

3 Material und Methoden

3.1 *Material*

3.1.1 Untersuchungsgut

Insgesamt wurden 366 Kotproben von Tauben (*Columba livia* dom.) untersucht, die sich aus 4 verschiedenen Gebieten rekrutierten. Der größte Teil (250) der Sammelkotproben stammte aus Brieffaubenschlägen, deren Besitzer ihren Bestand im Veterinäruntersuchungslabor des Tierärztlichen Institutes in Göttingen auf Salmonellen- und Parasitengehalt untersuchen lassen. Diese Proben (mit B bezeichnet) wurden in den Zeiträumen von November 1996 bis Januar 1997 und von April 1997 bis Juli 1997 gesammelt. In diesem Untersuchungsgut sind auch Kotproben von drei an Diarrhoe erkrankten Brieffauben enthalten, die mit D gekennzeichnet sind. Die übrigen 116 Proben verteilen sich auf 26 Sammelkotproben von Rasse-tauben (R), die zwischen September und November 1997 ebenfalls zur Routineuntersuchung auf Salmonellen- und Parasitenbefall in das Veterinäruntersuchungslabor des Tierärztlichen Institutes gesandt wurden. Das Einzugsgebiet für das genannte Untersuchungsgut liegt in Südniedersachsen, Nordhessen und im nordwestlichen Thüringen. 40 Kotproben stammten von Einzeltieren (A), die am 9. Dezember 1997 in Dortmund auf der 79. Nationalen Rassegeflügelschau ausgestellt waren. Die dort ausgestellten Tiere stammten aus dem gesamten Bundesgebiet. 50 Sammelkotproben waren von verwilderten Haustauben aus der Kasseler Innenstadt. Diese Proben wurden am 21. September 1998 gewonnen und mit KS bezeichnet.

3.1.2 Bakterienstämme

Zur Evaluierung der Nachweissysteme wurden die in Tab. 3 aufgeführten Kontroll- und Referenzstämme verwendet.

Tab. 3 : Referenz –und Kontrollstämme

Stamm	Serovar	Virulenzfaktoren / - Gene	Herkunft	Referenz/ Quelle
413/89	O26:H-	<i>stx1, eae, hly_{EHEC}</i>	Kalb	WIELER et al., 1992a
HUS-2/85	O111:H-	<i>stx1</i>	Mensch	BÖHM and KARCH, 1992
570/89	O111:H-	<i>stx1, eae, espB, hly_{EHEC}</i>	Kalb	WIELER et al., 1992a
E57	O138:K81	<i>stx2e, est-la</i>	Schwein	MEYER and KARCH, 1989
F107/86	O139:K12:H1	<i>stx2e, fedA</i>	Schwein	BERTSCHING- ER et al., 1990
EDL933	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae, hly_{EHEC}</i>	Mensch	O`BRIEN et. al., 1983
W34	K12	<i>stx2</i>	Labor	JACKSON et al., 1987
B 94/1	?	<i>stx2f, eae</i>	Taube	Diese Studie
C600	K12	-	Labor	CALDERWOOD et al., 1987

3.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Gibco BRL Life technologies, Schottland und Oxoid, Wesel bezogen.

3.1.4 Geräte

Brutschrank (Heraeus, Hannover)

Eagle Eye™ II (Fa. Stratagene, Heidelberg)

Elektrophoresekammern für Agarosegele (Fa. MWG Biotech, Ebersberg)

Entwicklermaschine Curix 60 (Fa. Agfa-Gevaert, Leverkusen)

Magnetrührer IKAMAG RCTbasic (Fa. Janke und Kunkel IKA Labortechnik, Staufen)

Megafuge 1.0 R (Fa. Heraeus, Hannover)

Metallblock-Thermostat 2103 (Fa. Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)

Power Supply für Elektrophorese EPS 3500 (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg)

Schüttelgerät (Janke und Kunkel, Stauffen)

Schüttelinkubator ITE (Fa. Infors, Schweiz)

Thermocycler Omni Gene (Fa. Hybaid Limited, Großbritannien)

Thermostat 5320 (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Tischzentrifuge 5417R (Fa. Eppendorf, Hamburg)

UV-Transilluminator (312 und 366 nm) (Fa. Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)

Vortex Genie 2 (Fa. Scientific industries, USA)

3.1.5 Kulturmedien

Tryptische Sojabouillon (Fa. Gibco BRL Life technologies, Schottland)

Zur Selektivanreicherung zum Nachweis von STEC

Tryptische Sojabouillon	30,0 g
Gallensalze Nr. 3	1,5 g
Dikaliumhydrogenphosphat	1,5 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

MacConkey- Agar (Fa. Oxoid, Wesel, Deutschland)Dient der Selektion von *E. coli* für die Kolonie- bzw. Replika-Blots

Pepton aus Casein	17,0 g
Pepton aus Fleisch	3,0 g
NaCl	5,0 g
Lactose	10,0 g
Gallensalz	1,5 g
Neutralrot	0,03 g
Kristallviolett	0,001 g
Agar-Agar	13,5 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Blutagar (Fa. Oxoid, Wesel, Deutschland)

Pepton	20,0 g
NaCl	5,0 g
Starch	1,0 g
Agar-Agar	12,5 g
D-Glucose	0,5 g
Schafblut	50,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Luria–Bertani (LB)-Medium (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)

NaCl	5,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
Bacto-Trypton	10,0 g
1 M NaOH	1,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

3.1.6 Puffer und Lösungen

3.1.6.1 Bakteriologische Untersuchungen

Physiologische Kochsalzlösung

Es wurde eine 0,9 % Kochsalz-Lösung hergestellt, davon wurden 18 ml in 50 ml Röhren pipettiert und sterilisiert.

Novobiocin- Lösung (2 mg/ml) (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Die Lösung wurde mit Aqua bidest. hergestellt und mit einem Einmalspritzenfilter steril filtriert. Die Zugabe zum Grundmedium erfolgte unmittelbar vor dem Gebrauch.

Verdünnungsreihen mit physiologischer Kochsalzlösung

Je 9 ml einer 0,9 % Kochsalz-Lösung wurde in ein 15 ml Glasröhrchen gegeben und sterilisiert.

Oxidase-Test

Oxidaserreagenz (Fa. E. Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.1.6.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Präparation genomischer DNA

Proteinase K

(Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Gebrauchslösung 20 mg/l

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7,5

1 mM EDTA, pH 8,0

ad 1000 ml Aqua bidest.

Polymerase - Kettenreaktion (PCR)**Taq DNA Polymerase** (5 U/ μ l) (Fa. Böhrringer, Mannheim, Deutschland)

PCR Reaktions 10x-Puffer mit MgCl (Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland)

Tfl Thermostable DNA - Polymerase (1U/ μ l) (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland)

Tfl-Puffer (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland)

Nucleotidmischung (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Ultrapure dNTP Set 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

im Verhältnis 1:1:1:1 Gebrauchslösung (10mM) gemischt

Mineralöl (Fa. Sigma, Deisenhofen)

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose

Agarose für Elektrophorese (Ultra Pure) (Fa. Gibco BRL Life technologies, Schottland)

10x TBE-Laufpuffer:

Tris	121,0 g
Borsäure	51,4 g
EDTA	3,72 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Ethidiumbromidlösung (Fa. E. Merck, Darmstadt, Deutschland)

1 µl/10 ml Puffer

100 bp DNA Ladder (Fa. MBI Fermentas, Litauen)

aufbewahrt in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) und 1 mM EDTA,
gelöst in Auftragspuffer

Auftragspuffer (Fa. MBI Fermentas, Litauen)

50% Glycerin
100 mM EDTA (pH 8,0)
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol

1 KB Ladder (Fa. Gibco BRL, Schottland)

20 µl DNS, KB-Ladder 250 µg/ 244 µ
20 µl H₂O
10 µl Stoppmix
450 µl 25 x TBE-Puffer

Stoppmix

0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol
30,00 % (w/v) Glycerin
ad 10 ml Aqua bidest.

Southern-Blot

0,4 M NaOH

2x SSC

0,03 M Na-Citrat

0,3 M NaCl

Dot-Blot

2x SSC

Kolonie-Blot

5 % SDS

0,5M NaOH, 1,5 M NaCl

0,5 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl pH 7,5

0,5 % SDS mit 1 µg/ml Proteinase K

2 x SSC

DNA Gewinnung für die Sondenherstellung

Qiaex II (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland)

Für die ECL- und Radioaktive Hybridisierung

Ethanol

3 M Na-Acetat, pH 4,9

1 x TE-Puffer

DNA-DNA-Hybridisierung mit ECL™ System (Fa. Amersham Life Science, Braunschweig, Deutschland)**Waschpuffer I**

0,4 x SSC

0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer II

2 x SSC

DNA-DNA-Hybridisierung mit DIG-System (Fa. Böhlinger, Mannheim, Deutschland)**Puffer I pH 7,5**

Maleinsäure 23,214 g

NaCl 17,52 g

Aqua bidest. ad 2000 ml

Puffer II

Puffer I 100 ml

Blocking Reagenz 500 mg

Blocking Reagenz 500 mg

Puffer III

NaCl 5,85 g

MgCl₂ 10,165 g

1 M Tris/HCl pH 9,5 100 ml

Aqua bidest. ad 1000 ml

Hybridisierungslösung

Formamid 50 ml

20 x SSC 25 ml

Blockingreagenz 20 ml

N-Lauroylsarcosin 0,1 g

10% (w/v) SDS 0,2 ml

Aqua bidest. ad 100 ml

Waschlösung I

2 x SSC

0,1 % (w/v) SDS

Waschlösung II

0,1 x SSC

0,1 % (w/v) SDS

Radioaktive DNA-DNA-Hybridisierung

CHURCH Hybridisierungspuffer

1 %	krystalline BSA	5 g
1 M	EDTA	2 ml
0,5 M	NaHPO ₄	500 ml
7 %	SDS	70 g
Aqua bidest.		ad 1000 ml

Waschpuffer I

1M	EDTA	2 ml
40 mM	NaHPO ₄	40 ml
1 %	SDS	10 g
Aqua bidest.		ad 1000 ml

Waschpuffer II

0,5 %	krystalline BSA	5 g
1M	EDTA	2 ml
40 mM	NaHPO ₄	40 ml
5 %	SDS	50 g
Aqua bidest.		ad 1000 ml

3.2 Methoden

3.2.1 Bakteriologische Methoden

3.2.1.1 Voranreicherung

Von jeder Sammelkotprobe wurden 2 g Kot in 18 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. 50 µl dieser Lösung wurden in 5 ml Tryptische Sojabouillon (mTSB) verbracht, die mit einer Novobiocin-Lösung versetzt war. Die Bouillon wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 min^{-1}) aerob bebrütet.

3.2.1.2 Gewinnung von Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) für die DNA-DNA-Hybridisierungen

Einzelkolonien für Dot- und Kolonie-Blot-Hybridisierung

Zur Gewinnung von CFU wurde von den Proben, deren PCR- und DNA-DNA-Hybridisierungsergebnis positiv war, aus der entsprechenden mTBS-Bouillon ein 3-Ösen-Verdünnungsausstrich im Doppelansatz auf je zwei MacConkey-Platten angefertigt. Diese wurden über Nacht bei 37°C aerob bebrütet. Jeweils am nächsten morgen wurden pro Probe 20 CFU, die als coliforme Keime angesehen wurden, ausgewählt und mittels steriler Zahnstocher im Replikaverfahren auf zwei mit einem Raster versehene LB-Platten getüpfelt. Diese wurden ca. 18 Stunden bei 37°C aerob bebrütet.

Originalplatten für den Replika-Blot

Aus der mTSB-Originalbouillon, die 1:2 mit Glycerin versetzt bei -80°C eingefroren war, wurden Verdünnungsreihen bis zur Verdünnung 10^{-7} durchgeführt. Davon wurden im Doppelansatz jeweils 100 µl auf einer MacConkey-Platte ausgespatelt und über Nacht bebrütet (37°C, aerob). Am nächsten morgen wurden die Platten einer optischen Kontrolle hinsichtlich Anzahl und gleichmäßiger Verteilung der coliformen Keime unterzogen.

Biochemische Überprüfung der STEC

Alle mit den DNA-DNA-Hybridisierung identifizierten CFU, die ein *stx*-Gen enthielten, wurden auf ihr Verhalten in der Gramfärbung und ihre Oxidase-Reaktion überprüft. Diejenigen Keime, die gram- und Oxidase-negativ waren, wurden im api 20 E System der Fa. BioMeriuex, Marcy-IÉtoile, Frankreich auf ihre biochemischen Eigenschaften hin getestet.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Hitze-Lyse zur Gewinnung von genomischer DNA

Mit der Hitze-Lyse wurde eine einfache und schnelle Methode zur Gewinnung von genomischer DNA angewandt. Die so gewonnene DNA wurde im Dot-Blot-Verfahren bzw. zur Sondenpräparation für das DIG-System verwendet. Zur Gewinnung wurde aus einer Übernachtskultur (37°C, aerob, ständiges schütteln) einer mit jeweils einer CFU beimpften LB-Bouillon 100 µl zusammen mit 200 µl H₂O in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Typ „safe-lock, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg, Deutschland) verbracht, gut gemischt und für fünf Minuten im Wasserbad (100°C) gekocht. Danach wurde die Lösung kurz zentrifugiert (3 min, Raumtemperatur, 14.000 x g) der Überstand, der die DNA enthielt, abgenommen und sofort weiterverarbeitet bzw. bei -20°C eingefroren.

3.2.2.2 Präparation genomischer DNA

Die Präparation der genomischen DNA erfolgte mittels des NucleoSpin C&T Kits der Fa. Machery-Nagel, Düren, Deutschland. Dabei wurde nach der Vorschrift "Protocol for the isolation of genomic DNA out of bacteria" vorgegangen. Der Kit beruht auf dem Prinzip der Bakterienlyse mit Proteinase K und Reinigung der gefällten DNA mittels beschichteten Säulen. Die gewonnene DNA wurde in TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3 Probenuntersuchung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für jede DNA, die aus der Übernachtbouillon einer Sammelkotprobe extrahiert worden war, wurden drei getrennte Polymerase-Kettenreaktionen auf das Vorhandensein von *stx1*, *stx2* und *stx2e* durchgeführt. Die in der DNA-DNA-Hybridisierung nachgewiesenen STEC wurden mittels PCR auf die Gene *eae*, *fedA* und *hly*_{EHEC} untersucht. Für die Polymerase-Kettenreaktionen wurde der folgende Master-Mix verwendet:

- 1 µl DNA -Template
- 5 µl Taq-Polymerase-Buffer (Fa. Böhlinger, Mannheim, Deutschland)
- 1 µl dNTPs (10mmol.)
- 0,5 µl Primer forward (0,2 µmol.) (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)
- 0,5 µl Primer reverse (0,2 µmol.) (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/ µl) (Fa. Böhlinger, Mannheim, Deutschland)
- 41,5 µl H₂O

In Tab. 4 sind die verwendeten Primer-Paare angegeben. Die PCR wurde entsprechend der in Tab. 5 angegebenen Temperaturzyklen durchgeführt. Zur Kontrolle der PCR wurde Aqua bidest. anstelle der DNA dem Master-Mix zugegeben. Als Negativkontrolle diente der Laborstamm C600 *E. coli* K12 DH 10β. Als Positivkontrollen dienten die in Tab. 3 aufgelisteten Stämme.

Tab.4: Überblick über die DNA-Sequenzen und die Spezifitäten der in der Polymerase-Kettenreaktion verwendeten Oligonukleotid-Primer

Angaben zu den Oligonukleotidprimern			Spezifität der Primer	
Name	Sequenzen (5' - 3')	Länge der Amplifikate	Nachgewiesenes Gen	Referenz
MD1 <u>¹MD2</u>	ATG AAG AAG ATG TTT ATG GCG AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA	130 bp	<i>stx1</i>	RAMATOR et al., 1995
LP30 <u>LP31</u>	CAG TTA ATG TGG CGA AGG CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG	348 bp	<i>stx1</i>	CEBULA et al., 1995
Stx2 for <u>Stx2 rev</u>	TTT GCT GTG GAT ATA CGA GG AGT GAC AAA ACG CAG AAC TG	342 bp	<i>stx2</i>	
116 for <u>116 rev</u>	AAA GTG CTC AGC TGA CAG GG AGA CGC GCA TGA ACC GTA A	116 bp	<i>stx2e</i>	
Stx2e for <u>Stx2e rev</u>	AGG AAG TAA TAT TTC CGT AG GTA TTT GCC TGA ACC GTA A	386 bp	<i>stx2e</i>	WEINSTEIN et al., 1988
GK3 <u>GK4</u>	CCC GGA TCC ATG AAG AAG ATG TTT ATG GCG CCC GAA TTC TCA GTC ATT ATT AAA CTG CAC	288 bp	<i>stx2B</i> <i>stx2cB</i> <i>stx2vhaB</i> <i>stx2vhbB</i> <i>stx2vhcB</i> <i>stx2OX21</i>	RÜSSMANN et al., 1995
Stx2f 1 <u>Stx2f 2</u>	AGA TTG GGC GTC ATT CAC TGG TTG TAC TTT AAT GGC CGC CCT GTC TCC	428 bp	<i>stx2f</i>	SCHMIDT et al., 2000
ECW1 <u>ECW2</u>	AGA TTG GGC GTC ATT CAC TGG TTG CGG TCG CCG CAC CAG GAT TC	628 bp	<i>eae</i>	HEUVELINK et al., 1995
FEDA1 <u>FEDA2</u>	GCA ACT ACC TGT AAT TTG ACA CC CTT GTA AGT AAC CGC GTA AGC	413 bp	<i>fedA</i>	IMBERECHTS et al., 1992
EHL1 <u>EHL2</u>	GAG CGA GCT AAG CAG CTT G CCT GCT CCA GAA TAA ACC ACA	889 bp	<i>hly_{EHEC}</i>	WIELER et al., 1996

Tab. 5: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion

Nachgewiesenes Gen	Oligonucleotid-Primer	Reaktionsbedingungen			Anzahl der Zyklen
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
<i>stx1</i>	MD1/MD	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	55°C, 60 sec.	72°C, 60 sec.	34
		94°C, 60 sec.	55°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1
	LP30/31	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	62°C, 60 sec.	72°C, 60 sec.	29
		94°C, 60 sec.	62°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1
<i>stx2</i>	<i>stx2 for/stx2 rev</i>	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	54°C, 60 sec.	72°C, 60 sec.	34
		94°C, 60 sec.	54°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1
<i>stx2e</i>	116 for/116 rev	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	58°C, 60 sec.	72°C, 60 sec.	34
		94°C, 60 sec.	58°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1
	<i>stx2e for/stx2e rev</i>	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	51°C, 60 sec.	72°C, 60 sec.	29
		94°C, 60 sec.	51°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1
<i>stx2f</i>	<i>stx2f-1/stx2f-2</i>	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	58°C, 60 sec.	72°C, 60 sec.	29
		94°C, 60 sec.	58°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1
<i>eae</i>	ECW1/ECW2	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	62°C, 60 s ec.	72°C, 60 sec.	29
		94°C, 60 sec.	62°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1
<i>fedA</i>	FEDA1/ FEDA2	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	55°C, 60 sec.	72°C, 60 sec.	29
		94°C, 60 sec.	55°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1
<i>hly_{EHEC}</i>	EHLY1/ EHLY5	95°C, 300 sec.			1
		94°C, 60 sec.	56°C, 60 sec.	72°C, 60 sec.	29
		94°C, 60 sec.	56°C, 60 sec.	72°C, 420 sec.	1

3.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese/Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion

Zur Auftrennung der genspezifischen PCR-Amplifikate wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Gele wurden in einer Konzentration von 1 bis 2% verwendet. Die jeweilige Menge an Agarose wurde mit TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend mit Ethidiumbromid (1 µl/10 ml) versetzt und nach kurzem Abkühlen gegossen. In die Geltaschen wurden die zu überprüfenden Ansätze, die 1:10 Stoppmix enthielten, gebracht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem PowerSupply-Elektrophoresesystem (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg i. Br., Deutschland), die Spannung betrug 5V/cm Gel. Nachdem die Bromphenolbande ca. $\frac{3}{4}$ des Gels durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel unter UV-Licht begutachtet.

3.2.2.5 Blots

DNA-Transfer auf eine Nylonmembran (Southernblot) nach REED u. MANN, 1985

PCR-Amplifikate für *stx1*, *stx2* und *stx2e* von allen untersuchten Proben wurden nach der Gelelektrophorese mittels Southernblot-Technik auf eine Nylonmembran überführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel zweimal 15 Minuten in 0,4 M Natronlauge (NaOH) bei Raumtemperatur geschwenkt. In der Zwischenzeit wurde die positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Fa. Amersham Life Science, UK) und zwei Lagen Whatmann 3MM Papier auf die Größe des Gels zugeschnitten. Das Gel wurde mit den Taschen nach unten auf eine zuvor luftblasenfrei ausgebreitete Saran^R-Haushaltsfolie gelegt. Die Nylonmembran wurde kurz in 0,4 M NaOH geschwenkt, um dann ebenfalls luftblasenfrei auf das Gel platziert zu werden. Auf die Membran folgten zwei Lagen 3MM-Whatmann Papier. Darauf wurde ein ca. 10 cm hoher Stapel aus Papiertüchern errichtet. Dieser wurde mit einer Plastikwanne, in der sich ca. 3 kg Gewicht befanden, beschwert. Der Transferzeit betrug ca. 12 Stunden. Danach wurden die Papiertücher und die zwei Lagen Whatmannpapier entfernt, die Nylonmembran in 2 x SSC geschwenkt und zwischen zwei 3MM-Whatmannpapieren getrocknet.

Dot-Blot (nach Kafatos, F.C., C.W. Jones, and A. Efstratiadis, 1979)

Zur Durchführung eines Dot-Blot wurde eine positiv geladene Nylonmembran nach vorherigem aktivieren mit 2 x SSC-Puffer auf ein mit Aqua bidest. angefeuchtetes Filterpapier in den Dot-Blot-Apparat (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) eingelegt. Es wurden je 100µl der zuvor hitzelysierten DNA aufgetragen. Die Proben wurden mittels einer Vakuumschlauchpumpe auf die Membran gesaugt. Um die DNA auf der Membran zu denaturieren, wurde diese nach der Entnahme für 30 Minuten bei 80°C gebacken. Die Fixierung erfolgte durch UV-Bestrahlung.

Kolonie-Blot (Grunstein. P.M., and D.S. Hogness, 1975)

Für die Herstellung des Kolonie-Blots wurden je 20 CFU mittels steriler Zahnstocher auf eine Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 85, Ø137 mm, Fa. Schleier & Schüll, Dassel, Deutschland) getüpfelt. Diese Membran enthielt ein Raster und wurde auf eine LB-Agarplatte verbracht. Gleichzeitig zu dieser Membran wurde eine Replikplatte angelegt, der das gleiche Raster auf die Unterseite der Petrischale angebracht wurde. Beide Platten wurden bei 37°C ca. 8 bis 10 Stunden bebrütet. Anschließend wurde die bakterielle DNA, die sich auf der Nitrocellulose-Membran befand, durch Lyse der Bakterien mittels Proteinase K bei 56°C zugänglich gemacht. Die verschiedenen Inkubationen und Pufferschritte fanden auf einem vollständig mit dem jeweiligen Puffer getränktem 3MM Whatmann-Papier statt. Zweistündiges Backen der Membranen fixierte die DNA auf der Membran.

Replikatechnik

Auf eine mit potentiellen STEC bewachsene MacConkey-Platten wurde eine verstärkte Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 85, Ø 87 mm, Fa. Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) gelegt, ca. 30 Minuten belassen und dann vorsichtig abgezogen. Die Kennzeichnung der Membranen erfolgte mittels einer dünnen Kanüle, die zuvor in Tusche getaucht und mit der die Membran durchstoßen wurde. Dadurch entstand sowohl auf der Membran als auch auf der Original-MacConkey-Platte ein kleiner Tuschefleck. Die Membran wurde anschließend mit den Einzelkolonien nach oben auf eine weitere MacConkey-Platte gelegt. Positiv und negativ Kontrollstämme (s. Tab. 1) wurden nun an definierten Stellen am oberen Rand auf den Filter getüpfelt. Beide Platten wurden nochmals für 8 bis 10 h bebrütet. Die Membranen wurden danach mit dem oben beschriebenen Verfahren des Kolonie-Blots behandelt.

3.2.2.6 DNA-Sonden

Bedingungen für die DNA - Sonden

Zur Synthese von DNA-Sonden wurden für *stx1*, *stx2*, *stx2e* und *stx2f* je eine PCR durchgeführt, die ein ausreichend grosses DNA-Fragment amplifizierten. Für die Hybridisierung des Southernblots konnten die Amplifikate der Positivkontrollen der vorhergegangenen PCR verwendet werden. Die Hybridisierung der Kolonie- bzw. Replikablots sollte mit grösseren Sonden erfolgen. Deshalb wurden folgende Polymerase-Kettenreaktionen mit den aufgeführten Primerpaaren durchgeführt. Primer und Temperaturbedingungen sind in den Tabellen 4 bzw. 5 angegeben:

<i>stx1</i>	MD1/MD2 bzw. LP30/LP31
<i>stx2</i>	<i>stx2for/stx2rev</i>
<i>stx2e</i>	116for/116rev bzw. <i>stx2efor/stx2erev</i>
<i>stx2f</i>	<i>stx2f-1/stx2f-2</i>

DNA-Präparation aus Agarosegelen

Für die Präparation wurden die PCR-Amplifikate wie oben beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die entsprechenden Stellen unter UV-Durchleuchtung aus dem Agarosegel geschnitten. Die DNA enthaltenden Gelstückchen wurden in Eppendorfreaktionsgefäße überbracht. Mittels des Quiaex II Agarose Gel Extraction Kit (Fa. Quiagen, Hilden, Deutschland) wurde die DNA aus der Agarose gelöst und in TE-Puffer aufbewahrt.

3.2.2.7 DNA-DNA-Hybridisierung

DNA-DNA-Hybridisierung mit ECL-System (nicht-radioaktive Hybridisierung nach WHITEHAED et al., 1983)

Jeder Southernblot wurde einer DNA-DNA-Hybridisierung mit dem ECL-System (ECL™ direct nucleic acid labelling and detection systems, Fa. Amersham Life Science, England) unterzogen, welches auf dem Prinzip der chemischen Lumineszenz basiert. Die chemische Zusammensetzung der verwendeten Nachweisreagenzien wird vom Hersteller nicht angegeben. Zur Markierung der DNA-Sonde wurden 10 µl DNA-Sonden-Lösung (10 ng/µl) für 5 min bei 100°C hitzedenaturiert und danach 5 Minuten lang auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurden die 10 µl DNA-Sondenlösung mit der 10 µl ECL-Markierungsreagenz und 10 µl Glutaraldehyd versetzt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNA-beladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Fa. Amersham) verfügt nach dem alkalischen Transfer über freie Bindungsstellen. Diese wurden mit 10 ml ECL-Goldhybridisierungspuffer für 20 Minuten bei 42°C inaktiviert. Nach der Prähybridisierung, wurde die frisch markierte Sonde dem Hybridisierungspuffer zugegeben und über Nacht bei 42°C an die DNA auf der Nylonmembran hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 15 Minuten bei 55°C mit dem Waschpuffer I und danach zweimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Waschpuffer II gewaschen. Die Membran kam zum Abtupfen des Waschpuffers auf ein 3MM-Whatmanpapier. Nach dem Vermischen der beiden ECL-Nachweisreagenzien I und II zu gleichen Teilen wurde die DNA-beladene Seite der Nylonmembran mit diesen bedeckt. Nach einer Minute Einwirkungszeit wurde die überschüssige Flüssigkeit abgetupft und die beladene Seite der Membran mit einer Saran^R-Haushaltsfolie bedeckt. Anschließend wurde die Membran in eine Filmkassette zuerst für zwei Minuten und danach nochmals 20 Minuten lang auf einen Röntgenfilm (X-OMAT, Fa. Kodak) gelegt.

DNA-DNA-Hybridisierung mit DIG-System (nach THOMAS et al., 1991)

Digoxigeninmarkierung in der PCR

Die Digoxigeninmarkierung der Sonde für Verwendung in der DNA-DNA-Hybridisierung zur Detektion der B-Untereinheit des *stx* erfolgte mittels PCR (s. Tab.2). Dazu wurde gemäß der Vorschrift des Herstellers (DIG DNA LABELLING KIT, Fa. Böhrringer, Mannheim, Deutschland) ein Teil des im Nucleotidgemisch enthaltenen dTTP durch Digoxigenin-11-dUTP ersetzt. Eine PCR wurde unter den für die Primer spezifischen Bedingungen durchgeführt (s. Tab.3). Anschließend wurde die Sonde mittels einer Elektrophorese in einem Agarosegel gegen eine nicht markierte Sonde und durch eine Hybridisierung mit entsprechender Kontroll-DNA überprüft. Bedingt durch das erhöhte Molekulargewicht ist die Laufstrecke der markierten Sonde im Agarosegel kürzer als die der unmarkierten Sonde.

DNA-DNA-Hybridisierung

Die Hybridisierungsreaktionen wurden mit den Dot-Blots nach den Vorschriften des DIG Luminescent Detection Kit (Fa. Böhrringer, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde die Membran mit der Hybridisierungslösung für ca. eine Stunde bei 45°C unter ständiger Bewegung in einem Hybridisierungssofen prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die markierte Sonde zu der Hybridisierungslösung gegeben und kurz (3-5 Minuten) aufgekocht. Diese Lösung wurde anschließend gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht und die Hybridisierung erfolgt bei 45°C übernacht. Am nächsten Morgen wurde die Membran zunächst zweimal bei RT in Waschlösung I, anschließend zweimal bei 45°C mit Waschlösung II gewaschen, um dadurch die unspezifisch gebundenen Sondenmoleküle zu entfernen. Die Äquilibrierung des Filters erfolgte kurz in P I (5 min, RT), die Blockierung anschließend für 35 Minuten in P II. Die Nachweisreaktion geschah mit 1:10.000 verdünnten Anti-Digoxigenin-Antikörpern in P II über ebenfalls 35 Minuten bei Raumtemperatur. In zwei fünfzehnminütigen Waschschrritten mit P I wurde die Antikörperlösung entfernt. Eine weitere Äquilibrierung erfolgte über drei bis fünf Minuten mit P III. Sodann wurde der Filter in einen Plastikbeutel eingeschweißt, in welchen das Substrat der Nachweisreaktion zugegeben wurde, und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Membran wurde danach auf einen Röntgenfilm (Cronex 4, NIF100, 18 x 14 cm , Siemens, Frankfurt, Deutschland) verbracht. Beide zusammen wurden zur Exponierung für 45 Minuten in eine lichtdichte Filmkassette (DIN 6832, 18 x 24 cm, Appligene, Heidelberg, Deutschland) gelegt. Der Nachweis der DNA-DNA-Hybridisierung war über die Schwärzung des Röntgenfilmes zu erkennen.

Radioaktive DNA-DNA-Hybridisierung

Sondenmarkierung

Die für die Sonde benötigte DNA wurde wie oben beschrieben gewonnen. Die Herstellung der Sonde wurde gemäss Vorschrift des RadPrime DNA Labelling System (Life Technologie, USA) durchgeführt. Dazu wurden 25 ng Sonde und 21 µl TE – Puffer in ein Schraubdeckeltube gegeben und für drei Minuten in einem kochenden Wasserbad (100 °C) hitzedenaturiert und ein bis zwei Minuten auf Eis abgeschreckt. Zu der DNA wurden je 1 µl dATP, dGTP und dTTP, sowie 20 µl Random Prime Puffer pipettiert. Im Isotopenlabor erfolgte die Zugabe von 5 µl ³²P- αdCTP (das entspricht ca. 50 µ Ci) und 1 µl Klenow-Polymerase. Die Lösung wurde gut gemischt und bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Zur Reinigung der Sonde von nicht gebundenen ³²P – Isotopen wurde eine Säule (NickColumn, FA.) eingesetzt.

DNA-DNA-Hybridisierung

Die Prähybridisierung der Filter (Kolonie- und Replika-Blot) erfolgte eine Stunde bei 65 °C in CHURCH-Puffer. Die im kochenden Wasserbad denaturierte Sonde wurde dem CHURCH-Puffer zugegeben. Die Hybridisierung fand übernacht bei 65°C statt. Am nächsten Morgen wurden die Filter zunächst zweimal für eine Minute mit Waschpuffer I bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend mit Waschpuffer I für fünf Minuten bei 30°C, und danach nochmals zehn Minuten mit Waschpuffer II bei 45°C gewaschen, um alle unspezifisch gebundenen Sondenmoleküle zu entfernen. Der Filter wurde übernacht auf einen Röntgenfilm (X-Omat AR, Fa. Kodak) aufgelegt und in einer lichtdichten Filmkassette in einen –80 °C Kühlschrank gelegt. Nach der Entwicklung wurden die Röntgenfilme begutachtet. Ein schwarzes Signal galt als erfolgreiche DNA-DNA-Hybridisierung.

3.2.2.8 DNA Sequenzanalyse der PCR-Amplifikate

Zur Überprüfung der PCR wurden die Amplifikate der PCR mit dem Primerpaaren MD1/MD 2 (*stx1*), LP 30/LP 31 (*stx1*), *stx2for/stx2rev* (*stx2*), 116for/116rev (*stx2e*), *stx2efor/stx2erev* (*stx2e*) und *stx2f-1/stx2f-2* (*stx2f*) von der Abteilung Molekularbiologie im Tierärztlichen Institut in Göttingen sequenziert und mit den Einträgen in der EMBL-Datenbank verglichen.