

3.1 Material

3.1.1 Easy- DNA™ Kit¹

Bestandteile des Easy- DNA™ Kit sind:

- Lösung A (Lysis Solution)
- Lösung B (Precipitation Solution)
- TE Puffer (10 mM Tris- Cl, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- RNase (Ribonuklease): Die RNase ist in destilliertem Wasser mit einer Konzentration von 2mg/ml gelöst.

3.1.2 Puregene DNA Isolation Kit²

Bestandteile des Puregene DNA Isolation Kit sind:

- Cell Lysis Solution
- Protein Precipitation Solution
- DNA Hydratation Solution
- RNase A Solution
- Cell Suspension Solution
- Lytic Enzyme Solution

3.1.3 Dynal Dynabeads DNA Direct™ kit³

Bestandteile des Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit sind:

- Dynabeads DNA Direct™- Lösung (Dabei handelt es sich um gleichförmige, paramagnetische, polymere Partikel, die sich in einer wäßrigen Suspension befinden)
- TE- Puffer (10 mM Tris- Cl, pH 8, 1 mM EDTA)
- Waschpuffer.

3.1.3.1 Prinzip des Dynal Dynabeads DNA Direct Kit

Das Zellpellet wird in der DNA Direct™- Lösung lysiert. In dieser Lösung befinden sich superparamagnetische Partikel, die mit Antikörpern beschichtet sind. Die Antikörper sind gegen DNA gerichtet und binden an die DNA des lysierten Zellpellets. Mit Hilfe eines Magneten werden die an die DNA gebundenen Antikörper angezogen. Der Überstand mit den übrigen Zellresten wird verworfen. Nach ein bis zwei Waschschrinen kann die an den Magneten gebundene DNA in TE Puffer gelöst und anschließend ohne vorherige Elution von den paramagnetischen Partikeln direkt für eine PCR verwendet werden.

¹ Invitrogen, NL-NV Leek, Art. Nr. K1800- 01

² Biozym, D-Hess. Oldendorf, Art. Nr. 202020

³ Deutsche Dynal GmbH, D-Hamburg, Art. Nr. 630.02

3.1.4 QIAquick Spin PCR Purification Kit⁴

Bestandteile des QIAquick Spin PCR Purification Kit sind:

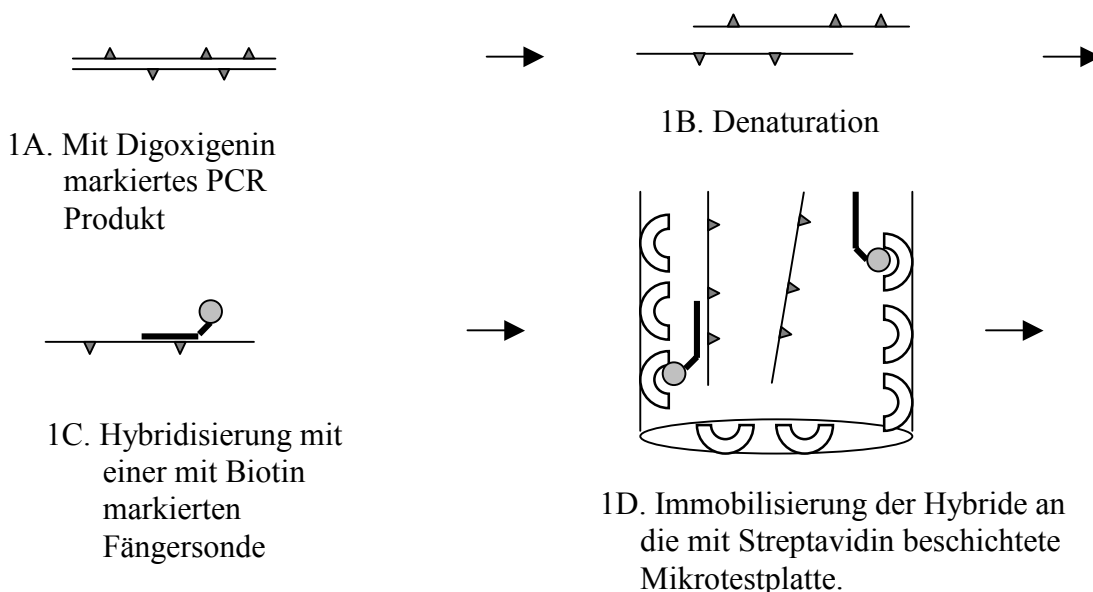
- Qiaquick Säulen
- Sammelgefäße
- Puffer PE (Waschpuffer)
- Puffer PB

3.1.5 PCR Dig Detection Kit⁵

Bestandteile des PCR Dig Detection Kit sind:

- Denaturierungslösung: enthält NaOH
- Hybridisierungspuffer
- Tabletten zur Herstellung des Waschpuffers (werden in Wasser gelöst)
- Konjugatpuffer zur Herstellung der Antikörperlösung
- Anti- Digoxigenin- POD Konjugat (lyophilisiert): enthält den gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, der mit Peroxidase (POD) gekoppelt ist
- Substratpuffer
- ABTS⁶- Tabletten zur Herstellung der Substratlösung, die Tabletten werden im Substratpuffer gelöst

3.1.5.1 Schema über den Ablauf des PCR Dig Detection Kit



⁴ Quiagen, D-Hilden, Art. Nr 28104

⁵ Boehringer Mannheim GmbH, D-Mannheim, Art. Nr. 1636111

⁶ 2,2'-Azino-di [3-ethyl benothiazoline sulfonate (6)] diammonium

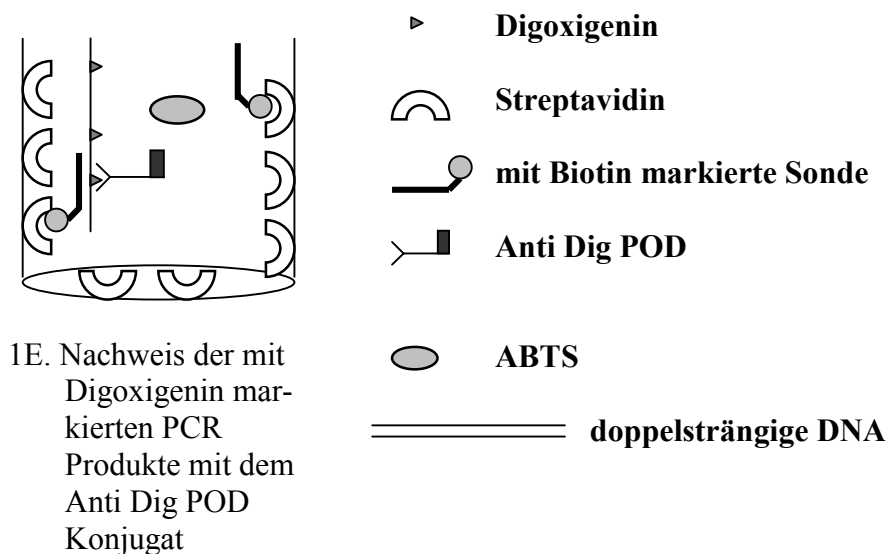


Abbildung 1: Schema des PCR Dig Detection Kit

3.1.5.2 Versuchsprinzip des PCR Dig Detection Kit

Für die Durchführung des PCR Dig Detection Kit der Fa. Boehringer werden die PCR Produkte während der PCR durch den Einbau von Digoxigenin markiert (s. Abb. 1A). Anschließend werden sie durch Zugabe einer NaOH- Lösung denaturiert (s. Abb. 1B) und zusammen mit den für diese Sequenz spezifischen Fängersonden in einer Hybridisierungslösung in die Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Dabei werden zwei Fängersonden verwendet, so daß sowohl der + als auch der - Strang des PCR Produktes nachgewiesen werden kann. Das PCR Produkt hybridisiert an die Fängersonde (s. Abb. 1C), die an ihrem 5' Ende mit einem Molekül Biotin markiert ist. Zwischen den mit Biotin markierten Fängersonden und der mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte kommt es durch die hohe Affinität von Biotin zu Streptavidin zur Brückenbildung (s. Abb. 1D). Ein gegen Digoxigenin gerichteter Antikörper bindet an die mit Digoxigenin markierten PCR Produkte. An den Antikörper ist das Enzym Peroxidase gekoppelt. Das Substrat ABTS wird von der Peroxidase zu einem grünen Farbstoff umgesetzt (s. Abb. 1E), dessen Intensität anschließend mit Hilfe eines Lesegerätes (ELISA Reader) ausgewertet wird.

3.1.6 Variation des PCR Dig Detection Kit mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD⁷

folgende Bestandteile des PCR Dig Detection Kits werden eingesetzt:

- Denaturierungslösung: enthält NaOH
- Hybridisierungspuffer
- Tabletten zur Herstellung des Waschpuffers (werden in Wasser gelöst)
- Konjugatpuffer zur Herstellung der Antikörperlösung (Flasche Nr. 6)

folgende Bestandteile des PCR Light Chemiluminescence Assay⁸ werden eingesetzt:

- CSPD[®] Chemilumineszenzsubstrat

⁷ Disodium 3-4-methoxy Spiro 1,2-dioxetane 3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan 3-4yl phenyl phosphate

⁸ Tropix, Serva, D-Heidelberg, Art. Nr. PC100

- DEA: enthält 99 %iges Diethanolamin
- Sapphire II™: ist ein polymerischer Verstärker für das Chemilumineszenzsubstrat
- 1 x PBS nach Herstellerangaben hergestellt (s. Anhang)
- Detection Wash Buffer (s. Anhang)
- Assay Buffer (s. Anhang)
- Substratlösung (s. Anhang)

zusätzlich wird verwendet:

- Anti Dig AP⁹: ein gegen Digoxigenin gerichteter, mit Alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper

3.1.6.1 Schema und Versuchsprinzip der Variation des PCR Dig Detection Kits mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD

Die Variante des PCR Dig Detection Kits mit CSPD als Substrat läuft ab wie in Abb. 1 (s. Pkt. 3.1.5.1) dargestellt und unter Pkt. 3.1.5.2 beschrieben. Anders als in diesem Schema ist der gegen Digoxigenin gerichtete Antikörper mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt und als Substrat dient das CSPD.

3.1.7 Variation des PCR Dig Detection Kits mit dem Fluoreszenzsubstrat Methylumbelliferylphosphat¹⁰

folgende Bestandteile des PCR Dig Detection Kits werden eingesetzt:

- Denaturierungslösung: enthält NaOH
- Hybridisierungspuffer

folgende Bestandteile des PCR Light Chemiluminescence Assay der Fa. Tropix werden eingesetzt:

- I-Block[®] Reagens: besteht aus gereinigtem Casein ohne Verunreinigung mit Alkalischer Phosphatase
- 1 x PBS nach Herstellerangaben hergestellt (s. Anhang)
- Waschpuffer 1 (s. Anhang)
- Waschpuffer 2 (s. Anhang)
- 10 x Phosphate Buffered Saline (s. Anhang)
- Blocking Buffer (s. Anhang)
- Detection Wash Buffer (s. Anhang)
- Assay Buffer 1(s. Anhang)

zusätzlich wird verwendet:

- Anti Dig AP: ein gegen Digoxigenin gerichteter, mit Alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper
- Substratlösung mit Methylumbelliferylphosphat (s. Anhang)

⁹ Boehringer Mannheim GmbH, D-Mannheim, Art. Nr. 1093274

¹⁰ Sigma, D-Deisenhofen, Art. Nr. M8168

3.1.7.1 Schema und Versuchsprinzip der Variation des PCR Dig Detection Kits mit dem Fluoreszenzsubstrat Methylumbelliferylphosphat

Die Variation des PCR Dig Detection Kits mit Methylumbelliferylphosphat als Substrat läuft ab wie in Abb. 1 (s. Pkt. 3.1.5.1) dargestellt und unter Pkt. 3.1.5.2 beschrieben. Abweichend von diesem Schema ist der gegen Digoxigenin gerichtete Antikörper mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt und als Substrat dient das Methylumbelliferylphosphat.

3.1.8 PCR ELISA mit kovalenten, durch eine Phosphoramidbindung an die Mikrottestplatte gebundenen Fängersonden

folgende Bestandteile des PCR Dig Detection Kits der Fa. Boehringer werden eingesetzt:

- Denaturierungslösung: enthält NaOH
- Hybridisierungspuffer
- Tabletten zur Herstellung des Waschpuffers (werden in Wasser gelöst)
- Konjugatpuffer zur Herstellung der Antikörperlösung
- Anti- Digoxigenin- POD Konjugat (lyophilisiert): enthält den gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, der mit Peroxidase (POD) gekoppelt ist
- Substratpuffer
- ABTS Tabletten zur Herstellung der Substratlösung, die Tabletten werden im Substratpuffer gelöst

3.1.8.1 Schema des Platzhalters (Spacerarmes), der aus der Oberfläche der Mikrottestplatte herausragt und an den die Fängersonden binden

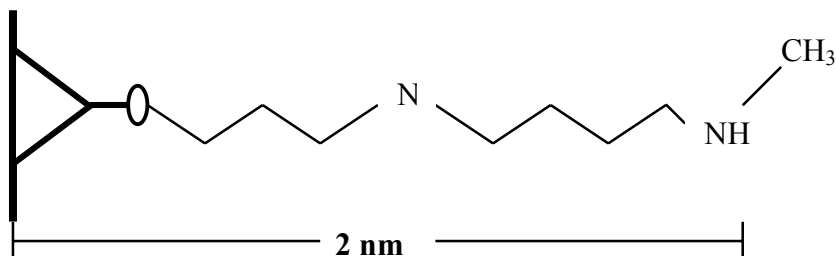


Abbildung 2: Schema über den Spacerarm der Mikrottestplatte, an dem die kovalente Bindung ausgebildet wird

3.1.8.2 Schema und Versuchsprinzip des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrottestplatte gebundenen Fängersonden

Die Mikrottestplatten werden vor der Durchführung des PCR ELISA mit den Fängersonden beschichtet: Die Fängersonde trägt am 5' Ende eine Phosphatgruppe und aus der Oberfläche der Mikrottestplatte (Nunc Covalink™¹¹) ragen sekundäre Amine heraus (s. Abb. 3). Zwischen der Phosphatgruppe am 5' Ende der Fängersonde und dem sekundären Amin, das aus der Oberfläche der Mikrottestplatte herausragt, wird eine kovalente Phosphoramidbindung ausgebildet. Die Bindung des PCR Produktes an die Mikrottestplatte erfolgt anschließend durch Hybridisierung an die kovalent gebundene Fängersonde. Das weitere Schema des PCR ELISA ist wie beim PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.1.5.1)

¹¹ Nunc GmbH, D-Eggestein, Art. Nr. 478042A

3.1.9 AmpliQ¹² als Testkit zur enzymatischen Intensivierung der Farbentwicklung des PCR ELISA

folgende Bestandteile des PCR Dig Detection Kits der Fa. Boehringer werden eingesetzt:

- Denaturierungslösung: enthält NaOH
- Hybridisierungspuffer
- Tabletten zur Herstellung des Waschpuffers (werden in Wasser gelöst)
- Konjugatpuffer zur Herstellung der Antikörperlösung

zusätzlich wird verwendet:

- Anti Dig AP: ein gegen Digoxigenin gerichteter, mit Alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper

Der AmpliQ besteht aus:

- Waschpufferkonzentrat
- Amplifier A (gepufferte Enzymlösung und Tetrazolium Violett)
- Amplifier B (stabilisierte NADPH Lösung)
- Stopp- Lösung (Phosphorsäure)

3.1.9.1 Schema über den Ablauf des AmpliQ

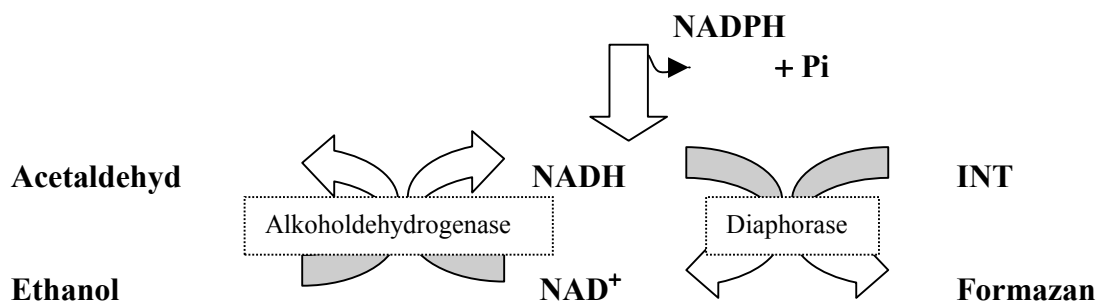


Abbildung 3: Schema über die Signalverstärkung mit dem AmpliQ

3.1.9.2 Prinzip der Signalverstärkung mit dem AmpliQ

Der PCR ELISA läuft ab wie in Abb. 1 (s. Pkt. 3.1.5.1) dargestellt und unter Pkt. 3.1.5.2 beschrieben. Im Unterschied dazu ist der gegen Digoxigenin gerichtete Antikörper mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) markiert. Das Enzym wirkt auch nicht direkt auf das Substrat ein, um die Farbveränderung zu bewirken, sondern die AP spaltet eine Phosphatgruppe aus NADPH ab (s. Abb. 4) und aktiviert so den nachfolgenden Zyklus: Das Enzym Diaphorase setzt INT zu dem Farbstoff Formazan um. Als Coenzym für diese Reaktion wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Ein weiteres Enzym, die Alkoholdehydrogenase, benutzt als Coenzym NAD⁺, Ethanol wird zu Acetaldehyd dehydriert und das Coenzym NADH für die Diaphorase wird dabei regeneriert, so daß weitere Moleküle INT zu Formazan umgesetzt werden können. Dieser Zyklus, der sich selbst regeneriert führt zu einer Verstärkung der Wirkung der Alkalischen Phosphatase.

¹² Dako, D-Hamburg, Art. Nr. K6245

3.1.11 Liste der verwendeten Stämme

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Stämme.

Hohenheim	Bezugsquelle, andere Stammsammlungen	Spezies	Anmerkungen
A1	<u>Sterne</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel -
A2	<u>ATCC 14185</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel -
A6	<u>BGA Berlin, Münster</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin - ; Kapsel +
A7	<u>BGA Berlin, 2</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A15	<u>Stammatin, Sokol</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel -
A22	<u>Sokol, 6006</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A23	<u>Sokol, 4892</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin - ; Kapsel +
A24	<u>Sokol, TN</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A25	<u>Sokol, TK</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A30	<u>Gießen, 12 VP 166</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A37	<u>Gießen, 40 FL 940</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A38	<u>Gießen, 41 FL 2007</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A41	<u>Gießen</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A42	<u>Gießen</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A68	<u>Nicolet, Bern</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin +; Kapsel +
A73	<u>Δ Ames</u>	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxin - ; Kapsel +
B6	<u>BGA 20, Münster</u>	<i>Bacillus subtilis</i>	keine Anmerkung
B36	<u>Brünn, CCM 2181</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B62	<u>Bern 4</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B72	<u>Brünn, CCM 864</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B77	<u>Brünn, CCM</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B94	<u>CCM 915</u>	<i>Bacillus cereus</i>	Variatio mycoides
B115	<u>Leistner, B 15/1</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B116	<u>Leistner, B 25/2</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B117	<u>Leistner, B 33/6</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B118	<u>Leistner, B 48 CB 7</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B119	<u>Leistner, B49 CB 10</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B136	<u>NCTC 9932</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B146	<u>ATCC 12826</u>	<i>Bacillus cereus</i>	keine Anmerkung
B177	<u>ATCC 10716, DSM 603</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
B178	<u>DSM, 13, Typstamm</u>	<i>Bacillus licheniformis</i>	keine Anmerkung
LT2	<u>DSM</u>	<i>Salmonella</i>	keine Anmerkung

Die von der Bezugsquelle verwendete Katalognummer ist unterstrichen. Kapsel - = der Stamm enthält das Plasmid pXO2 nicht; Kapsel + = der Stamm enthält das Plasmid pXO2; Toxin - = der Stamm enthält das Plasmid pXO1 nicht; Toxin + = der Stamm enthält das Plasmid pXO1; ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, USA; B = Dr. Berkeley, University of Bristol; BGA = Bundesgesundheitsamt (jetzt: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin); CCM = Czech Collection of Microorganisms, Brno, Tschech. Republik; DSM = Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; NCTC = National Type Culture Collection, London, UK.

3.2 Methoden

3.2.1 Anreicherung und anschließendes Abtöten von *Bacillus anthracis* aus Erdproben

Alle Schritte bis zum Vorliegen des abgetöteten Zellpellets werden in einem als L3 Labor eingestuften Raum unter Einhaltung der für das Arbeiten mit *Bacillus anthracis* vorgesehenen Sicherheitsbestimmungen durchgeführt. Die Katalase¹³, der Tris¹⁴-Puffer und das Wasserstoffperoxid¹⁵ werden in sterile Reaktionsgefäße (Einmalgefäße aus Plastik) in entsprechenden Mengen von max. 5 Ansätzen portioniert und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gelagert.

Erstellen einer Verdünnungsreihe aus einer Sporensuspension von *Bacillus anthracis*:
Verwendet werden A 73 und A15. Die Verdünnungsreihe wird in 10er Potenzschritten in einer Größenordnung von 10^9 bis 10^0 Sporen pro ml hergestellt:
In 9 ml TSB (Tryptic Soya Broth¹⁶) werden jeweils 1 ml der vorherigen Verdünnungsstufe aufgenommen und gründlich durchmischt. Anschließend werden je 500 µl pro Verdünnungsstufe auf je zwei Hammelblutagar¹⁷ und je zwei TSA¹⁸-Agarplatten mit dem Spatel ausgestrichen und die Platten anschließend für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Kolonien auf den Agarplatten werden ausgezählt und die Anzahl der Sporen pro ml für jede Verdünnungsstufe bestimmt.

Anzucht von Bakterien aus Erdproben

- Von jeder Erdprobe werden 3 x 100 g Erde in je drei leere, sterile Flaschen, die 1 Liter Volumen fassen können, eingewogen.
- Durch einen Trichter werden zunächst ca. 200- 300 ml steriles TSB zu der Erde gegeben.
- Von den drei Versuchsansätzen, die pro Erdprobe durchgeführt werden, dienen zwei als Positivkontrollen. Eine Positivkontrolle wird mit jeweils ca. 4 Sporen, die zweite Positivkontrolle wird mit jeweils ca. 40 Sporen der Stämme A15 und A73 beimpft. Dabei wird aus der Verdünnungsstufe 10^0 bzw. 10^1 der Verdünnungsreihen ein Volumen entnommen, das ca. 4 bzw. 40 Sporen enthält und zu der Probe zugesetzt.
- Die im TSB aufgeschwemmte Erde wird für 30 Minuten im Hybridisierungssofen¹⁹ auf 70 °C erhitzt.
- Anschließend wird die restliche Menge TSB zugegeben, so daß sich 100 g Erde in 900 ml TSB befinden
- Als Negativkontrolle wird ein Liter TSB mit dem Salmonellenstamm LT2 beimpft.
- Die in TSB aufgenommene Erde und die Negativkontrolle werden für ca. 12 h bei 37 °C und 100 Umdrehungen/Min. auf einem Brutschüttler inkubiert.
- 6 h Kultur:
100 µl der Vorkultur werden in 9 ml TSB bei 37 °C auf einem Schüttler mit 220 Umdrehungen/Min. für 6 h inkubiert.

¹³ Boehringer Mannheim GmbH, D-Mannheim, Art.Nr. 106836

¹⁴ Serva, D-Heidelberg, Art. Nr. 37180

¹⁵ Geyer, D-Renningen, Art.Nr. 1.08597

¹⁶ Oxoid limited, GB-Basingstoke, Hampshire, Art. Nr. CM 129

¹⁷ Oxoid limited, GB-Basingstoke, Hampshire, Art. Nr. CM 271

¹⁸ Oxoid limited, GB-Basingstoke, Hampshire, Art. Nr. CM 131

¹⁹ MWG Biotech, D-Ebersberg, Mini 10

- Abtöten:
Wasserstoffperoxid wird bis zur Endkonzentration von 3 % zugesetzt (1,1 ml einer 30 %igen Lösung). Der Reaktionsansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 4 °C mit 3000 x g zentrifugiert (Jouan Zentrifuge GT 4.11²⁰). Der Überstand wird dekantiert.
- Entfernen der Wasserstoffperoxidreste:
Zunächst werden pro ml Tris- Puffer (0,05 M, pH 7,2) 100 µl Katalase zugesetzt (260 000 Einheiten/ml). 1 ml dieser Lösung werden zu dem Pellet gegeben und das Pellet wird anschließend auf dem Vortexer²¹ (Vortex Genie) gründlich in der Lösung aufgeschwemmt. Die Lösung wird anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und 1 Minute bei 14000 U/Min. in einer Tischzentrifuge (Biofuge 15²²) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.
- Sterilkontrolle:
Von dem Zellpellet wird mit einer sterilen Plastiköse²³ (10 µl Plastiköse) eine Probe entnommen und auf Hammelblutagar im 3 Ösenausstrich aufgetragen. Der Hammelblutagar wird für 48 h bei 37 °C bebrütet.
- Das Zellpellet kann jetzt bei -20 °C gelagert werden.
- positive Sterilkontrolle: Sollten auf der Sterilkontrolle nach 2 Tagen Bakterienkolonien wachsen, so wird das Zellpellet bei 37 °C aufgetaut, in ca. 500 µl Tris- Puffer (0,05 M, pH 7,2) resuspendiert und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension mit Tris- Puffer auf ein Volumen von 9 ml aufgefüllt und die Vorschrift wird, wie ab der Überschrift "Abtöten" beschrieben, fortgesetzt.

3.2.2 Anreicherung und anschließendes Abtöten von *Bacillus anthracis* als Reinkultur

- Anzucht der Bakterien: Aus einer Suspension von *Bacillus anthracis* wird eine Probe mit einer Öse entnommen und im 3- Ösenausstrich auf einer Hammelblutagarplatte aufgetragen. Die Hammelblutagarplatte wird bei 37 °C für ca. 12 h bebrütet.
- Vorkultur: Von der Hammelblutagarplatte wird eine Kolonie entnommen und in 50 ml TSB suspendiert. Diese wird bei 37 °C für ca. 12 h auf einem Schüttler mit 220 Umdrehungen pro Minute inkubiert.
- 6 h Kultur: 1 ml der Vorkultur wird in 50 ml TSB bei 37 °C auf einem Schüttler mit 220 Umdrehungen pro Minute für 6 h inkubiert.
- Abtöten:
Wasserstoffperoxid wird bis zu einer Endkonzentration von 3% zugesetzt (5,5 ml einer 30 %igen Lösung). Der Reaktionsansatz wird 1 h auf einem Schüttler mit 220 Umdrehungen pro Minute bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird für 15 Minuten bei 4 °C mit 3000 x g zentrifugiert und der Überstand wird dekantiert.
- Entfernen der Wasserstoffperoxidreste: s. Pkt. 3.2.1 (Die Zellsuspension wird im Unterschied zu Pkt. 3.2.1 nicht in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, sondern wird direkt (im gleichen Reaktionsgefäß) für 15 Min. bei 4 °C mit 3000 x g zentrifugiert.)
- Sterilkontrolle: s. Pkt. 3.2.1
- Das Pellet wird mit 0,05 M Tris- Puffer auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und auf einem Schüttler gleichmäßig resuspendiert. 2 ml der Suspension werden entnommen und 1 Minute bei 14000 U/Min. in einer Tischzentrifuge (Biofuge 15) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

²⁰ Jouan, D-Baden- Baden

²¹ Bender & Hobein AG, D-Ulm

²² Heraeus Sepatech, D-Osterode

²³ Nunc GmbH, D-Wiesbaden, Art. Nr. 251586

- Das Zellpellet kann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

3.2.3 DNA Präparation mit dem EASY DNA™ Kit

(s. Pkt. 3.1.1)

Die DNA Präparation wird in einem separaten Raum durchgeführt. Dabei wird gesondert die Schutzkleidung für diesen Raum gewechselt und es werden frische Latex- Handschuhe²⁴ getragen. Alle Reagenzien (einschließlich des Ethanol²⁵ und der RNase²⁶) werden in autoklavierten

1,5 ml²⁷ bzw. 2 ml²⁸ Reaktionsgefäßen (Einmalgefäße aus Plastik) in entsprechenden Mengen von maximal 5 Reaktionsansätzen portioniert und gemäß den Empfehlungen des Herstellers in diesem Raum gelagert. Der TE- Puffer (s. Anhang) wird nach der Herstellung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen portioniert und anschließend autoklaviert. Das Chloroform²⁹ ist in einer Flasche mit Tropfvorrichtung abgefüllt und wird bei Bedarf entsprechend der benötigten Menge in autoklavierte Reaktionsgefäße aus Plastik eingetropft und dann in den Reaktionsansatz pipettiert.

Das wie unter Pkt. 3.2.1 bzw. 3.2.2 hergestellte Zellpellet wird bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut.

Lyse

- RNase (Ribonuklease) wird 1 : 20 zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in PBS (Phosphate Buffered Saline, s. Anhang) gelöst und das Zellpellet wird in 200 μl dieser Lösung resuspendiert.
- 350 μl der Lösung A (Lysis Solution) werden zu dem Reaktionsansatz zugesetzt und die Lösungen des Versuchsansatzes werden auf einem Vortexer gründlich vermischt.
- Der Versuchsansatz wird für 10 Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Hybridisierungsofen inkubiert.

Reinigung der DNA durch Fällung von Zellbestandteilen, Proteinen und Lipiden

- 150 μl der Lösung B (Precipitation Solution) werden zugesetzt. Dabei bildet sich ein Präzipitat, das sich am Boden des Eppendorfgefäßes niederschlägt. Durch gründliches Schnippen mit den Fingern wird das Präzipitat von der Wandung des Eppendorfgefäßes gelöst, so daß es frei in der Lösung schwebt. Dabei wird das geschlossene Eppendorfgefäß so umgedreht, daß der Deckel nach unten zeigt. Anschließend werden die Lösungen des Versuchsansatzes gründlich auf dem Vortexer vermischt.
- Nach Zusetzen von 500 μl Chloroform werden die Lösungen des Versuchsansatzes auf einem Vortexer solange gemischt, bis eine homogene Lösung entsteht.
- Der Versuchsansatz wird bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten mit 14000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Dabei entstehen drei Phasen eine obere, wäßrige Phase, die die DNA enthält, eine mittlere, feste Phase, die Proteine und Fette enthält, und die untere Phase, die vom Chloroform gebildet wird.
- Die obere, wäßrige Phase wird durch Dekantieren in ein steriles Eppendorfgefäß gewonnen und die beiden unteren Phasen werden verworfen.

²⁴ Roth GmbH, D-Karlsruhe, Größe S→ Art. Nr. 5884, Größe M→ Art. Nr. 5885, Größe L→ Art. Nr. 5886

²⁵ Roth GmbH, D-Karlsruhe, Art. Nr. 9065.2

²⁶ Bestandteil des Easy DNA Kit™

²⁷ Roth GmbH, D-Karlsruhe, Art. Nr. E 518,1

²⁸ Biozym, D-Hess. Oldendorf, Art. Nr. 710328

²⁹ Roth GmbH, D-Karlsruhe, Art. Nr. 3313.2

Fällung der DNA

- Die DNA wird durch Zusatz von 1 ml 96 %igem Ethanol³⁰ gefällt. Dabei wird das Eppendorfgefäß 3- 5 mal mit Schwung gekippt.
- Der Versuchsansatz wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 14000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand wird durch Dekantieren verworfen.
- Anschließend wird das DNA Pellet mit 1 ml 70 %igen Ethanol gewaschen. Dabei wird das Eppendorfgefäß 3- 5 mal mit Schwung gekippt.

Entfernen des Ethanol und Resuspendierung der DNA

- Der Versuchsansatz wird für 1 Minute bei Raumtemperatur mit 14000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert und der Überstand wird anschließend verworfen.
- Das DNA Pellet wird anschließend bei Raumtemperatur getrocknet, dabei steht das geöffnete Eppendorfgefäß mit der Öffnung nach unten auf Zellstoff. Die Reste des Ethanol verdampfen.
- Die DNA wird anschließend in 50µl TE- Puffer (s. Anhang) resuspendiert.

3.2.4 DNA Präparation mit dem Puregene DNA Isolation Kit

(s. Pkt. 3.1.2)

Die drei folgenden Vorschriften beschreiben die DNA Präparation mit dem Puregene DNA Isolation Kit:

- Vorschrift 1 zur Durchführung des Puregene DNA Isolation Kit

Das, wie unter Pkt. 3.2.1 oder 3.2.2 beschrieben, hergestellte Zellpellet wird bei 37 °C aufgetaut, in 0,5 ml 0,05 M TrisCl (s. Anhang) resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß, das ein Volumen von 2 ml aufnehmen kann, pipettiert. Anschließend wird die Suspension eine Minute bei 14000 U/Min. in einer Tischzentrifuge (Biofuge 15) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

Lyse

- Das Zellpellet wird in 1200 µl Cell Lysis Solution (zweifache Menge als vom Hersteller empfohlen) aufgenommen und mit der Pipette durch mehrfaches Auf- und Abziehen sorgfältig resuspendiert.
- Der Versuchsansatz wird für 10 Minuten bei 80 °C im Hybridisierungssofen inkubiert

Abbau der RNA

- Zu dem Zelllysat werden 10 µl RNase³¹ (5mg/ml) gegeben und durch mehrfaches Kippen der Lösung im Reaktionsgefäß wird eine gleichmäßige Verteilung des Enzyms erreicht. Wahlweise können auch 6 µl (zweifache Menge als vom Hersteller empfohlen) der RNase A Solution (Bestandteil des Puregene DNA Isolation Kits) verwendet werden.
- Anschließend wird der Versuchsansatz für 15 Minuten bei 37 °C im Brutraum inkubiert.

Fällung der Proteine

- Der Versuchsansatz wird auf Raumtemperatur abgekühlt.
- 400 µl (zweifache Menge als vom Hersteller empfohlen) Protein Precipitation Solution werden zu dem Zelllysat gegeben. Die Lösungen werden gleichmäßig miteinander auf einem Vortexer vermischt und anschließend für 10 Minuten bei 14000g in einer Tischzentrifuge (Biofuge 15) zentrifugiert.

³⁰ Roth GmbH, D-Karlsruhe, Art. Nr. 3313

³¹ Sigma, D-Deisenhofen, Art. Nr. R- 5000

Fällung der DNA

- Pro Versuchsansatz werden zweimal 600 µl 100 %iges Isopropanol³² in zwei Reaktionsgefäße, die ein Volumen von 1,5 ml aufnehmen können, gefüllt und je ca. 800 µl des Überstandes werden in das Eppendorfgefäß zu dem Isopropanol gegeben.
- Durch mehrfaches Kippen des Eppendorfgefäßes wird die Lösung gründlich gemischt und anschließend bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 14000g zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und die Öffnung des Eppendorfgefäßes wird zum Trocknen mehrfach auf Zellstoff aufgedrückt. Das Eppendorfgefäß wird anschließend ca. 5 Min. mit der Öffnung nach unten auf dem Zellstoff stehen gelassen.
- Anschließend werden 600 µl 70 %igen Ethanol zu dem Pellet zugesetzt und das Eppendorfgefäß wird mehrfach gekippt.

Entfernen des Ethanol und Resuspendierung der DNA

- Der Versuchsansatz wird für 1 Minute bei Raumtemperatur mit 14000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert und der Überstand wird anschließend verworfen.
- Das DNA Pellet wird anschließend bei Raumtemperatur getrocknet, dabei steht das geöffnete Eppendorfgefäß mit der Öffnung nach unten auf Zellstoff. Die Reste des Ethanol verdampfen.
- Die DNA wird anschließend in 50µl TE- Puffer (s. Anhang) resuspendiert.

- **Vorschrift 2 zur Durchführung des Puregene DNA Isolation Kit**

Diese richtet sich nach der vom Hersteller empfohlenen Vorschrift zur Präparation von Gram positiven Bakterien (gram- positive bacteria protocol). Abweichend von dieser Vorschrift wird der Schritt der Sphäroplastengeneration weggelassen und die DNA wird im letzten Schritt der Versuchsdurchführung nicht in 100 µl, sondern in 50 µl TE- Puffer (s. Anhang) gelöst. Im Unterschied zur Vorschrift 1 wird der gesamte, nach der Fällung der Proteine entstehende, Überstand in 600 µl Isopropanol aufgenommen und nicht in zwei Portionen aufgeteilt.

- **Vorschrift 3 zur Durchführung des Puregene DNA Isolation Kit**

Der Schritt der Sphaeroplastengeneration, der laut Hersteller wahlweise durchgeführt werden kann, wird wie in der Gebrauchsinformation beschrieben durchgeführt. Für die weitere Versuchsdurchführung s. Vorschrift 1 ab der Überschrift „Lyse“.

3.2.5 Vorschrift zur Durchführung des Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit

(s. Pkt. 3.1.3.)

Die Vorschrift zur Durchführung den Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit richtet sich nach den Herstellerangaben. DNA wird aus 1 ml und aus ca. einem Drittel der 6 h Kultur (s. Pkt. 3.2.1 und 3.2.2) mit dem Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit isoliert. Bei Verwendung von einem Drittel der 6 h Kultur werden abweichend von den Angaben des Herstellers 300 µl der Dynabeads DNA Direct™- Suspension verwendet. Die DNA wird im letzten Schritt in 20 µl TE- Puffer (s. Anhang) gelöst.

³² Merck, D-Darmstadt, Art. Nr. K22079534

3.2.6 Überprüfung der Qualität der mit dem Easy DNA™ Kit, dem Puregene DNA Isolation Kit und dem Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit präparierten DNA-Lösungen:

- Ermittlung der Konzentration der DNA- Lösungen

Die optische Dichte (OD) der wie unter Pkt. 3.2.3, Pkt. 3.2.4 oder Pkt. 3.2.5 hergestellten DNA- Lösung wird bei einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer (UV-visible Spectrophotometer, LKB Ultraspec Plus³³) bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 (ein OD- Wert von 1) bei 1 cm Schichtdicke ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngige DNA (IBELGAUFTS, 1990). Die DNA wird 1 : 200 in TE- Puffer (s. Anhang) verdünnt und gemessen. Aus dem OD- Wert wird die Konzentration nach der folgenden Formel berechnet: OD- Wert X 50 X 200 = Konzentration der DNA in µg pro ml.

- Kontrolle der Intaktheit der DNA.

Um zu kontrollieren, ob die wie unter Pkt. 3.2.3 oder Pkt. 3.2.4 beschrieben, hergestellte DNA während der Präparation durch Endonukleasen abgebaut wird, wird 1 µl der DNA- Lösung auf einem 0,8 %igem Agarosegel mit 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml, wie unter Pkt. 3.2.8.2 beschrieben, aufgetragen. Die DNS wird im UV- Licht sichtbar und bei mechanischer oder enzymatischer Zerstörung nicht mehr als deutlich begrenzte Bande erkennbar. Starke Verunreinigungen mit RNS tauchen auf dem Gel als „Wolke“ nahe der Lauffront auf.

- Ermitteln der Reinheit der präparierten DNA- Lösung

Die optische Dichte der, wie unter Pkt. 3.2.3 oder Pkt. 3.2.4 beschrieben, hergestellten DNA- Lösung wird bei einer Schichtdicke von 1 cm im UV- Vis Spektralphotometer beginnend bei 220 nm bis zu 300 nm Wellenlänge (wavelength scan assay) gemessen. Die DNA- Lösung wird dazu 1 : 100 in TE- Puffer (s. Anhang) verdünnt.

Die DNS wird als hochrein erachtet, wenn der Quotient A₂₃₀ : A₂₆₀ bei 0,45 und der Quotient A₂₈₀ : A₂₆₀ bei 0,55 liegt. Ein höherer Quotient deutet bei 230 nm auf Polysaccharidverunreinigungen hin, bei 280 nm auf Reste von Proteinen oder Phenol (MARMUR, 1961; MÜLLER et al., 1993). IBELGAUFTS (1990) verwenden den Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten (OD- Werte) als Kriterium für die Reinheit der DNA. Bei sehr reinen DNA- Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 1,95.

- Untersuchung über das Vorhandensein der nativen Plasmide von *Bacillus anthracis* in der präparierten DNA- Lösung.

Die wie unter Pkt. 3.2.3 oder Pkt. 3.2.4 hergestellte DNA- Lösung wird auf eine Konzentration von 100 ng/µl in TE- Puffer (s. Anhang) verdünnt. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe (1 : 10) bis zu einer Konzentration von 10 fg/µl aus der DNA- Lösung hergestellt. Eine nested PCR (s. Pkt. 3.2.8.3) wird zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Plasmids pXO1 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern durchgeführt.

3.2.7 Reinigung der DNA mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit

100 µl der, wie bei BEYER et al. (1995) beschrieben, gewonnenen DNA- Lösungen werden nach Herstellerangaben über eine Säule mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit

³³ Pharmacia Biotech, D-Freiburg

gereinigt (s. Pkt. 3.1.4). Um festzustellen, ob die bei der Reinigung an eine Säule gebundene DNA auch ausreichend wieder eluiert wird, bzw. wieviel DNA durch die Reinigung verloren geht, wird deren Konzentration mittels UV- Absorption (s. Pkt. 3.2.6) vor und nach der Reinigung bestimmt. Zusätzlich werden 1- 3 µl der DNA- Lösungen vor und nach der Reinigung über die Säule gelelektrophoretisch (s. Pkt. 3.2.6) aufgetrennt, um zu kontrollieren ob die DNA durch den QIAquick Spin PCR Purification Kit beschädigt wird.

3.2.8 Polymerase- Kettenreaktion (PCR) für den Nachweis von *Bacillus anthracis*

Die Phase der Anreicherung, die DNA Gewinnung, die Durchführung der PCR und der Nachweis der PCR Produkte mittels Agarosegelelektrophorese oder PCR ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) werden in 4 getrennten Räumen durchgeführt. Die PCR wird in einer Sicherheitswerkbank mit ausschließlich für die PCR verwendeten Pipetten und mit speziellen (gestopften) Pipettenspitzen (200 µl Safe Seal Tips³⁴, gestopft, 20µl Master Tips³⁵ mit Stempel und 1000 µl Pipet Tips³⁶ mit Stopfen), die die Entstehung von Aerosolen verhindern sollen durchgeführt. Alle verwendeten Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen, mit Ausnahme der 200µl Safe Seal Tips, die steril geliefert werden, werden 20 Minuten autoklaviert. Das für die PCR verwendete Wasser (aus einer Milliporeanlage, Milli- Q plus PF³⁷) und das Paraffin³⁸ werden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen portioniert, 20 Minuten autoklaviert und wie alle anderen für die PCR verwendeten Reagenzien bei – 20 °C getrennt von den PCR Produkten in einem separaten Gefrierschrank gelagert. Zum Transport der besonders temperaturempfindlichen Reagenzien wie der Taq Polymerase³⁹ und dem T4 Gene 32 Protein⁴⁰ werden spezielle, gekühlte Container verwendet. Während der Durchführung der PCR werden Latex- Handschuhe und Schutzkleidung getragen.

3.2.8.1 Übersicht über die verwendeten Primer

Die für den Nachweis von *Bacillus anthracis* verwendeten Primer und Sonden sind in tabellarischer Form dargestellt:

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5' - 3')	Quelle	Bindungs- Stelle	Genab- schnitt	Anneal ing
CAP6	TACTGACGAGGAGCAACCGA	Beyer '95	506- 525 ^a	Cap (B)	55 °C
CAP103	GGCTCAGTGTAACCTCTAAT	Beyer '95	1541- 1522 ^a	Cap (B)	55° C
CAP9	ATGTATGGCAGTTCAACCCG	Beyer '95	617- 636 ^a	Cap (B)	55° C
CAP102	ACCCACTCCATATACAATCC	Beyer '95	1394- 1375 ^a	Cap (B)	55° C
PA5	TCCTAACACTAACGAAGTCG	Beyer '95	2452- 2471 ^a	Pag	55° C
PA8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	Beyer '95	3048- 3029 ^a	Pag	55° C
PA6	ACCAATATCAAAGAACGACGC	Beyer '95	2631- 2651 ^a	Pag	55° C
PA7	ATCACCAGAGGCAAGACACC	Beyer '95	2841- 2821 ^a	Pag	55° C

³⁴ Biozym, D-Hess. Oldendorf, Art. Nr. 692069

³⁵ Eppendorf (Multimed), Wicker GmbH Labortechnik, D-Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 0030001320

³⁶ Costar GmbH, D-Bodenheim, Art. Nr. 4809

³⁷ Millipore, D-Eschborn

³⁸ Merck, D-Darmstadt, Art. Nr. K22815874620

³⁹ Pharmacia Biotech, D-Freiburg, Art Nr. 270799-01

⁴⁰ Boehringer Mannheim GmbH, D-Mannheim, Art. Nr. 972983

Fortsetzung Tabelle 2

Primer	Sequenz (5' - 3')	Quelle	Bindungs- Stelle	Genab- schnitt	Anneal- ing
R1	TTAATTCACCTTGCAACTGATGGG	Patra '96	227- 249 ^b	Ba813	55 °C
R2	AACGATACGTCCTACATTTGGAG	Patra '96	98- 120 ^b	Ba813	55 °C
C1 ^c	GCCAGGTGCTATAACCGTATCAGCAA	Patra '96	179- 203 ^b	Ba813	37 °C
3D ^{c, d}	GAGTAACTCGTTAATGCTTCAAATT	Patra '96	139- 163 ^b	Ba813	37 °C
BA17 ^e	GAAATAGTTATTGCGATTGG	Sjöstedt '95	1230- 1249 ^a	Cap (B,C)	54 °C ^f
BA20 ^g	GGTGCTACTGCTTCTGTACG	Sjöstedt '95	2102- 2083 ^a	Cap (C,A)	62 °C ^f
BA58 ^h	TGGTAAACCCTTGTCTTTGAAT	Sjöstedt '97	1867- 1847 ^a	Cap (C)	58 °C ⁱ
57 ^j	ACTCGTTTTTAATCAGCCCG	Ramisse '96	1603- 1622 ^a	Cap (C)	58 °C
58 ^h	GGTAAACCCTTGTCTTTGAAT	Ramisse '96	1866- 1847 ^a	Cap (C)	58 °C
MO1	GCTGATCTTGACTATGTGGGTG	Makino '93	2452- 2473 ^a	Cap (A)	65 °C
MO2	GGCTTCCTGTCTAGGACTCGG	Makino '93	2739- 2719 ^a	Cap (A)	65 °C
BACA1FI	ACAACCTGGTACATCTGCGCG	Reif '94	470- 489 ^a	Cap (B)	58 °C ^k
BACA6RI	GATGAGGGATCATTGCTGC	Reif '94	1073- 1092 ^a	Cap (B)	58 °C ^k
67	CAGAATCAAGTCCAGGGG	Ramisse '96	1925- 1944 ^a	Pag	58 °C
68	TCGGATAAGCTGCCACAAGG	Ramisse '96	2652- 2671 ^a	Pag	58 °C
23	CTACAGGGGATTTATCTATTCC	Ramisse '96	2006- 2027 ^a	Pag	58 °C
24	ATTGTTACATGATTATCAGCGG	Ramisse '96	2135- 2156 ^a	Pag	58 °C
Cvi	CACTCGTTTTTAATCAGCCC	Beyer ^m	1602- 1621 ^a	Cap (C)	55 °C
Cri	CCTGGAACAATAACTCCAATACC	Beyer ^m	1808- 1830 ^a	Cap (C)	55 °C
Cap20rev	TACCTGTAATTAGCGTTGCC	Beyer ^m	1723- 1742 ^a	Cap (C)	58 °C
Cap10	TTCTCATTTGCTCCTGGATCC	Beyer ^m	1004- 1023 ^a	Cap (B)	60 °C
SAP3V	TACGGTAAAGAGTTTACAGCTCCTG	Beyer ^m	2157- 2181 ^l	Sap	58 °C
SAP3R	TTTAGTTCAGCTGCTTCTGCACC	Beyer ^m	2499- 2521 ^l	Sap	58 °C
SAP2V	GCTCCTGTAACAGTAAAAGTACTT	Beyer ^m	2175- 2199 ^l	Sap	55 °C
SAP1V	ATTAGTTCTGAATGCAGCAGGTC	Beyer ^m	2258- 2280 ^l	Sap	55 °C
SAP1R	CACCTGGAGCTTTTAATTCTAGAGC	Beyer ^m	2349- 2373 ^l	Sap	55 °C

^a Positionsangaben wurden von MAKINO et al. (1989) und WELKOS et al. (1988) übernommen.

^b Positionsangaben beziehen sich auf die von PATRA et al. (1996) in der EMBL Nukleotidsequenz Datenbank unter der Zugangsnummer U46157 veröffentlichten Sequenz

^c Bei den Oligonukleotiden C1 und 3D handelt es sich nicht um Primer, sondern um Sonden für den PCR ELISA, sie hybridisieren bei 37 °C an das PCR Produkt, s. Annealing

^d PATRA et al. (1995) beschreiben die Sequenz für die Sonden C1 und D3. Die Sonde 3D ist antiparallel zu dem von PATRA et al., 1995, beschriebenen Oligonukleotid D3 und hybridisiert nicht an den gleichen DNA-Strang wie C1.

^e Der von RAMISSE et al. (1996) beschriebene Primer 17 besitzt die gleiche Sequenz wie BA17.

^f Diese Temperatur wird von SJÖSTEDT et al. (199) als Schmelztemperatur (T_m) angegeben.

^g Der von RAMISSE et al. (1996) beschriebene Primer 20 besitzt die gleiche Sequenz wie BA20.

^h BA58 ist am 5' Ende um ein Nukleotid länger als 58.

ⁱ Von SJÖSTEDT et al. (1997) wird 52 °C als Temperatur für das Annealing angegeben.

^j Der von SJÖSTEDT et al. (1997) beschriebene Primer BA57 besitzt die gleiche Sequenz wie 57.

^k Von REIF et al. (1994) wird 55 °C als Temperatur für das Annealing angegeben. ^f

^l Positionsangaben beziehen sich auf die von ETIENNE- TOUMELIN et al. (1995) veröffentlichte Sequenz des S- layer Proteins (sap) von *Bacillus anthracis*

^m persönliche Mitteilung

3.2.8.2 Methode zur Durchführung der PCR

- Herstellen eines Mastermixes (Prämix) für die PCR:

Alle Reagenzien mit Ausnahme des Wassers und der Taq Polymerase werden vor dem Pipettieren kurz auf einem Vortexer durchmischt.

Für eine PCR im Volumen von 100 µl werden folgende Reagenzien verwendet:

Wasser	Das Wasser wird aus einer Milliporeanlage (Milli- Q plus PF) gewonnen und wird vor Gebrauch in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt und 20 Minuten autoklaviert. Mit Wasser wird das Volumen auf 100 µl pro PCR Ansatz ergänzt.
Puffer ⁴¹	Der Puffer ist ein 10fach Konzentrat, der aus 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ und 100 mM Tris HCl besteht (pH 9,0 bei Raumtemperatur). Für die PCR wird der Puffer 1fach konzentriert eingesetzt.
Primer ⁴²	Die Primer für die PCR werden im Verhältnis 1:1 mit einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt.
Polymerase	Als Polymerase dient die Taq Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> . Es werden 2,5 Einheiten/Ansatz eingesetzt.
Desoxyribonukleotidtriphosphate:	
PCR Dig Lab Mix ⁴³	Der PCR Dig Lab Mix ist ein 10fach Konzentrat, das aus je 2 mM dATP, dCTP und dGTP sowie 1,9 mM dTTP und 0,1 mM Digoxigenin-11- dUTP zusammengesetzt ist. Der PCR Dig Lab Mix wird 1fach konzentriert eingesetzt. Die dNTP (Desoxynukleotidtriphosphat) Endkonzentration im PCR Ansatz ist 200 µM. Der PCR Dig Lab Mix wird verwendet, um PCR Produkte mit Digoxigenin zu markieren. Das markierte PCR Produkt kann dann mit dem PCR ELISA nachgewiesen werden.
dNTP- Mix ⁴⁴	Die dNTP Endkonzentration im PCR Ansatz beträgt 200 µM (dATP : dCTP : dGTP : dTTP = 1 : 1 : 1 : 1). Für den Nachweis der PCR Produkte mit der Agarosegelelektrophorese und für die nested PCR wird der dNTP- Mix verwendet.
T4 Gene 32 Protein	Bei Einsatz von DNA aus Bodenproben werden 0,2 µl pro Ansatz T4 Gene 32 Protein (10 mg/ml) dem Prämix zugesetzt.

Der Prämix wird anschließend sorgfältig auf einem Vortexer gemischt und zu je 100 µl auf die beschrifteten, autoklavierten 0,2 ml Reaktionsgefäße⁴⁵ aufgeteilt. Die Ansätze werden mit 60 µl Paraffin überschichtet und 1 µl der zu untersuchenden DNA- Lösung wird mit einer

⁴¹ Pharmacia Biotech, D-Freiburg, Art. Nr. 270799-01(wird mit der Polymerase geliefert)

⁴² Interactiva Biotechnologie GmbH, D-Ulm

⁴³ Boehringer Mannheim GmbH, D-Mannheim, Art.Nr. 1585550

⁴⁴ Boehringer Mannheim GmbH, D-Mannheim, Art. Nr.1277049

⁴⁵ Costar GmbH, D-Darmstadt, Art. Nr. 6530

Spezialpipette (Biomaster 4830⁴⁶) unter das Paraffin gegeben. Die PCR Reaktionsgefäße werden in der Biofuge 13 anzenrifugiert, um sicherzustellen, daß die DNA, die im Paraffinöl hängengeblieben ist, in die Reaktionsflüssigkeit geschleudert wird. Die Proben werden in den Thermocycler überführt und die PCR wird gestartet.

- Bedingungen für den Ablauf der PCR

Der Thermocycler⁴⁷ wird wie folgt programmiert:

1. 4 Minuten bei 94° C Denaturation
2. Die Bedingungen für die Zyklen der PCR sind:
 - 2.1 1 Minute bei 94° C Denaturation
 - 2.2 1,5 Minuten bei 55° C Annealing, s. Tab. 2
 - 2.3 1,5 Minuten bei 73° C Extension
 - 2.3.1 Einfügen eines Zeitincrementsegmentes von 10 Sekunden, d. h. je PCR- Zyklus wird die Dauer der Extension um weitere 10 Sekunden verlängert.
3. 9 Minuten bei 72° C Renaturierung
4. Kühlung der Proben bis zur Entnahme auf 8 °C

(Anzahl der Zyklen : 30, Block control)

Die Temperatur für das Annealing ist je nach Schmelztemperatur der Primer unterschiedlich und kann der Tabelle 2 entnommen werden. Das Zeitincrementsegment wird eingefügt, um den Einbau von Digoxigenin zu verbessern, wenn die PCR Produkte mit dem PCR ELISA nachgewiesen werden. Für die nested PCR, oder wenn die PCR Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (s. Pkt. 3.2.4.6) nachgewiesen werden, entfällt das Zeitincrementsegment.

- Beschreibung der Agarosegelelektrophorese

Bei der Auswertung der PCR mit der Agarosegelelektrophorese werden je 15 µl des PCR Produktes auf einem 1,5 %igem Agarosegel⁴⁸ aufgetragen. Zunächst laufen die PCR Produkte mit 40 Volt Spannung und 25 Milliampère Stromstärke in das Gel ein. Anschließend wird die Elektrophorese ca. 1,5 h bei 55 Volt Spannung und 33 Milliampère Stromstärke fortgesetzt. Als Elektrophoresepuffer dient der TAE Puffer (s. Anhang). In 100 ml Agarosegel befinden sich 5 µl Ethidiumbromidlösung (s. Anhang). Die Gelelektrophorese wird mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Fluo Link⁴⁹) ausgewertet.

Die Agarosegelelektrophorese zur Beurteilung der präparierten DNA- Lösungen und zur Auswertung der Spaltung der PCR Produkte wird prinzipiell wie die Auswertung der PCR durchgeführt, dabei treten folgende Unterschiede auf:

Bei der Beurteilung der präparierten DNA- Lösungen ist das Agarosegel 0,8 %ig und es wird 1µl der DNA- Lösung auf das Agarosegel aufgetragen (s. Pkt. 3.2.6). Bei der Auswertung der Spaltung der Produkte der PCR mit Restriktionsendonukleasen (s. Pkt. 3.2.12) wird das gesamte Volumen des Spaltungsansatzes auf ein 1,5%iges bzw. 2 %iges Agarosegel aufgetragen.

3.2.8.3 Beschreibung der nested PCR und der seminested PCR für den Nachweis von *Bacillus anthracis*

Durch die nested PCR oder die seminested PCR findet eine weitere Vermehrung des PCR Produktes statt. Dafür wird 1 µl des Produktes der 1. PCR an Stelle einer DNA- Lösung als

⁴⁶ Eppendorf (Multimed), Wicker GmbH Labortechnik, D-Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 4830000017

⁴⁷ Biometra, D-Göttingen

⁴⁸ Biozym, D-Hess. Oldendorf, Art. Nr. 870056

⁴⁹ Bachofer, D-Reutlingen

Ziel- DNA (Template) in der nested PCR oder der seminested PCR eingesetzt. Als Primer für die nested PCR dienen die sogenannten „inneren Primer“, deren Sequenzen innerhalb des Produktes der 1. PCR liegen. Bei der seminested PCR existiert nur ein möglicher innerer Primer, der zusammen mit einem der Primer der 1. PCR (einem der sogenannten „äußeren Primer“) für die weitere Vermehrung eingesetzt wird. Für die nested PCR und die seminested PCR gilt das gleiche Arbeitsverfahren wie in Pkt. 3.2.8.2 beschrieben.

Im Unterschied zur ersten PCR wird jedoch kein PCR Dig Lab Mix und kein T4 Gene 32 Protein benötigt. Das Programm für den Ablauf der PCR unterscheidet sich dadurch, daß das Zeitincrementsegment entfällt.

3.2.9 Einsatz des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase⁵⁰ zur Vermeidung von carry- over Kontaminationen

Die Uracil- DNA Glykosylase katalysiert die Hydrolyse von Uracil- Glykosidbindungen (Basenexzision) in Uracil- haltiger DNA. Dadurch wird Uracil freigesetzt und eine alkaliempfindliche Pyrimidin- freie DNA- Position geschaffen, an der die Polymerase gestoppt wird. Wird in das PCR Produkt Uracil an Stelle von Thymin eingebaut, so können carry- over Kontaminationen mit dem PCR Produkt verhindert werden, indem sie vor der Durchführung der PCR durch die Uracil- DNA Glykosylase abgebaut werden. Um festzustellen wie effektiv carry- over Kontaminationen durch den Einsatz des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase verhindert werden können, wird folgender Versuch durchgeführt:

1. Herstellen einer Verdünnungsreihe aus dem PCR Produkt für die gezielte carry- over Kontamination einer PCR:

Zunächst wird ein Uracil- haltiges PCR Produkt mit Hilfe der PCR, wie unter Pkt. 3.2.8 beschrieben, hergestellt. Dazu wird der PCR Dig Lab Mix verwendet, der Digoxigenin- 11- dUTP enthält und zur Markierung der PCR Produkte für den PCR ELISA dient (s. Pkt. 3.2.8.2). Als Primer für den Nachweis des Plasmids pXO1 dienen PA5 und PA8 (BEYER et al., 1995). Es werden 10 fg des Stammes A41 als Ziel- DNA eingesetzt und in den Ablauf der PCR ist ein Zeitincrementsegment für die Extension eingefügt (s. Pkt. 3.2.8.2).

Anschließend wird mit dem PCR Produkt eine Verdünnungsreihe in TE- Puffer in Zehnerpotenzen von der Verdünnungsstufe 10^{-1} bis 10^{-11} hergestellt.

2. Untersuchung über das Risiko für eine carry- over Kontamination der PCR:

Je 1 µl der Verdünnungsstufen des Uracil- haltigen PCR Produktes werden als Ziel- DNA in einer PCR (s. Pkt. 3.2.8) eingesetzt. Als Primer für den Nachweis des Plasmids pXO1 dienen PA5 und PA8 (BEYER et al., 1995). Als Desoxynukleotidtriphosphatlösung wird der PCR Dig Lab Mix verwendet und für die Extension wird ein Zeitincrementsegment eingefügt (s. Pkt. 3.2.8.2).

Als weiterer Vermehrungsschritt schließt sich eine nested PCR wie unter Pkt. 3.2.8.3 beschrieben an. Als innere Primer dienen PA6 und PA7 (BEYER et al., 1995). Das Ergebnis der nested PCR wird mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (s. Pkt. 3.2.8.2) ausgewertet.

3. Untersuchungen über den Abbau der carry- over Kontamination durch die Uracil- DNA Glykosylase:

Die Versuchsdurchführung entspricht weitgehend dem unter Punkt 2 dargestellten Versuchsschema. Im Unterschied zu Punkt 2 wird in der ersten PCR pro 100 µl Mastermix eine Einheit (1 µl) Uracil- DNA Glykosylase zugesetzt. Vor Ablauf der ersten PCR werden

⁵⁰ Boehringer Mannheim, D-Mannheim, Art. Nr. 1444646

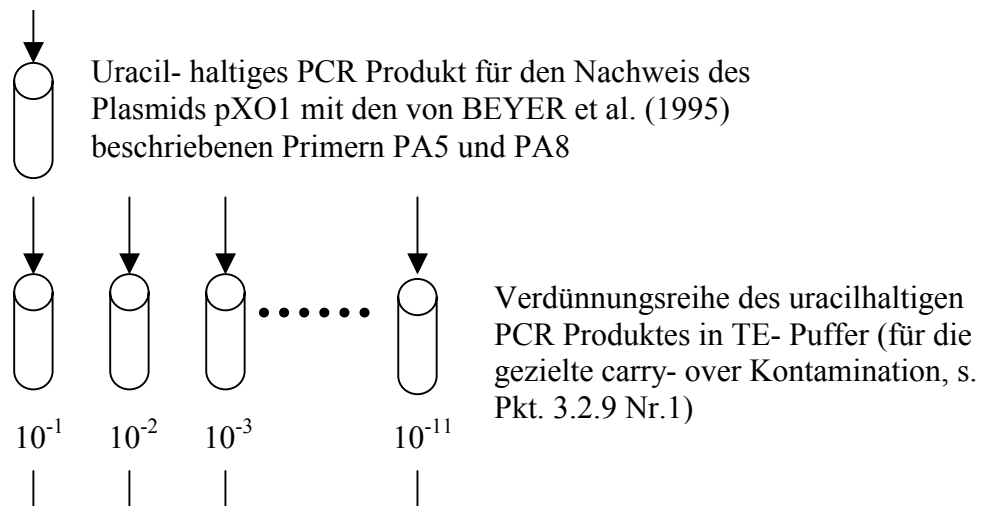
die PCR Ansätze für 15 Minuten bei 37 °C mit der Uracil- DNA Glykosylase inkubiert. Anschließend wird die Uracil- DNA Glykosylase für 10 Minuten bei 95°C thermisch inaktiviert. Damit erübrigt sich der Schritt der einmaligen Denaturierung der DNA (s. Pkt. 3.2.8.2), so daß sich das Stadium der PCR Zyklen (Denaturation, Annealing, Extension, s. Pkt. 3.2.8.2) unmittelbar anschließt. Für die anschließende Durchführung der nested PCR s. Pkt. 3.2.9 Nr.2.

4. PCR ELISA mit den Verdünnungsstufen, die durch die Uracil- DNA Glykosylase abgebaut werden

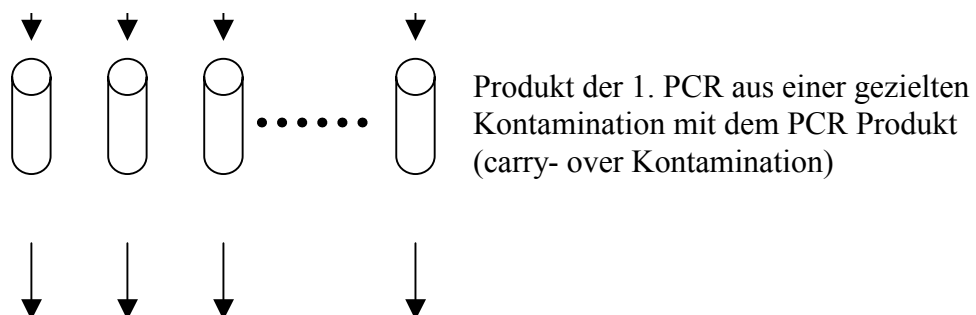
Mit den, wie unter Pkt. 1 hergestellten, Verdünnungsstufen des Uracil- haltigen PCR Produktes, die in dem wie unter Pkt. 3 beschriebenen Versuch als carry- over Kontamination durch die Uracil- DNA Glykosylase abgebaut werden, wird ein PCR ELISA durchgeführt (s. Pkt. 3.2.10.1, PCR Dig Detection Kit). Dazu wird die 1. PCR für den Nachweis des Plasmids pXO1 wie unter Punkt 2 beschrieben durchgeführt und an die Stelle der nested PCR tritt der PCR ELISA.

- Schematische Darstellung des unter Pkt. 3.2.9 beschriebenen Versuches:

Als Ziel- DNA werden 10 fg des Stammes A41 in der PCR eingesetzt. In der PCR wird der PCR Dig Lab Mix verwendet (s. Pkt. 3.2.8.2), wodurch Digoxigenin- 11- dUTP in das PCR Produkt eingebaut wird.



Ein Mikroliter der Verdünnungsstufen wird als Ziel- DNA in einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO1 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern PA5 und PA8 eingesetzt. Dabei wird die PCR einmal ohne vorherige Einwirkung des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase durchgeführt (s. Pkt. 3.2.9 Nr.2). In einer zweiten PCR wirkt das Enzym Uracil- DNA Glykosylase vor Ablauf der PCR Zyklen auf die in den Verdünnungsstufen enthaltene Uracil- haltige DNA ein (s. Pkt. 3.2.9, Nr.3).



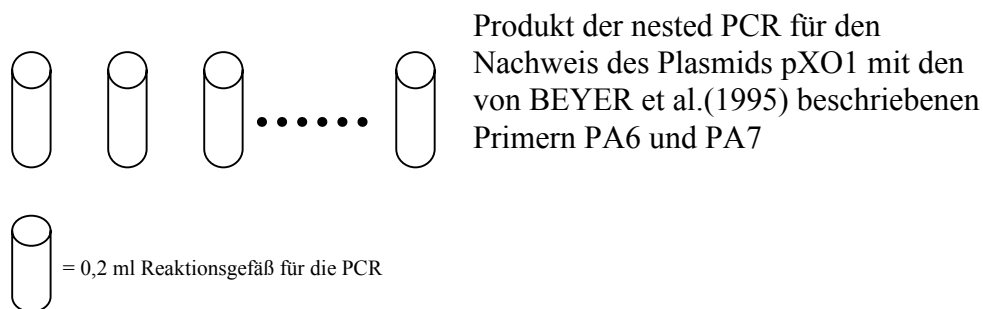


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuches zur Wirksamkeit des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase zur Vermeidung einer carry-over Kontamination

3.2.10 Durchführung des Polymerase- Kettenreaktion enzyme- linked immuno- sorbent assay (PCR ELISA) für den Nachweis von *Bacillus anthracis*

- Primer und Sonden für den Nachweis von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA

Die für den PCR ELISA verwendeten Primer für den Nachweis der Plasmide pXO1 und pXO2 werden von BEYER et al. (1995) beschrieben. Die inneren Primer für die nested PCR (BEYER et al., 1995) fungieren als Fängersonden im PCR ELISA. PATRA et al. (1995) beschreiben die Sequenz der Primer und der Sonden für den Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis* (s. Tab. 2).

Tabelle 3: Liste der Primer und Sonden, die für den PCR ELISA verwendet werden

	Äußere Primer	Sonden ^a
Plasmid pXO1	PA 5 und PA8	PA6 ^b und PA7 ^b
Plasmid pXO2	Cap 6 und Cap 103	Cap9 ^b und Cap 102 ^b
Chromosom	R1 und R2	C1 und 3D

^a Die Sonden sind am 5' Ende mit Biotin markiert.

^b Die Sonden sind gleichzeitig die inneren Primer für die nested PCR, wenn sie als Primer für die nested PCR eingesetzt werden, sind sie nicht mit Biotin markiert.

- Festlegen von Begriffsbestimmungen bei der Durchführung des PCR ELISA:

Grundsätzlich werden für jede zu untersuchende Probe mit dem PCR ELISA zwei Werte bestimmt (Wert 1 und 2). Diese stammen aus demselben PCR Ansatz und dienen als interne Kontrolle über den korrekten Ablauf des PCR ELISA.

Sollen zwei unterschiedlich durchgeführte PCR ELISA miteinander verglichen werden, dürfen die Werte ausschließlich von der Art der Durchführung des PCR ELISA abhängen und nicht zusätzlich durch den Ablauf der PCR beeinflusst werden. Deshalb werden zwei gleiche Mengen aus demselben PCR Ansatz entnommen und jeweils für die Durchführung der beiden unterschiedlichen PCR ELISA (Versuchsdurchführung 1 und 2) verwendet. Für jeden der beiden unterschiedlichen PCR ELISA werden wiederum je zwei Werte (Wert 1 und 2) bestimmt, die als interne Kontrolle über den korrekten Ablauf des PCR ELISA dienen. Pro PCR Ansatz werden also zwei PCR ELISA durchgeführt mit je zwei Werten.

Der Grenzwert zwischen positiven und negativen Werten für den Nachweis von PCR Produkten mit dem PCR ELISA wird als Cut-off bezeichnet. Willkürlich wird als Cut-off die auf den Mittelwert der Negativwerte des PCR ELISA addierte 3fache Standardabweichung definiert. Der Cut-off wird für jede Charge eines Testkits aus mindestens 10 Negativwerten

erneut bestimmt. Die Negativwerte des PCR ELISA, aus denen der Cut-off bestimmt wird, sind die Extinktionswerte, die aus den Negativkontrollen der PCR (ohne DNA, nur der Prämix) nach Durchführung des PCR ELISA gemessen werden. Dabei werden ausschließlich unkontaminierte PCR Ansätze, die auch nach der Durchführung der nested PCR (s. Pkt. 3.2.8.3) negativ sind, verwendet.

3.2.10.1 Vorschrift zur Durchführung des PCR Dig Detection Kit der Fa. Boehringer (zur Beschreibung des Systems s. Pkt. 3.1.5)

Der PCR Dig Detection Kit wird in der Diagnostik von Salmonellen aus Lebensmitteln routinemäßig eingesetzt (MEIXNER, 1995).

Gebrauchslösungen:

1. Hybridisierungslösung:

Die Hybridisierungslösung sollte zwischen 1 bis 50 pmol/ml mit Biotin markierten, inneren Primer enthalten. Hergestellt wird eine Stammlösung, die jeden der beiden inneren Primer in einer Konzentration von je 10 µM enthält (PA 6 Biotin : PA 7 Biotin = 1 : 1, wobei PA 6 = 10 µM). Fünf µl dieser Lösung entsprechen 50 pmol und werden pro ml Hybridisierungspuffer (Bestandteil des Testkits) in der Hybridisierungslösung verwendet. Die Lösung wird vor der Durchführung des PCR ELISA frisch hergestellt.

2. Anti Dig POD- Lösung:

Diese enthält den gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, der mit dem Enzym Peroxidase (POD) gekoppelt ist. Die Komponenten, aus denen sie sich zusammensetzt, gehören zum Testkit. Sie wird vor der Durchführung des PCR ELISA frisch, original nach Herstellerangaben hergestellt.

3. Substratlösung:

Die Substratlösung (mit ABTS) wird genau nach Herstellerangaben angesetzt und kann, wenn sie bei 4 °C gelagert wird, mehrere Tage verwendet werden.

4. Waschpuffer:

Der Waschpuffer wird original nach Herstellerangaben angesetzt und ist 6 Wochen haltbar.

Vorschrift:

- 60 µl PCR Produkt werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert.
Sollen aus einem PCR Ansatz (im Volumen von 100 µl) zwei unterschiedliche PCR ELISA (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10) durchgeführt werden, so werden je 40 µl aus demselben PCR Ansatz entnommen und für die Durchführung der beiden PCR ELISA verwendet.
- 40 µl Denaturierungslösung werden hinzugefügt.
- Nach gründlichem Vermischen auf dem Vortexer, wird anschließend zentrifugiert und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert.
- Mit Hybridisierungslösung wird auf 500 µl Volumen aufgefüllt.
- Nach gründlichem Vermischen auf dem Vortexer werden pro Vertiefung der Mikrottestplatte 200 µl der Reaktionslösung einpipettiert. Dabei werden als interne Kontrolle über den korrekten Ablauf des PCR ELISA je zu untersuchende Probe stets zwei Vertiefungen gefüllt (Wert 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10).
- Die Mikrottestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und wird 1,5 (1-3) Stunden bei 37 °C auf einem Mikrottestplattenschwenker (MTPS) inkubiert.
- Die Lösungen werden mit Schwung dekantiert und pro Vertiefung 3-5 mal für 1 Min. mit 250 µl Waschpuffer gewaschen.

- Nach dem letzten Waschschrift wird die Mikrotestplatte nach Dekantieren der Waschflüssigkeit umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten der Waschflüssigkeit zu befreien.
- 200 µl Anti Dig POD- Lösung werden nun in die Vertiefungen pipettiert.
- Die MTP wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und die Anti Dig POD- Lösung wird in der Mikrotestplatte 30 Minuten bei 37 °C auf dem MTPS inkubiert.
- Die Lösungen werden mit Schwung dekantiert und pro Vertiefung 3-5 mal für 1 Min. mit 250 µl Waschwasser gewaschen.
- Nach dem letzten Waschschrift wird die Mikrotestplatte nach Dekantieren der Waschflüssigkeit umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten der Waschflüssigkeit zu befreien.
- 200 µl ABTS- Substratlösung werden in die Vertiefungen eingefüllt.
- Die Mikrotestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und wird für 30 Minuten im Dunkeln bei 37 °C auf dem MTPS inkubiert.
- Bei 405 nm Wellenlänge (Referenzfilter 492 nm) wird die Absorption im ELISA Reader⁵¹ abgelesen.

- Überprüfung der Sensitivität und Festlegen der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit:

Um die DNA Menge zu ermitteln, die gerade noch mit diesem Testkit nachzuweisen ist (Nachweisgrenze), werden folgende Versuche durchgeführt:

Aus zahlreichen PCR Ansätzen, die im Volumen von 100 µl durchgeführt werden, werden 60 µl pro Ansatz für den PCR ELISA verwendet. Untersucht werden verschiedene DNA Konzentrationen bis minimal 10 fg. Die Hybridisierungsdauer beträgt 3 h. Dabei wird die Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kits sowohl für den Nachweis der Plasmide pXO1 und pXO2, als auch für das Chromosom festgelegt.

- Kürzung der Inkubationszeit für das Anti Dig POD- Lösung und für das ABTS-Substrat:

Um die Gesamtdauer des PCR Dig Detection Kit zu kürzen, wird die Inkubationszeit für die Anti Dig POD- Lösung und für das ABTS- Substrat je um die Hälfte gekürzt. Pro PCR Ansatz (im Volumen von 100 µl) werden je 40 µl für die beiden Versuchsdurchführungen entnommen (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10).

Versuchsdurchführung 1 wird 15 Minuten mit der Anti Dig POD- Lösung inkubiert und nach 15 und 30 Minuten Inkubation mit dem ABTS- Substrat abgelesen.

Versuchsdurchführung 2 wird 30 Minuten mit der Anti Dig POD- Lösung inkubiert und ebenfalls nach 15 und 30 Minuten Inkubation mit dem ABTS- Substrat abgelesen.

- Kürzung der Hybridisierungsdauer

Um festzustellen, ob die Dauer für die Hybridisierung des PCR Dig Detection Kits von 3 Stunden auf 1,5 oder eine Stunden gekürzt werden kann, wird folgender Versuch durchgeführt:

Aus demselben PCR Ansatz (im Volumen von 100 µl) werden je 40 µl für zwei verschiedene PCR ELISA entnommen, so daß die beiden Versuchsdurchführungen optimal miteinander verglichen werden können (s. Pkt. 3.2.10). Die Hybridisierungsdauer bei der 1. Versuchsdurchführung beträgt 1,5 bzw. eine Stunde und bei der 2. Versuchsdurchführung beträgt sie 3 Stunden. Es soll festgestellt werden, ob die Nachweisgrenze für den Nachweis der Plasmide pXO1, pXO2 und für das Chromosom bereits nach 1,5 oder einer Stunde Hybridisierungsdauer erreicht werden kann. (Für den Nachweis des Plasmids pXO2 wird kein direkter

⁵¹ SLT Labinstruments, D-Crailsheim

Vergleich zwischen den Werten nach 1,5 und 3 h Hybridisierungsdauer durchgeführt. 60 µl des PCR Produktes werden für den PCR ELISA entnommen. Es soll festgestellt werden, ob die Nachweisgrenze bereits nach 1,5 Stunden Hybridisierungsdauer erreicht wird.)

- Durchführung eines PCR ELISA aus einer PCR im Volumen von 50 µl

Um die Kosten für den PCR ELISA zu senken, soll die PCR im Volumen von 50 µl statt 100 µl durchgeführt werden. Die Konzentration der Reagenzien (s. Pkt. 3.2.8.2) bleibt dabei gleich. Genau wie bei einer PCR im Volumen von 100 µl werden jedoch weiterhin 2,5 Einheiten Polymerase pro PCR Ansatz verwendet. Die Kostensenkung wird vor allem durch die Einsparung des PCR Dig Lab Mix (s. Pkt. 3.2.8.2) erreicht, für den auf diese Weise pro zu untersuchende Probe nur die Hälfte benötigt wird. Für den PCR ELISA werden 40 µl des PCR Produktes eingesetzt, die Hybridisierungsdauer beträgt 1,5 Stunden.

- Vergleich zwischen der nested PCR und dem PCR Dig Detection Kit anhand von Erdproben, die auf das Vorhandensein von *Bacillus anthracis* überprüft werden

Die Ergebnisse der Überprüfung von Erdproben auf das Vorhandensein von *Bacillus anthracis*, die mit der nested PCR gewonnen werden (s. Pkt. 3.2.8.3), werden mit den Ergebnissen des PCR ELISA (s. Pkt. 3.2.10.1) verglichen. Die DNA Präparation wird wie bei BEYER et al., 1995 beschrieben, durchgeführt und die Hybridisierungsdauer beträgt 1,5 h. Verglichen werden die Werte des PCR ELISA mit den Ergebnissen der nested PCR. Zusätzlich werden die Ergebnisse des PCR ELISA für den Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis* ermittelt.

3.2.10.2 Vorschrift zur Durchführung eines Vergleiches zwischen dem PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD und dem PCR Dig Detection Kit

(Zur Beschreibung des Systems s. Pkt. 3.1.6)

Um festzustellen, ob der Nachweis von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD sensitiver ist, als der Nachweis mit dem PCR Dig Detection Kit, wird folgender Versuch durchgeführt:

Gebrauchslösungen:

1. Verdünnen des Anti Dig AP Konjugates: Das Anti Dig AP Konjugat, das 750 mU in 1 µl Flüssigkeit enthält, wird mit Wasser aus einer Millipore Anlage zu einer Konzentration von 1 mU/µl verdünnt. 1 µl Anti Dig AP Konjugat wird dazu in 749 µl Wasser aufgenommen. Vor jedem Versuchsansatz wird es frisch 1:100 mit Konjugatpuffer (aus der Flasche Nr. 6) des PCR Dig Detection Kit verdünnt.
2. Der Detection Wash Buffer, der Assay Buffer und die Substratlösung sind Bestandteile des PCR Light Chemiluminescent Assay und werden nach den Angaben des Herstellers angesetzt (s. Anhang).

Vorschrift:

- Aus demselben PCR Ansatz (im Volumen von 100 µl) werden je 40 µl für die Durchführung der beiden unterschiedlichen PCR ELISA (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10) verwendet. Die erste Versuchsdurchführung wird wie unter Pkt. 3.2.10.1 beschrieben (Hybridisierungsdauer: 3h) durchgeführt, die zweite Versuchsdurchführung weicht wie folgt von der unter Pkt. 3.2.10.1 dargestellten Vorschrift ab:
- Als erster Schritt werden die Vertiefungen der weißen Mikrottestplatte⁵² 10 Minuten mit

⁵² Serva, D-Heidelberg, Art. Nr. 29740

200 µl 2fach PBS (s. Anhang) bei Raumtemperatur rehydriert. Das 2fach PBS wird anschließend mit Schwung dekantiert und die Mikrottestplatte wird umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten des 2fach PBS zu befreien.

- Die weitere Versuchsdurchführung entspricht genau der unter Pkt. 3.2.10.1 (Hybridisierungsdauer: 3h) dargestellten, bis sie ab der Inkubation mit der Antikörperlösung wieder von dieser Vorschrift abweicht:
- In die Vertiefungen der weißen Mikrottestplatte werden 200 µl Anti Dig AP Konjugat (Gebrauchslösung 1, s. o.) einpipettiert.
- Die Mikrottestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und für 30 Minuten bei 37 °C auf dem MTPS inkubiert.
- Die Vertiefungen der Mikrottestplatte werden dreimal mit je 200 µl Detection Wash Buffer und anschließend zweimal mit je 200 µl des Assay Buffers für je 1 Minute gewaschen.
- Nach dem letzten Waschschrift wird die Waschflüssigkeit dekantiert und die Mikrottestplatte wird auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von Resten der Waschflüssigkeit zu befreien.
- Anschließend werden 200 µl der Substratlösung (s. Anhang) in die Vertiefungen der Mikrottestplatte pipettiert und das Ergebnis wird nach 10, 15 und 45 Minuten mit dem Chemilumineszenzmeßgerät⁵³ abgelesen. Das Meßfilter des Chemilumineszenzgerätes liegt bei 470 nm. (Die Wellenlänge des Emissionsoptimums bei Umsatz des CSPD mit Alkalischer Phosphatase liegt bei 463 nm.)

3.2.10.3 Vorschrift 1 zur Durchführung des PCR ELISA mit einem Fluoreszenzsubstrat (Zur Beschreibung des Systems s. Pkt. 3.1.7)

Gebrauchslösung

1. Die Hybridisierungslösung und die Denaturierungslösung sind Bestandteile des PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.2.10.1)

2. Verdünnen des Anti Dig AP Konjugates:

Das Anti Dig AP Konjugat, das 150 U in 200 µl Flüssigkeit enthält wird zu einer Konzentration von 1 mU/µl verdünnt. 1 µl Anti Dig AP Konjugat wird dazu in 749 µl Wasser aufgenommen und kann so verdünnt mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden. Vor jedem Versuchsansatz wird es frisch 1:100 mit dem Blocking Buffer (s. Anhang) verdünnt.

3. Der Waschpuffer 1 und 2, der Blocking Buffer und der Detection Wash Buffer sind Bestandteile des PCR Light Chemiluminescent Assay und werden nach den Angaben des Herstellers angesetzt (s. Anhang).

4. Als Substratlösungen kommen grundsätzlich die von TADA et al. (1992) oder die von LÜNEBERG et al. (1993) verwendeten Lösungen (s. Anhang) in Frage, verwendet wird aber eine davon abweichend zusammengesetzte Lösung, die als Substratlösung mit Methylumbelliferylphosphat bezeichnet wird (s. Anhang).

Vorschriften:

- Als erster Schritt werden die Vertiefungen der Mikrottestplatte 10 Minuten mit 200 µl 1fach PBS (s. Anhang) bei Raumtemperatur rehydriert. Das 1fach PBS wird anschließend mit Schwung dekantiert und die Mikrottestplatte wird umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten des 1fach PBS zu befreien.
- 60 µl PCR Produkt werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Sollen aus einem PCR Ansatz zwei unterschiedliche PCR ELISA durchgeführt werden, so werden je 40 µl aus demselben PCR Ansatz entnommen, um die beiden unterschiedlich durchgeführten PCR ELISA optimal miteinander vergleichen zu können (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10).

⁵³ Merlin, D-Bornheim- Hesel, Luminoskan RT

- 40 µl Denaturierungslösung werden hinzugefügt.
- Nach gründlichem Vermischen auf dem Vortexer wird anschließend zentrifugiert und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert.
- Mit Hybridisierungslösung wird auf 500 µl Volumen aufgefüllt.
- Auf dem Vortexer wird gründlich gemischt und pro Vertiefung der Mikrottestplatte werden 200 µl einpipettiert. Dabei werden pro zu untersuchender Probe als interne Kontrolle über den korrekten Ablauf des PCR ELISA je zwei Vertiefungen gefüllt (Wert 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10).
- Die Mikrottestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und die Reaktionsansätze werden 1,5 Stunden bei 37 °C auf einem Mikrottestplattenschwenker inkubiert.
- Nach Dekantieren der Lösung wird zweimal mit je 200 µl Waschpuffer 1 für je 1 Minute gewaschen.
- Einmal wird mit je 200 µl Waschpuffer 2 für 1 Minute gewaschen.
- Schließlich wird zweimal mit je 200 µl Waschpuffer 2 für 5 Minuten bei 55 °C gewaschen.
- Nach dem letzten Waschschrift wird die Mikrottestplatte nach Dekantieren der Waschflüssigkeit umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten der Waschflüssigkeit zu befreien.
- 200 µl Blocking Buffer werden pro Vertiefung in die MTP pipettiert und der Reaktionsansatz wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Der Blocking Buffer wird entfernt und 200 µl des in Blocking Buffer gelösten Anti Dig AP Konjugates werden in die Vertiefungen der MTP einpipettiert (Gebrauchslösung 2, s. o.).
- Die Mikrottestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und der Reaktionsansatz wird für 30 Minuten bei 37 °C auf dem MTPS inkubiert.
- Die Vertiefungen werden dreimal mit je 200 µl Detection Wash Buffer und anschließend zweimal mit je 200 µl Assay Buffer 1 je 1 Minute gewaschen.
- In die MTP werden pro Vertiefung 200 µl Substratlösung mit Methylumbelliferylphosphat (s. Anhang) eingebracht und bei 37° C auf dem MTPS inkubiert.
- Abgelesen wird bei 355 nm Excitationsfilter und 460 nm Emissionsfilter nach 30 Minuten mit dem Fluoreszenzgerät (Fluostar⁵⁴).

- Versuche zur Ermittlung der geeigneten Lagerungstemperatur für die Substratlösung

Um die optimale Temperatur für die Lagerung der Substratlösung zu ermitteln, werden folgende Versuche durchgeführt: Verglichen werden Substratlösungen, die je 3 Tage bei Raumtemperatur, bei 4- 8 °C oder bei -80°C gelagert wurden. Die Lösungen werden direkt auf eine weiße Mikrottestplatte aufgetragen und sofort bzw. nach 2,5 Stunden Inkubation bei 37 °C auf dem MTPS mit dem Fluoreszenzmeßgerät ausgewertet. Zusätzlich werden aus einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO1 im Volumen von 200 µl dreimal je 60 µl für die Durchführung von drei PCR ELISA nach der Vorschrift von Pkt. 3.2.10.3 (Vorschrift 1) entnommen. Ausgewertet werden die drei Versuchsdurchführungen nach Inkubation mit den Substratlösungen, die entweder 3 Tage bei Raumtemperatur, bei 4- 8 °C oder bei - 80 °C gelagert wurden.

- Untersuchung über die optimale Dauer der Inkubationszeit der Substratlösung auf der Mikrottestplatte bis zum Ablesezeitpunkt

Es soll untersucht werden, ob eine verlängerte Inkubation mit der Substratlösung zum Sinken der Nachweisgrenze für den Nachweis des Plasmids pXO2 führt.

Es werden 60 µl aus dem PCR Ansatz entnommen und ein PCR ELISA, wie unter Pkt. 3.2.10.3 (Vorschrift 1) beschrieben, durchgeführt. Der PCR ELISA wird zunächst wie unter

⁵⁴ bmg Biomedizintechnik, Dr. Gurath GmbH, D-Offenburg

Punkt 3.2.10.3 beschrieben nach 30 Minuten Inkubation mit der Substratlösung ausgewertet und anschließend wird die Mikrottestplatte wiederum für insgesamt 18 Stunden bei 37° C auf dem MTPS inkubiert und erneut ausgewertet.

Ferner soll die optimale Dauer der Inkubationszeit mit der Substratlösung ermittelt werden, dazu wird ein PCR ELISA für den Nachweis des Chromosoms, wie unter Pkt. 3.2.10.3 (Vorschrift 1) beschrieben, durchgeführt und das Ergebnis über einen Zeitraum von zwei Stunden während der Inkubation mit der Substratlösung alle 15 Minuten mit dem Fluoreszenzmeßgerät abgelesen.

- Überprüfung der Sensitivität und Festlegen der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit einem Fluoreszenzsubstrat:

Um die DNA Menge zu ermitteln, die gerade noch mit diesem PCR ELISA (s. Pkt. 3.2.10.3, Vorschrift 1) nachzuweisen ist (Nachweisgrenze), werden folgende Versuche durchgeführt: Aus zahlreichen PCR Ansätzen, die im Volumen von 100 µl durchgeführt werden (s. Pkt. 3.2.8), werden 60 µl des PCR Produktes pro Ansatz für den PCR ELISA verwendet. Untersucht wird, ob unterschiedliche DNA Mengen bis minimal 10 fg DNA mit dem PCR ELISA nachgewiesen werden können. Dabei wird die Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat sowohl für den Nachweis der Plasmide pXO1 und pXO2, als auch für das Chromosom festgelegt.

- Vergleich zwischen einer alternativen Vorschrift (Vorschrift 2) zur Durchführung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat und der unter Punkt 3.2.10.3 beschriebenen Vorschrift 1

Aus einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO1 im Volumen von 100 µl werden je 40 µl für die Durchführung von zwei unterschiedlichen PCR ELISA entnommen (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10). Die erste Versuchsdurchführung richtet sich vollständig nach der Vorschrift 1 von Pkt. 3.2.10.3. Bei der zweiten Versuchsdurchführung werden das Binden der inneren, mit Biotin markierten Primer, die Hybridisierung, das anschließende Waschen und die Antikörperinkubation wie in Pkt. 3.2.10.1 durchgeführt. Dabei ist der Antikörper mit dem Enzym Alkalische Phosphatase markiert und wird wie bei der Gebrauchslösung 1 von Pkt. 3.2.10.2 mit Konjugatpuffer (Flasche Nr. 6) 1 : 100 verdünnt. Im Anschluß an die Inkubation mit dem Antikörper richtet sich die Versuchsdurchführung nach der Vorschrift 1 von Pkt. 3.2.10.3.

- direkter Vergleich zwischen dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat und dem PCR Dig Detection Kit

Um festzustellen, ob der PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat sensitiver ist, als der PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.2.10.1), wird folgender Versuch durchgeführt: Aus einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO1 im Volumen von 100 µl werden je 40 µl für die Durchführung von zwei unterschiedlichen PCR ELISA entnommen (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10). Die erste Versuchsdurchführung wird nach der unter Pkt. 3.2.10.1 beschriebenen Methode bearbeitet, die andere wird wie unter der in Pkt. 3.2.10.3 (Vorschrift 1) beschriebenen Methode bearbeitet. Die Ergebnisse werden ausschließlich von der Art der Durchführung des PCR ELISA bestimmt und werden vergleichend gegenübergestellt.

3.2.10.4 Durchführung eines PCR ELISA mit kovalent an die Mikrottestplatte gebundenen Sonden

(zur Beschreibung des Systems s. Pkt. 3.1.8)

Die Bindung der Sonden an die Mikrotestplatte erfolgt vor der eigentlichen Durchführung des PCR ELISA. Die mit den Sonden beschichteten Mikrotestplatten können anschließend für 4 Wochen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

- Binden der Fängersonden an die Oberfläche der Mikrotestplatte durch Ausbildung einer Phosphoramidbindung (RASMUSSEN et al., 1991)

Die Mikrotestplatte ist mit sekundären Aminen beschichtet (s. Pkt. 3.1.8.1). Zwischen den sekundären Aminen und der Phosphatgruppe der Fängersonden wird eine kovalente Bindung ausgebildet:

- Es wird eine Lösung hergestellt, in der beide Fängersonden im Verhältnis 1:1 enthalten sind. Die DNA Konzentration pro Fängersonde beträgt $3,75\text{ ng}/\mu\text{l}$.
- Eiskalte $0,1\text{ M}$ 1- Methylimidazol- Lösung ($\text{pH } 7$) wird auf eine Endkonzentration von 10 mM zu den Fängersonden zugesetzt. Pro Vertiefung der Mikrotestplatte werden $75\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung einpipettiert.
- 1- Ethyl -3-(3- Dimethylaminopropyl)- carbodiimid (EDAC) wird in einer $0,01\text{ M}$ Methylimidazol (1- MeIm7)- Lösung zu einer Endkonzentration von $0,2\text{ M}$ aufgelöst. Je $25\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung werden in jede Vertiefung der Mikrotestplatte zugegeben.
- Die Mikrotestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und 5 h bei 50°C inkubiert.
- Die Vertiefungen werden anschließend dreimal je 1 Minute mit der Waschlösung nach RASMUSSEN (s. Anhang) gewaschen, danach einmal für 5 Minuten mit dieser Waschlösung inkubiert und anschließend wieder dreimal je 1 Minute gewaschen.
- Die Mikrotestplatten werden bei Raumtemperatur getrocknet. Sie werden mit Folie gut abgeklebt und können anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

- Vorschrift 1 zur Durchführung des PCR ELISA mit kovalent an die Oberfläche der Mikrotestplatten gebundenen Sonden

- In die zuvor mit den Sonden beschichteten Mikrotestplatten werden $200\text{ }\mu\text{l}$ Hybridisierungspuffer (Bestandteil des PCR Dig Detection Kits) eingefüllt und die Mikrotestplatten werden anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Der Hybridisierungspuffer wird mit Schwung dekantiert. Die Mikrotestplatte wird umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten der Waschflüssigkeit zu befreien.

Die weitere Versuchsdurchführung des PCR ELISA mit kovalent an die Oberfläche der Mikrotestplatte gebundenen Sonden richtet sich nach der Vorschrift zur Durchführung des PCR Dig Detection Kits (s. Pkt. 3.2.10.1). Im Unterschied zum PCR Dig Detection Kit werden keine mit Biotin markierten Sonden verwendet und es werden die zuvor kovalent mit Sonden beschichteten Mikrotestplatten benutzt. An Stelle der Hybridisierungslösung (im Hybridisierungspuffer gelöste Sonden) wird der Hybridisierungspuffer verwendet.

- Überprüfung der Sensitivität und Festlegen der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit kovalent an die Oberfläche der Mikrotestplatte gebundenen Sonden:

Um die DNA Menge zu ermitteln, die gerade noch mit diesem PCR ELISA (s. Pkt. 3.2.10.4, Vorschrift 1) nachzuweisen ist (Nachweisgrenze), werden folgende Versuche durchgeführt: Aus zahlreichen PCR Ansätzen, die im Volumen von $100\text{ }\mu\text{l}$ durchgeführt werden (s. Pkt. 3.2.8), werden $60\text{ }\mu\text{l}$ des PCR Produktes pro Ansatz für den PCR ELISA verwendet. Untersucht wird, ob unterschiedliche DNA Mengen bis minimal 10 fg DNA mit dem PCR ELISA nachgewiesen werden können. Dabei wird die Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat sowohl für den Nachweis der Plasmide pXO1 und pXO2, als auch für das Chromosom festgelegt.

- direkter Vergleich zwischen dem PCR ELISA mit kovalent an die Oberfläche der Mikrotestplatte gebundenen Sonden und dem PCR Dig Detection Kit

Aus einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO1 im Volumen von 100 µl werden je 40 µl für die Durchführung von zwei unterschiedlichen PCR ELISA entnommen (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10). Die erste Versuchsdurchführung wird nach der unter Pkt. 3.2.10.1 beschriebenen Methode bearbeitet, die andere wird wie unter der in Pkt. 3.2.10.4 (Vorschrift 1) beschriebenen Methode bearbeitet. Die Ergebnisse werden ausschließlich von der Art der Durchführung des PCR ELISA bestimmt und werden vergleichend gegenübergestellt.

- Vergleich zwischen der Vorschrift 1 (s. Pkt. 3.2.10.4) und einer alternativen Versuchsdurchführung (Vorschrift 2) zur Durchführung des PCR ELISA mit kovalent an die Oberfläche der Mikrotestplatte gebundenen Sonden

Es soll untersucht werden, ob der PCR ELISA mit kovalent an die Oberfläche der Mikrotestplatte gebundenen Sonden weitgehend ohne Verwendung der Reaktionspuffer des PCR Dig Detection Kit durchgeführt werden kann, ohne dabei an Sensitivität zu verlieren. Aus einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO1 im Volumen von 100 µl werden einmal 40 µl für die Durchführung des PCR ELISA nach der Vorschrift 1 (s. Pkt. 3.2.10.4) entnommen und für die Durchführung des PCR ELISA nach der Vorschrift 2 werden aus demselben PCR Ansatz 51 µl entnommen (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10). Die zweite Versuchsdurchführung wird unter Verwendung der Reaktionspuffer nach LAGE et al. (1996) nach folgender Vorschrift bearbeitet:

Gebrauchslösungen:

1. Puffer A, Hybridisierungspuffer A, Konjugatpuffer A:

Diese Lösungen werden von LAGE et al. (1996) beschrieben (s. Anhang).

2. Anti Dig POD- Lösung A:

Das Anti Dig POD aus dem PCR Dig Detection Kit wird auf eine Konzentration von 1 mU/µl mit Wasser verdünnt (durch Lösen des lyophilisierten Antikörpers in 250 µl Wasser) und die Lösung wird bei 4 °C gelagert. Vor jedem Versuchsansatz wird es frisch 1 : 100 mit dem Konjugatpuffer A (s. Anhang) verdünnt.

3. Denaturierungslösung A:

LAGE et al. (1996) denaturieren das PCR Produkt mit 0,25 M NaOH⁵⁵ Lösung, dabei werden die Denaturierungslösung und das PCR Produkt im Verhältnis 5 : 1 gemischt. Um das PCR Produkt mit der Denaturierungslösung wie im PCR Dig Detection Kit im Verhältnis 3 : 5 zu mischen, muß die Denaturierungslösung entsprechend 0,5 M sein.

4. Waschpuffer, ABTS- Substratlösung:

Diese sind Bestandteile des PCR Dig Detection Kit und werden nach den Herstellerangaben angesetzt (s. Pkt. 3.2.10.1).

- In die zuvor mit den Sonden beschichteten Mikrotestplatten (s. o.) werden 200 µl Puffer A eingefüllt und die Mikrotestplatten werden anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur rehydriert. Der Puffer A wird anschließend mit Schwung dekantiert und die Mikrotestplatte wird umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten des Puffer A zu befreien.

- 51 µl (bzw. 60 µl⁵⁶) PCR Produkt werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

- 34 µl (bzw. 40 µl⁵⁹) Denaturierungslösung A (0,5 M NaOH) werden hinzugefügt (Verhältnis 3 : 5).

⁵⁵ Merck, D- Darmstadt, Art. Nr. 8418

⁵⁶ s. Vorschrift 3 zur Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden

- Nach gründlichem Vermischen auf dem Vortexer wird anschließend zentrifugiert und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert.
- Im Verhältnis 1 : 1 wird die Hybridisierungslösung A zugesetzt, 85 µl (bzw. 400 µl Hybridisierungslösung B⁵⁹, s. Anhang).
- Auf dem Vortexer wird gründlich gemischt und pro Vertiefung der Mikrottestplatte (MTP) werden 80 µl (bzw. 200 µl⁵⁹) einpipettiert. Dabei werden je zu untersuchende Probe stets zwei Vertiefungen (Wert 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10) gefüllt.
- Die Mikrottestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und wird 1,5 Stunden bei 37 °C auf einem Mikrottestplattenschwenker inkubiert.
- Die Lösungen werden mit Schwung dekantiert und pro Vertiefung fünfmal für je 1 Minute mit 250 µl Puffer A gewaschen.
- Nach dem letzten Waschschrift wird die Mikrottestplatte nach Dekantieren der Waschflüssigkeit umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten der Waschflüssigkeit zu befreien.
- 200 µl Anti Dig POD- Lösung A werden nun in die Vertiefungen pipettiert.
- Die MTP wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und die Anti Dig POD- Lösung wird jetzt in der Mikrottestplatte 30 Minuten bei 37 °C auf dem MTPS inkubiert.
- Die Lösungen werden mit Schwung dekantiert und pro Vertiefung 3-5 mal für je 1 Minute mit 250 µl Waschpuffer gewaschen.
- Nach dem letzten Waschschrift wird die Mikrottestplatte nach Dekantieren der Waschflüssigkeit umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten der Waschflüssigkeit zu befreien.
- 200 µl ABTS- Substratlösung werden in die Vertiefungen eingefüllt.
- Die Mikrottestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und wird für 30 Minuten im Dunkeln bei 37 °C auf dem MTPS inkubiert.
- Bei 405 nm Wellenlänge (Referenzfilter 492 nm) wird die Absorption im ELISA Reader abgelesen.

- Vergleich zwischen der Vorschrift 1 (s. Pkt. 3.2.10.4) und einer alternativen Versuchsdurchführung (Vorschrift 3) zur Durchführung des PCR ELISA mit kovalent an die Oberfläche der Mikrottestplatte gebundenen Sonden

Bei der Durchführung der Vorschrift 1 des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden wird das denaturierte PCR Produkt in einem Volumen von 200 µl an die Mikrottestplatte hybridisiert. In der Vorschrift 3 wird der Hybridisierungspuffer A (LAGE et al., 1996, s. Vorschrift 2) 5 : 8 mit Wasser verdünnt (Hybridisierungspuffer B, s. Anhang). Die Vorschrift 3 entspricht weitgehend der Vorschrift 2, die Volumina für die Reaktionslösungen sind in der Vorschrift 2 in Klammern gesetzt enthalten und an Stelle des Hybridisierungspuffers A wird der Hybridisierungspuffer B verwendet.

Um festzustellen, ob die gemessenen Absorptionswerte des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden nach der Vorschrift 3 mit denen des PCR ELISA nach der Vorschrift 2 vergleichbar sind, wird folgender Versuch durchgeführt:

Aus einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO1 im Volumen von 200 µl werden je 60 µl für die Durchführung von zwei unterschiedlichen PCR ELISA entnommen (Versuchsdurchführung 1 und 2, s. Pkt. 3.2.10). Die erste Versuchsdurchführung wird nach der Vorschrift 1 und die zweite Versuchsdurchführung wird nach der Vorschrift 3 bearbeitet. Die Ergebnisse werden ausschließlich von der Art der Durchführung des PCR ELISA bestimmt und werden vergleichend gegenübergestellt.

3.2.10.5 Steigerung der Sensitivität des PCR ELISA durch den Testkit AmpliQ

(s. Pkt. 3.1.9)

Gebrauchslösungen

1. Anti Dig AP Lösung: Diese enthält den gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Das Anti- Digoxigenin AP Fab fragment enthält 750 U pro μl und wird zunächst in autoklaviertem Wasser aus einer Milliporeanlage auf eine Endkonzentration von 1 U pro μl verdünnt (1 μl Anti Dig AP Konjugat in 749 μl Millipore lösen). Das verdünnte Das Anti- Digoxigenin AP Fab Fragment kann bei 4 °C gelagert werden. Es wird vor der Durchführung des PCR ELISA frisch 1 : 100 im Anti Dig POD Konjugat (Bestandteil des PCR Dig Detection Kit) gelöst.
2. Waschpuffer für den AmpliQ: Das Waschpufferkonzentrat ist ein Bestandteil des AmpliQ und wird 1 : 20 mit Wasser aus einer Milliporeanlage verdünnt. Der Waschpuffer wird vor der Durchführung des PCR ELISA frisch hergestellt.
3. Der Amplifier A, der Amplifier B und die Stopp Lösung sind Bestandteile des Testkits.

Vorschrift:

Der PCR ELISA wird bis zur Inkubation mit dem Antikörperkonjugat, wie unter Punkt 3.2.10.1 beschrieben, durchgeführt, danach schließt sich folgende Vorschrift an:

- 200 μl Anti Dig AP Lösung (Gebrauchslösung 1, s. o.) werden in die Vertiefungen der Mikrottestplatte pipettiert.
- Die MTP wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und die Anti Dig AP Lösung wird jetzt in der Mikrottestplatte 30 Minuten bei 37 °C auf dem Mikrottestplattenschwenker (MTPS) inkubiert.
- Die Lösungen werden mit Schwung dekantiert und pro Vertiefung viermal für je 1 Minute mit 250 μl Waschpuffer für den AmpliQ (s. Gebrauchslösung 2, s. o.) gewaschen.
- Nach dem letzten Waschschrift wird die Mikrottestplatte nach Dekantieren der Waschflüssigkeit umgedreht und auf Zellstoff aufgedrückt, um sie von den Resten der Waschflüssigkeit zu befreien.
- Der Amplifier A und der Amplifier B befinden sich in einer Flasche mit einer Tropfvorrichtung, um sie vor Verunreinigungen durch ubiquitär vorkommende Alkalische Phosphatasen zu bewahren. Die jeweils für einen Versuch benötigte Menge (100 μl pro Vertiefung der Mikrottestplatte) wird in ein steriles Einmalgefäß getropft. Ein Tropfen entspricht dabei einem Volumen von ca. 50 μl .
- 100 μl Amplifier A werden aus dem Einmalgefäß in die Vertiefung der Mikrottestplatte pipettiert
- Unmittelbar danach werden 100 μl Amplifier B aus einem Einmalgefäß mit einer Pipette in die Vertiefungen der Mikrottestplatte eingefüllt. Der Amplifier B wird in der gleichen Reihenfolge in die Vertiefungen der Mikrottestplatte eingefüllt, wie der Amplifier A.
- Die Mikrottestplatte wird mit Folie gegen Verdunstungsverluste abgedichtet und wird für 30 Minuten im Dunkeln bei 37 °C auf dem MTPS inkubiert.
- Die Stopp Lösung befindet sich ebenfalls in einer Flasche mit einer Tropfvorrichtung. Zwei Tropfen (ca. 100 μl) der Stopp Lösung werden in der gleichen Reihenfolge in die Vertiefungen der Mikrottestplatte eingefüllt, wie der Amplifier A und B.
- Bei 492 nm Wellenlänge (Referenzfilter 650 nm) wird die Absorption im ELISA Reader abgelesen. (Die Versuchsergebnisse werden auch ohne den Referenzfilter bei 492 nm Wellenlänge gemessen werden.)

- Überprüfung der Sensitivität und Festlegen der Nachweisgrenze des mit dem Testkit AmpliQ erweiterten PCR ELISA

Um die DNA Menge zu ermitteln, die gerade noch mit diesem PCR ELISA (s. Pkt. 3.2.10.5) nachzuweisen ist (Nachweisgrenze), werden folgende Versuche durchgeführt:

Aus zahlreichen PCR Ansätzen, die im Volumen von 100 µl durchgeführt werden (s. Pkt. 3.2.8), werden 60 µl des PCR Produktes pro Ansatz für den PCR ELISA verwendet. Untersucht wird, ob unterschiedliche DNA Mengen bis minimal 10 fg mit dem PCR ELISA nachgewiesen werden können. Dabei wird die Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Testkit AmpliQ sowohl für den Nachweis der Plasmide pXO1 und pXO2, als auch für das Chromosom festgelegt.

3.2.10.6 Steigerung der Sensitivität des PCR ELISA durch Erhöhung der MgCl₂-Konzentration im Prämix der PCR

Bei Erhöhung der MgCl₂- Konzentration auf 2,5 mM wird der Einbau von Uracil in das PCR Produkt vermehrt (s. BOEHRINGER Produktinformation zur Uracil- DNA Glykosylase). Im PCR Dig Lab Mix ist das Digoxigenin an Uracil gebunden (Digoxigenin- 11- dUTP), es ersetzt einen Teil des dTTP (s. Pkt. 3.2.8.2). Eine Erhöhung der MgCl₂- Endkonzentration im Prämix bewirkt einen vermehrten Einbau von Uracil und somit auch Digoxigenin in das PCR Produkt. Um festzustellen, ob sich durch Erhöhung der MgCl₂- Endkonzentration die Nachweisgrenze des PCR ELISA senken läßt, werden folgende Versuchsansätze durchgeführt:

- Ein PCR ELISA für den Nachweis des Plasmids pXO1 wird, wie unter Pkt. 3.2.10.1 (Durchführung eines PCR ELISA aus einer PCR im Volumen von 50 µl) beschrieben, durchgeführt. Im Unterschied zu der unter Pkt. 3.2.10.1 beschriebenen Vorschrift zur Durchführung des PCR ELISA im Volumen von 50 µl, beträgt die MgCl₂- Endkonzentration im Prämix der PCR 2,5 mM.
- Ein PCR ELISA für den Nachweis des Plasmids pXO2 wird, wie unter Pkt. 3.2.10.3 (Vorschrift 1) beschrieben, durchgeführt. Die MgCl₂- Endkonzentration im Prämix der PCR beträgt 2,5 mM.

3.2.11 Nachweis von ca. 4 Sporen von *Bacillus anthracis* in 100g Erde

Um festzustellen, ob mit den geänderten Bedingungen für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben bis zu ca. 4 Sporen in 100 g Erde nachgewiesen werden können, wird folgender Versuch durchgeführt:

Die Erdprobe wird in Portionen von 100 g eingeteilt und wie unter Pkt. 3.2.1 mit ca. 4 Sporen beimpft. Die Vorschrift für die Anzucht und das Abtöten von *Bacillus anthracis* aus Erdproben richtet sich nach Pkt. 3.2.1. Die DNA wird entweder mit dem EASY DNA™ Kit (s. Pkt. 3.2.3) oder mit dem Puregene DNA Isolation Kit (s. Pkt. 3.2.4, Vorschrift 1) präpariert. Die PCR wird, wie unter Pkt. 3.2.8 beschrieben, unter Verwendung des PCR Dig Lab Mix und mit Einführung des Zeitincrementsegmentes für die Extension, durchgeführt. Für den Nachweis der PCR Produkte dient der PCR Dig Detection Kit (s. Pkt. 3.10.1) oder der PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden (s. Pkt. 3.2.10.4, Vorschrift 1).

3.2.12 Untersuchung über das Vorkommen von Mikroorganismen in Erdproben, die ein falsch positives Ergebnis der PCR (bzw. des PCR ELISA) für den Nachweis von *Bacillus anthracis* verursachen

Mit Hilfe der Koloniehybridisierung sollen Mikroorganismen aus den Erdproben isoliert werden, die zu einem falsch positiven Ergebnis der PCR (bzw. des PCR ELISA) für den Nachweis des Plasmids pXO2 oder des Chromosoms führen. Bei der Koloniehybridisierung werden aus den Erdproben (Mischkultur) gewonnene Einzelkolonien als Abdruck auf ein Nitrocellulosefilter übertragen. Die Zellen der Bakterienkolonien werden so behandelt, daß die denaturierte DNA der Einzelkolonien an das Filter gebunden ist. Anschließend hybridisiert eine PCR Fragmentsonde (denaturiertes Produkt der PCR, das während der PCR durch den Einbau von Dig- 11- dUTP markiert wird) partiell oder total an die denaturierte DNA des gesuchten Mikroorganismus. Mit Hilfe eines gegen Digoxigenin gerichteten, mit einem Enzym markierten Antikörpers kann dann der gesuchte Mikroorganismus über eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Die genaue Vorschrift zur Durchführung der Koloniehybridisierung richtet sich nach den Angaben von BEYER (1997, persönliche Mitteilung). Kolonien, die aufgrund des Ergebnisses der Koloniehybridisierung verdächtig sind, werden als Reinkulturen isoliert. Zusätzlich werden jeweils ca. 60 Kolonien direkt als Reinkultur aus den Erdproben isoliert, weil sie als Einzelkolonien auf dem zur Anzucht verwendeten TSB- Agar (s. Anhang) zu winzigen Kolonien bilden, um mit der Koloniehybridisierung getestet zu werden.

- Überprüfung der aus den Erdproben isolierten Bakterienkolonien

Die isolierten Mikroorganismen werden mit Hilfe der PCR und des PCR ELISA überprüft, ob sie zu einem falsch positiven Nachweis für das Chromosom oder für das Plasmid pXO2 führen.

Von den isolierten Bakterienkolonien werden Reinkulturen für ca. 12 h bei 37 °C in 9 ml TSB auf einem Brutschüttler mit 220 Umdrehungen/ Minute angezchtet. 100 µl der 12 h Kultur werden erneut in 9 ml TSB überimpft und für 6 h bei 37 °C auf einem Brutschüttler mit 220 Umdrehungen/ Minute inkubiert. Die Zellen werden anschließend durch Zentrifugieren (15 Minuten bei 4 °C mit 3000 g) pelletiert und der Überstand wird verworfen. Die DNA wird, wie unter Pkt. 3.2.3 beschrieben, präpariert.

Ein Mikroliter der DNA- Lösung wird als Template (Ziel- DNA) in einer PCR für den Nachweis des Chromosoms (mit den Primern R1 und R2, s. Pkt. 3.2.8.1) bzw. für den Nachweis des Plasmids pXO2 eingesetzt. Für den Nachweis des Plasmids werden die inneren Primer Cap9 und Cap102, wie unter Pkt. 3.2.8 beschrieben, eingesetzt. Falls die PCR positiv ist, wird die DNA- Lösung auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt und die PCR wird mit 100 ng Ziel- DNA wiederholt. Die PCR wird, wie unter Pkt. 3.2.8.2 beschrieben, anschließend mit der Agarosegelelektrophorese ausgewertet. Zusätzlich wird ein PCR ELISA, wie unter Pkt. 3.2.10.1 beschrieben, durchgeführt.

- Identifikation der aus den Erdproben isolierten Bakterien, die zu einem falsch positiven Nachweis von *Bacillus anthracis* führen

Die Bakterienkolonien aus den Erdproben, die in der PCR und im PCR ELISA positiv sind, werden auf Hammelblutagarplatten und auf dem von KNISELY (1966) beschriebenen Selektivnährboden für die Anzucht von *Bacillus anthracis*, PLET Medium (s. Anhang), angezchtet, um ihre Wachstumsfähigkeit auf diesen Nährmedien zu testen.

Aufgrund ihrer Stoffwechseleigenschaften werden die Kolonien aus den Erdproben biochemisch mit dem ApiCH50⁵⁷ nach LOGAN et al. (1985) identifiziert. Der ApiCH50 wird nach Herstellerangaben durchgeführt, die Ergebnisse des ApiCH50 werden abgelesen und zur Auswertung zum Hersteller eingeschickt.

- Durchführung einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO2 mit Ziel- DNA von Stämmen des *Bacillus licheniformis*

Um zu überprüfen, ob Stämme von *Bacillus licheniformis*, die in der Erde vorkommen, für den Nachweis des Plasmids pXO2 positiv sind, wird folgender Versuch durchgeführt: Die unter Tab. 1 aufgeführten Stämme von *Bacillus licheniformis* werden für ca. 12 h in 9 ml TSB bei 37 °C auf einem Brutschüttler bei 220 Umdrehungen pro Minute angezüchtet. Anschließend wird die Bakterienkultur mit 3000 x g bei 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die DNA wird, wie unter Pkt. 3.2.3 beschrieben, mit dem EASY DNA™ Kit präpariert. Ein Mikroliter der DNA- Lösung wird als Template in einer PCR für den Nachweis des Plasmids pXO2 mit den Primern Cap9 und Cap102, wie unter Pkt. 3.2.8 beschrieben, eingesetzt. Die PCR wird mit der Agarosegelelektrophorese ausgewertet (s. Pkt. 3.2.8.2).

3.2.13 Spaltung der Produkte der nested PCR aus Erdproben, die für den Nachweis von *Bacillus anthracis* positiv sind, mit Restriktionsendonukleasen

Um zu überprüfen, ob die Sequenz des mit der nested PCR vermehrten DNA Fragmentes aus den Erdproben identisch ist mit der Sequenz von *Bacillus anthracis*, wird das Produkt der nested PCR mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die in beiden Strängen eines DNA Moleküls innerhalb spezifischer Basensequenzen (Spaltorte) Phosphodiester- Bindungen spalten (IBELGAUFTS, 1990). Die Produkte der nested PCR werden von den Restriktionsendonukleasen nur gespalten, wenn die Spaltorte, die für das jeweilige Enzym spezifisch sind, im Produkt der nested PCR vorkommen.

- Spaltung des Produktes der nested PCR für den Nachweis des Plasmids pXO2 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern.

Das Produkt der nested PCR liegt innerhalb des Genabschnitts cap B des Plasmids pXO2. Übernimmt man die Positionsangaben von MAKINO et al. (1989), so liegt das Produkt der nested PCR zwischen den Basen 617 und 1394. Es hat eine Länge von 777 bp und wird von der Restriktionsendonuklease BamH I⁵⁸ an der Spaltstelle 1005 in zwei Spaltprodukte mit einer Länge von 388 bp und 389 bp gespalten. Die Restriktionsendonuklease Xba I⁵⁹ spaltet das Produkt der nested PCR an der Spaltstelle 1123. Es entstehen zwei Spaltprodukte mit einer Länge von 253 bp und 524 bp.

- Spaltung des Produktes der nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts cap C des Plasmids pXO2.

Die Primer 17 und 20 für die erste PCR werden von RAMISSE et al. (1996) beschrieben. Als innere Primer für die nested PCR werden Cvi und Cri verwendet (BEYER, persönliche Mitteilung). Übernimmt man die Positionsangaben von MAKINO et al. (1989), so liegt das Produkt der nested PCR zwischen den Basen 1602 und 1830. Es hat eine Länge von 228 bp und wird von der Restriktionsendonuklease Dra I⁶⁰ an der Spaltstelle 1749 in zwei

⁵⁷ bio Merieux, D-Nürtingen, Art. Nr. 50430

⁵⁸ Pharmacia Biotech, D-Freiburg, Art. Nr. 27086803

⁵⁹ Pharmacia Biotech, D-Freiburg, Art. Nr. 27095001

⁶⁰ Pharmacia Biotech, D-Freiburg, Art. Nr. 27094101

Spaltprodukte mit einer Länge von 147 bp und 81 bp gespalten. Die Restriktionsendonuklease Hae III⁶¹ spaltet das Produkt der nested PCR an der Spaltstelle 1707. Es entstehen zwei Spaltprodukte mit einer Länge von 105 bp und 123 bp.

- Vorschrift zur Durchführung der Spaltung der PCR Produkte

Die PCR Produkte werden zunächst mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit gereinigt (s. Pkt. 3.2.7) und anschließend im Volumen von 20 µl original nach Herstellerangaben mit den Restriktionsendonukleasen gespalten. Die gespaltenen PCR Produkte werden gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Pkt. 3.2.8.2).

3.2.14 Sequenzierung der Produkte der nested PCR für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Erdproben

Um festzustellen, ob die Sequenz der Produkte der nested PCR aus Erdproben mit der Sequenz von *Bacillus anthracis* übereinstimmt, wird folgender Versuche durchgeführt:

- Sequenziert werden die Produkte der nested PCR aus Erdproben für den Nachweis der Genabschnitte cap B und cap C des Plasmids pXO2. Zusätzlich wird, als Positivkontrolle über den korrekten Ablauf der Sequenzierung, das Produkt der nested PCR aus 1 pg DNA (Ziel- DNA) vom Stamm A42 zum Sequenzieren eingeschickt. Die PCR wird, wie unter Pkt. 3.2.8 beschrieben, mit den unter Pkt. 3.2.13 beschriebenen Primern durchgeführt. Als Ziel- DNA für die PCR wird dieselbe DNA- Lösung eingesetzt, die für die Spaltung der Produkte der nested PCR verwendet wird (s. Pkt. 3.2.13). Die Produkte der nested PCR werden zunächst mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit (s. Pkt. 3.2.7) gereinigt. Anschließend wird die Konzentration der PCR Produkte wie in Pkt. 3.2.6 beschrieben mittels UV- Absorption bestimmt. Zusammen mit den Primern für die nested PCR werden die Produkte der nested PCR mit dem Auftrag zur Sequenzierung an folgende Adresse versandt:

Fa. InViTek, Robert- Rössle Str. 10, D- 13125 Berlin- Buch, Biomedizinischer Forschungscampus, zu Händen Herrn Honeck

- Zusätzlich wird das Produkt der seminested PCR aus Erdproben für den Nachweis des Genabschnitts cap C des Plasmids pXO2 zum Sequenzieren eingeschickt. Die seminested PCR wird, wie unter Pkt. 3.2.8.3 beschrieben, mit den unter Pkt. 3.2.16 beschriebenen Primern durchgeführt. Da das Produkt der seminested PCR nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus mehreren Banden unterschiedlicher Größe besteht (s. Pkt. 4.15 Abb. 26), wird die 512 kb große Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Sie wird, wie in der Herstellervorschrift beschrieben, mit dem Jet Sorb Gel Extraction Kit/150⁶² gereinigt. Die weitere Versuchsdurchführung richtet sich nach der oben angegebenen Vorschrift.

3.2.15 Kontrolle der Spezifität der übrigen Primer, die bisher für den Nachweis des Plasmids pXO2 beschrieben wurden

Die Primer von SJÖSTEDT et al. (1995 und 1997), von RAMISSE et al. (1996), von REIF et al. (1994) und die Primer von MAKINO et al. (1993) werden getestet, ob sie spezifisch sind für den Nachweis des Plasmids pXO2 von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben (s. Tab. 2). Als Ziel- DNA für die PCR wird die DNA- Lösung eingesetzt, die sowohl für die Sequenzierung (s. Pkt. 3.2.14), als auch für die Spaltung der PCR Produkte (s. Pkt. 3.2.13) verwendet wird.

⁶¹ Pharmacia Biotech, D-Freiburg, Art. Nr. 27086803

⁶² Genomed, D-Bad Oeynhausen, Art. Nr. 110150

Folgende Primer haben eine identische Sequenz:

- 17 (RAMISSE et al., 1996) und BA17 (SJÖSTEDT et al., 1995)
- 20 (RAMISSE et al., 1996) und BA20 (SJÖSTEDT et al., 1995)
- 57 (RAMISSE et al., 1996) und BA57 (SJÖSTEDT et al., 1997)
- BA58 von SJÖSTEDT et al. (1997) hat am 5' Ende ein Nukleotid mehr als der Primer 58 von RAMISSE et al. (1996).
- Die Primer 17 und 20 (RAMISSE et al., 1996) werden als äußere Primer für die erste PCR eingesetzt. Als innere Primer für die Durchführung der, wie unter Pkt. 3.2.8.3 beschriebenen, nested PCR wird der von SJÖSTEDT et al. (1997) beschriebene Primer BA58 und der Primer 57 (RAMISSE et al., 1996) verwendet.
- Eine PCR mit den von MAKINO et al. (1993) beschriebenen Primern MO1 und MO2 wird, wie unter Pkt. 3.2.8 beschrieben, durchgeführt.
- Die Primer BACA1FI und BACA6RI (REIF et al., 1994) werden als äußere Primer für die erste PCR eingesetzt. Als Primer für die Durchführung der, wie unter Pkt. 3.2.8.3 beschriebenen, seminested PCR wird der von BEYER et al. (1995) beschriebene Primer Cap9 (innerer Primer) und der Primer BACA6RI (REIF et al., 1994) eingesetzt.

3.2.16 Suche nach Primern, die spezifisch für den Nachweis des Plasmids pXO2 und für das Chromosom von *Bacillus anthracis* sind

Es werden Primer für den spezifischen Nachweis des Plasmids pXO2 oder des Chromosoms von *Bacillus anthracis* aus Erdproben gesucht:

- Suche nach einem spezifischen Primer für den Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

Mit Hilfe der von ETIENNE- TOUMELIN et al. (1994) beschriebenen Sequenz des Gens für das S- Layer Protein von *Bacillus anthracis* werden die Primer SAP1V, SAP2V, SAP3V, SAP3R und SAP1R (s. Tab. 2) für den Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis* ausgesucht.

- Um festzustellen, ob sich die Primer für die Durchführung einer PCR eignen, wird folgender Versuch durchgeführt: Es wird je eine PCR mit den Primern SAP1V und SAP1R, sowie mit den Primern SAP2V und SAP1R und mit den Primern SAP3V und SAP3R durchgeführt (s. Pkt. 3.2.8). Als Ziel- DNA werden 10 ng des Stammes A2 und A6 von *Bacillus anthracis* eingesetzt.
- Um festzustellen, ob die Primer SAP3V und SAP3R spezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben sind, wird folgender Versuch durchgeführt: Mit den Primern SAP3V und SAP3R wird eine, wie unter Pkt. 3.2.8 beschriebene, PCR durchgeführt. Als Ziel- DNA wird ein Mikroliter einer DNA- Lösung eingesetzt, die aus einer Bodenprobe stammt, die für den Nachweis der Plasmide pXO1 und pXO2 negativ ist.

- Suche nach einem spezifischen Primer für den Nachweis des Plasmids pXO2 von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben

Aufgrund der Ergebnisse der Sequenzierung (s. Pkt. 3.2.14) werden Primer ausgesucht, die sich an die Sequenz von *Bacillus anthracis* anlagern, nicht aber an die unter Pkt. 4.13 ermittelte Sequenz. Um festzustellen, ob diese Primer spezifisch sind für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben, wird folgender Versuch durchgeführt:

- Aus dem Genabschnitt cap B des Plasmids pXO2 wird der Primer cap10 ausgesucht (s. Tab. 2), der den Spaltort für das Restriktionsenzym BamH I beinhaltet. Die erste PCR wird wie unter Pkt. 3.2.8 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern Cap6 und Cap103 durchgeführt (s. Pkt. 3.2.8). Als Ziel- DNA für die erste PCR wird dieselbe DNA-

Lösung verwendet, die auch für die Sequenzierung (s. Pkt. 3.2.14) und für die Spaltung der PCR Produkte (3.2.13) eingesetzt wird. Die nested PCR wird, wie unter Pkt. 3.2.8.3 beschrieben, mit dem von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primer Cap9 und mit dem Primer Cap10 durchgeführt. Die Temperatur für das Annealing der nested PCR beträgt 60 °C.

- Aus dem Genabschnitt Cap C des Plasmids pXO2 wird der Primer Cap20rev ausgesucht. Die Sequenz des Primers Cap20rev unterscheidet sich an 4 Stellen von der unter Pkt. 4.13 beschriebenen Sequenz. Die erste PCR wird wie unter Pkt. 3.2.8 mit den von RAMISSE et al. (1996) beschriebenen Primern 17 und 20 durchgeführt (s. Pkt. 3.2.8). Als Ziel- DNA für die erste PCR wird dieselbe DNA- Lösung verwendet, die auch für die Sequenzierung (s. Pkt. 3.2.14) und für die Spaltung der PCR Produkte (3.2.13) eingesetzt wird. Die seminested PCR wird, wie unter Pkt. 3.2.8.3 beschrieben, mit dem Primer 17 und dem inneren Primer Cap20rev durchgeführt. Die Temperatur für das Annealing der seminested PCR beträgt 58 °C.