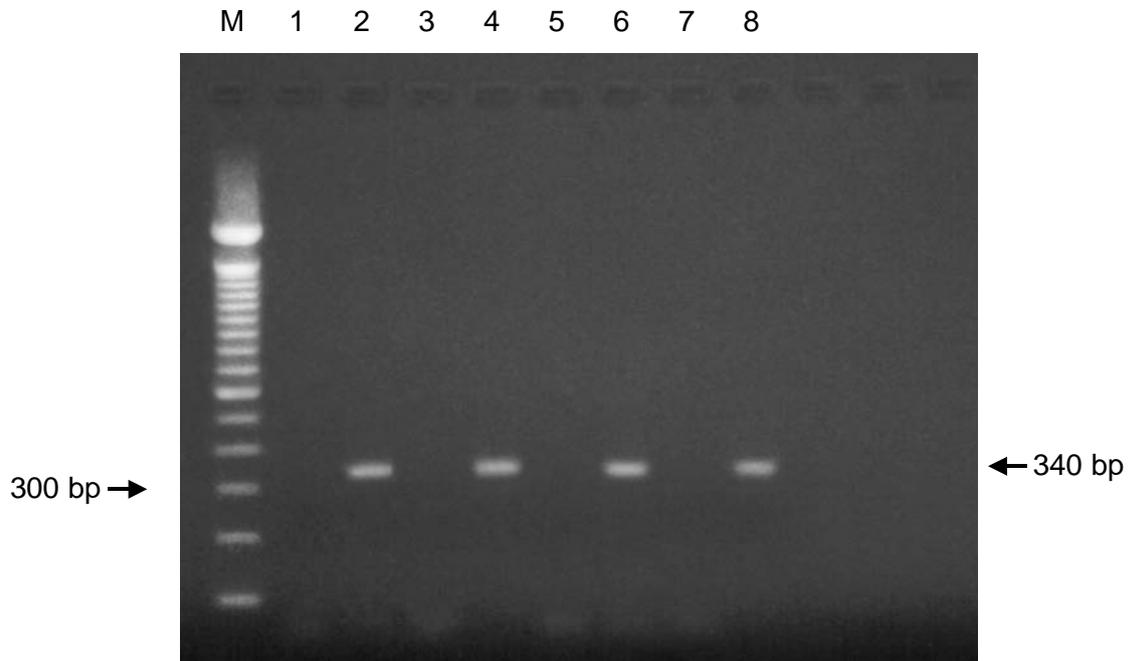


Abbildung 12: Test zur Optimierung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und Annealing-Temperatur für den spezifischen Primer PM 26L/346R

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H <sub>2</sub> O
2	<i>P. mamillana</i> -Proglottide; 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 52 °C
3	H <sub>2</sub> O
4	<i>P. mamillana</i> -Proglottide; 3,0 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 52 °C
5	H <sub>2</sub> O
6	<i>P. mamillana</i> -Proglottide; 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 54 °C
7	H <sub>2</sub> O
8	<i>P. mamillana</i> -Proglottide; 3,0 mM MgCl <sub>2</sub> ; Ann. Temp. 54 °C

#### 4.4 Bestimmung der analytischen Spezifität und Sensitivität des AP-Primers 72L/341R für *Anoplocephala perfoliata*

Das Primerpaar AP 72L/341R wurde auf seine Spezifität gegenüber der Ziel-DNA (*A. perfoliata*) und DNA anderer beim Pferd vorkommenden Zestoden (*P. mamillana*), Trematoden (*F. hepatica*) und Nematoden (kleine Strongyliden, Oxyuren, *P. equorum*) überprüft. Des Weiteren wurden die Primer auf Kreuzreaktivität gegenüber *M. expansa*, ein besonders bei Schafen vorkommender Bandwurm, und DNA-Extrakten aus Vollblut und Gewebe vom Pferd untersucht.

In Abbildung 13 ist das für *A. perfoliata* spezifische Amplifikationsprodukt von 289 Basenpaaren zu erkennen. Kreuzreaktionen mit der DNA von anderen Zestoden (*P. mamillana* und *M. expansa*) und Nematoden (kleine Strongyliden, Oxyuren, *P. equorum*) liegen nicht vor.

In der Abbildung 14 sind im Slot 4 und 7 spezifische Produkte zu sehen, da innerhalb eines PCR-Ansatzes beide Primer auf Kreuzreaktion mit der DNA von *F. hepatica* getestet wurden. Das spezifische Produkt im Slot 4 ist *A. perfoliata*-DNA mit 289 Basenpaaren. Slot 7 hingegen zeigt *P. mamillana*-DNA mit einer Länge von 340 Basenpaaren. Auch hier liegt für keinen der Primer eine Kreuzreaktion mit Trematoden (*F. hepatica*) vor.

Insgesamt ergab sich damit für *A. perfoliata* eine analytische Spezifität von 100 %.

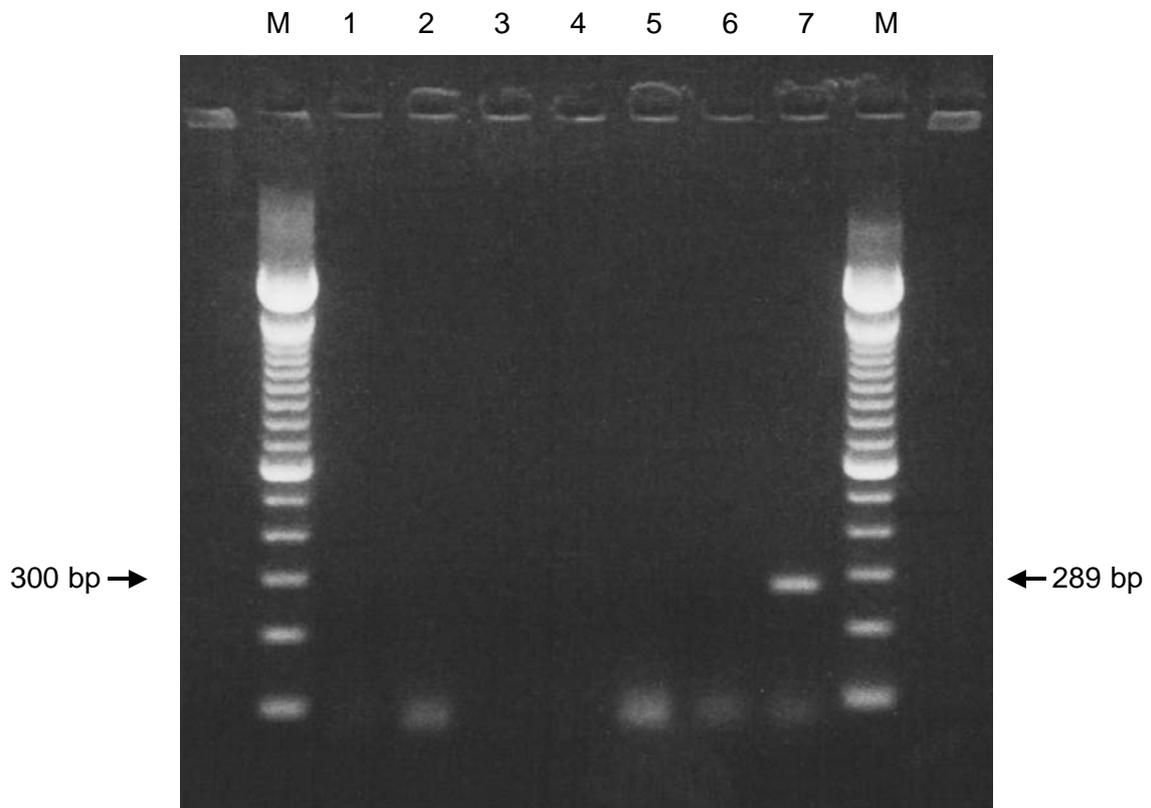


Abbildung 13: Bestimmung der analytischen Spezifität des Primers AP 72L/341R gegenüber DNA von Zestoden (*A. perfoliata* und *P. mamillana*) und Nematoden (kl. Strongyliden, Oxyuren und *P. equorum*) des Pferdes und Zestoden (*M. expansa*) des Schafes

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H <sub>2</sub> O
2	kl. Strongyliden-DNA
3	Oxyuren-DNA
4	<i>P. equorum</i> -DNA
5	<i>M. expansa</i> -DNA
6	<i>P. mamillana</i> -DNA
7	<i>A. perfoliata</i> -DNA; Positivkontrolle
M	100 bp Marker

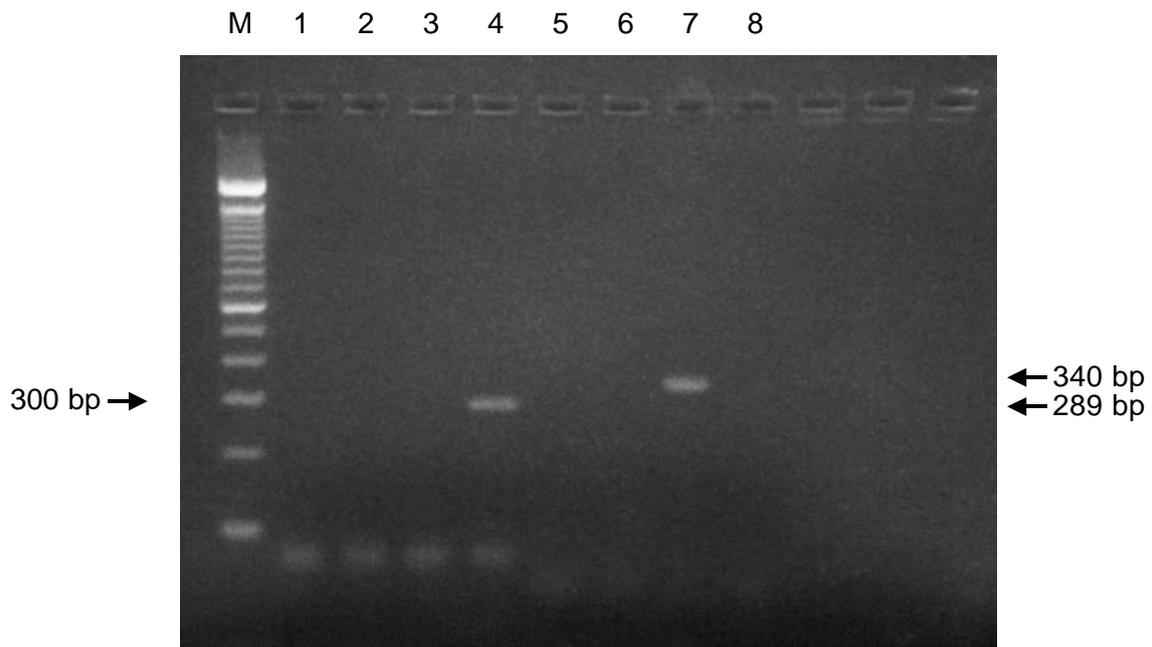


Abbildung 14: Bestimmung der analytischen Spezifität der Primer AP 72L/341R und PM 26L/346R gegenüber der DNA von Zestoden (*A. perfoliata* und *P. mamillana*) und Trematoden (*F. hepatica*) des Pferdes

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H <sub>2</sub> O
2	<i>F. hepatica</i> -DNA mit AP-Primer
3	<i>F. hepatica</i> -DNA mit AP-Primer
4	<i>A. perfoliata</i> -DNA; Positivkontrolle
5	<i>F. hepatica</i> -DNA mit PM-Primer
6	<i>F. hepatica</i> -DNA mit PM-Primer
7	<i>P. mamillana</i> -DNA; Positivkontrolle
8	H <sub>2</sub> O

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität wurde aus einer Probe bekannter DNA-Konzentration von *A. perfoliata*, eine kombinierte geometrische Verdünnungsreihe ( $10^n$ ,  $2^n$ ) untersucht (Abbildung 15). Als Ausgangs-DNA diente das Extrakt einer

*A. perfoliata*-Proglottide, deren DNA-Gehalt vorher mit dem Spektralphotometer bestimmt wurde. Für *A. perfoliata* ergab sich eine Nachweisgrenze von ca. 12,5 pg DNA.

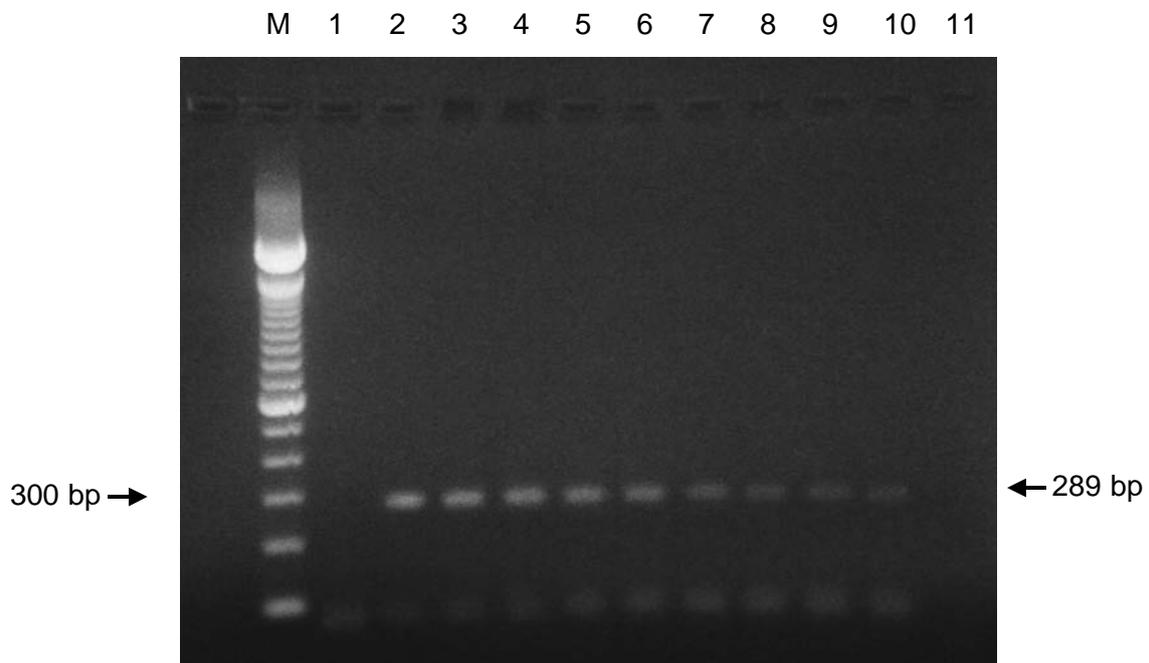


Abbildung 15: Bestimmung der analytischen Sensitivität des Primers AP 72L/341R anhand einer Verdünnungsreihe von *A. perfoliata*-DNA

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H <sub>2</sub> O
2	20 ng von <i>A. perfoliata</i> -DNA
3	10 ng von <i>A. perfoliata</i> -DNA
4	5 ng von <i>A. perfoliata</i> -DNA
5	2,5 ng von <i>A. perfoliata</i> -DNA
6	1,25 ng von <i>A. perfoliata</i> -DNA
7	100 pg von <i>A. perfoliata</i> -DNA
8	50 pg von <i>A. perfoliata</i> -DNA
9	25 pg von <i>A. perfoliata</i> -DNA
10	12,5 pg von <i>A. perfoliata</i> -DNA
11	6,25 pg von <i>A. perfoliata</i> -DNA



Die Spezifitätstestung des PM-Primers erfolgte analog der Untersuchung des AP-Primers.

Auch hier ergibt sich nur in der Spur 7 für die DNA von *P. mamillana* ein spezifisches Produkt von 340 Basenpaaren. Insgesamt liegt die analytische Spezifität des PM-Primers ebenfalls bei 100 %.

Die durch die Verdünnungsreihe bestimmte analytische Sensitivität des PM-Primers ergab für *P. mamillana* eine Nachweisgrenze von lediglich 1,6 pg DNA.

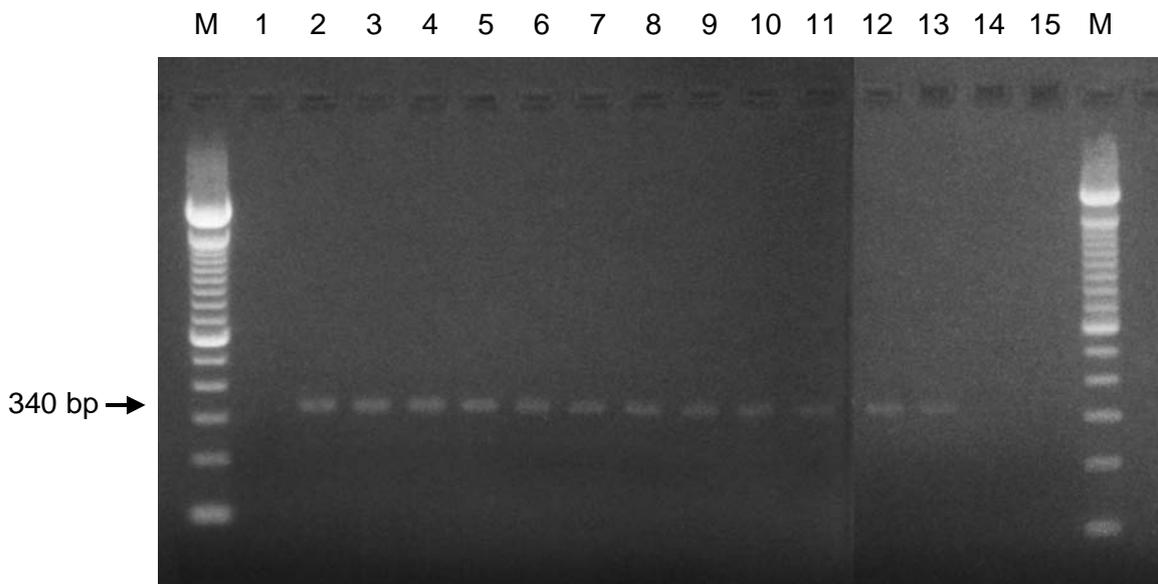


Abbildung 17: Bestimmung der analytischen Sensitivität des Primers PM 26L/346R anhand einer Verdünnungsreihe von *P. mamillana*-DNA

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H <sub>2</sub> O
2	16 ng von <i>P. mamillana</i> -DNA
3	8 ng von <i>P. mamillana</i> -DNA
4	4 ng von <i>P. mamillana</i> -DNA
5	2 ng von <i>P. mamillana</i> -DNA
6	1 ng von <i>P. mamillana</i> -DNA
7	100 pg von <i>P. mamillana</i> -DNA

Lauf	Probe
8	50 pg von <i>P. mamillana</i> -DNA
9	25 pg von <i>P. mamillana</i> -DNA
10	12,5 pg von <i>P. mamillana</i> -DNA
11	6,25 pg von <i>P. mamillana</i> -DNA
12	3,13 pg von <i>P. mamillana</i> -DNA
13	1,56 pg von <i>P. mamillana</i> -DNA
14	0,78 pg von <i>P. mamillana</i> -DNA
15	H <sub>2</sub> O
M	100 bp Marker

#### 4.6 Nachweis von Bandwurm-DNA im Pferdekot mittels AP- und PM-Primer

Die Extraktion von *A. perfoliata*-DNA aus einer Pferdekotprobe erfolgte wie unter den Punkten 3.1.3 und 3.1.4.3 beschrieben. Nach der Amplifikation und anschließender Gelelektrophorese lag nur einmalig ein positives Ergebnis vor. Dieses war auch nach mehreren Versuchsdurchläufen in dieser Form nicht mehr reproduzierbar.

In weiteren Versuchen wurde während der Extraktion die Anzahl der Waschvorgänge mit Waschpuffern verdoppelt, um im Kot vorhandene Proteasen sicher zu entfernen. Dieses Verfahren als auch die Zugabe von Chelex<sup>®</sup> 100 Resin (20 %) führten zu keinem positiven Ergebnis.

Auch die Verringerung und Vergrößerung der im QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit vorgegebenen DNA-Menge brachte keinen Erfolg.

Während der Vorbereitung der Kotproben wurde eine definierte, aufgereinigte Menge *A. perfoliata*-DNA dem Kotansatz zugemischt, was ebenfalls zu keinem spezifischen Amplifikat führte.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von einer durch Extraktion gewonnenen und definierten Menge *A. perfoliata*-DNA direkt in den PCR-Ansatz. Auch hier zeigten sich in der Gelelektrophorese keine Banden.