

**ANHANG A****MEDIEN FÜR DIE KULTURELLE ANZÜCHTUNG VON *B. BURGENDORFERI*****BSK-Medium**

(modifiziert nach SCHÖNBERG et al., 1988)

Aqua bidest. autoklavieren und auf 40°C abkühlen lassen	900,0 ml
- unter ständigem Rühren Zugabe von:	
CMRL 1066, 10x konzentriert, ohne Glutamin u. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Fa. Gibco)	100,0 ml
Neopepton (Fa. Difco)	5,0 g
Rinderalbumin, Fraktion V (Fa. Miles)	50,0 g
Yeastolate (Fa. Dicfo)	2,0 g
HEPES (Fa. Sigma)	6,0 g
Glucose (Fa. Sigma)	5,0 g
Natriumcitrat (Fa. Sigma)	0,7 g
Natriumpyruvat (Fa. Sigma)	0,8 g
N-Acetylglucosamin (Fa. Sigma)	0,4 g
Natriumbicarbonat (Fa. Sigma)	2,2 g
Gelatine (Fa. Merck) 7%ig (10 min bei 100°C lösen)	200,0 ml
- erwärmen des Gemisches auf etwa 37°C, dann Zugabe von:	
Kaninchenserum (Fa. Gibco), Endkonzentration 6%	72,0 ml
pH-Wert-Einstellung bei RT (Zugabe von 1 N NaOH)	pH 7,6
Wasserbad	1 h bei 37°C
Wasserbad	½ h bei 45°C
Sterilisation des Mediums durch Filtration (Celluloseacetatmembranfilter; 0,20 µm der Fa. Sartorius)	bei 37°C
Abfüllen in Kulturgefäße (Fa. Greiner)	
Sterilitätskontrolle	24 h bei 37°C
Aufbewahrung bei 4°C (kurz) oder -21°C (lang)	

**MKP-Medium**

(modifiziertes Kelly-Medium nach PREAC-MURSIC et al., 1992)

Aqua bidest. autoklavieren und auf 40°C abkühlen lassen	900,0 ml
- unter ständigem Rühren Zugabe von:	
CMRL 1066, 10x konzentriert, ohne Glutamin u. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Fa. Gibco)	100,0 ml
Neopepton (Fa. Difco)	3,0 g
HEPES (Fa. Sigma)	6,0 g
Natriumcitrat (Fa. Sigma)	0,7 g
Glucose (Fa. Sigma)	3,0 g
Natriumpyruvat (Fa. Sigma)	0,8 g
N-Acetylglucosamin (Fa. Sigma)	0,4 g
Natriumbicarbonat (Fa. Sigma)	2,0 g
Gelatine (Fa. Merck) 7%ig (15 min bei 115°C autoklaviert)	200,0 ml
- erwärmen des Gemisches auf etwa 37°C, dann Zugabe von:	
Kaninchenserum (Fa. Gibco), Endkonzentration 6%	*72,0 ml
Rinderserumalbumin (Fa. Miles) 35%ig	**50,0 ml
pH-Wert-Einstellung bei RT (Zugabe von 1 N NaOH)	pH 7,6
Wasserbad	1 h bei 37°C
Wasserbad	½ h bei 45°C
Sterilisation des Mediums durch Filtration (Celluloseacetatmembranfilter; 0,20 µm der Fa. Sartorius)	bei 37°C
Abfüllen in Kulturgefäße (Fa. Greiner)	
Sterilitätskontrolle	24 h bei 37°C
Aufbewahrung bei 4°C (kurz) oder -21°C (lang)	

\* statt 70 ml 72 ml wie für BSK-Medium nach persönlicher Mitteilung von Dr. A. Schönberg

\*\* statt 35 ml 50 ml nach Auskunft von Dr. B. Wilske und Mitarbeiter, Pettenkofer-Institut  
München am 12.10.2000

### **Hemmstoffe für BSK- und MKP-Medium**

#### **Hemmstoff-Kombination 1:**

- Rifampicin (Fa. Sigma)	10,0 µg/ml
- Fluorouracil-GRY (Fa. Lederle)	100,0 µg/ml
- Amphotericin B (Fa. Gibco)	2,0 µg/ml

#### **Hemmstoff-Kombination 2:**

- Rifampicin (Fa. Sigma)	30,0 µg/ml
- Polymyxin B (Fa. Sigma)	100,0 I.E./ml
- Bactrim (Fa. Roche)	600 µg/ml
- Amphotericin B (Fa. Gibco)	2,0 µg/ml

### **PUFFER UND REAGENZIEN FÜR DIE PCR – AGAROSE-GELELEKTROPHORESE**

#### **Agarosegel**

Agarose (Fa. Invitrogen), 100 g  
Electrophoresis Grade  
Cat.No. 15510-019

1 g Agarose in 50 ml 1x Elektrophoresepuffer einrühren; auf der Heizplatte kurz aufkochen, nach dem Abkühlen 3 µl Ethidiumbromid (1%ige Lösung, Fa. Merck) zugeben und leicht schwenken.

#### **Elektrophoresepuffer 10x TBE-Puffer (pH= 8,3-8,4)**

TRIS	109,0 g/l
Borsäure	55,6 g/l
EDTA	9,3 g/l
steriles Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

bei Raumtemperatur lagern

**Auftragspuffer**

Gel loading buffer (6x), 1,1 ml (Fa. Biozym)

Cat. No. 50632

**100-bp DNA-Längenstandard**

DNA Molecular Weight Marker XIV, 50 µl (Fa. Roche)

100 base pair ladder

Cat. No. 1721933

**PUFFER UND REAGENZIEN FÜR DEN BgVV-ELISA**

**Lyophilisat**

für die Antigenherstellung

- 0,5 ml Lyophilisat (1B29) resuspendieren in 0,5 ml Aqua bidest.
- Verdünnung mit 4,5 ml Carbonatpuffer (1:10)
- Pulsbeschallung mit Hilfe von Ultraschall (4x10 sec bei 20 Hz, MS 73/D) unter Eiskühlung
- Überstand durch Zentrifugieren gewinnen (20000 g, 10 min)

**Carbonatpuffer**

für die Plattenbeschichtung

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Fa. Merck)	1,59	g
NaHCO <sub>3</sub> (Fa. Merck)	2,92	g
Aqua bidest.	ad 1000,0	ml

**Carbonatpuffer + 3% FCS**

zum Blockieren der Proteinbindungsstellen

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Fa. Merck)	1,59	g
NaHCO <sub>3</sub> (Fa. Merck)	2,92	g
Fötale Kälberserum (FCS)	3	%
Aqua bidest.	ad 1000,0	ml

**PBS-Tween Puffer 20**

zum Waschen der Platten

NaCl (Fa. Merck)	8,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck)	2,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Merck)	0,2 g
KCL (Fa. Merck)	0,2 g
Tween 20 (Fa. Merck)	0,5 ml
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

**PBS-Tween Puffer 20 + 6% FCS**

Verdünnungspuffer

NaCl (Fa. Merck)	8,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck)	2,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Merck)	0,2 g
KCL (Fa. Merck)	0,2 g
Tween 20 (Fa. Merck)	0,5 ml
Fötales Kälberserum (FCS)	6 %
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

**Konjugat**

BgVV-internes Konjugat

IgY anti horse IgG (H+L)/PO

Fa. Sigma, 1:20 Verdünnung

ANTI-HORSE IgG (whole molecule) FITC Conjugate, 2 ml

Antibody developed in Rabbit

F-7759

**ABTS-Lösung**

Substrat

4,202 g Zitronensäure (Fa. Merck)	200 ml
7,162 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck)	200 ml
ABTS® (Fa. Boehringer Mannheim GmbH)	160 mg
C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> -(NH <sub>4</sub> )-M <sub>r</sub> 548.7, 2 g	
102 946	

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Perhydrol® (Fa. Merck)

Wasserstoffperoxid 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 250 ml

K27281110 011

## Stopplösung

zum Stoppen der Reaktion

Geschirrspülmittel (Citro) 1:10 in Aqua bidest.

## **PUFFER UND REAGENZIEN FÜR DEN INDIREKTEN IMMUNFLUORESCENZTEST (IFT)**

### PBS-MgCl<sub>2</sub>

Wasch- und Verdünnungspuffer für die Kultur

NaCl (Fa. Merck)	8,0	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck)	2,9	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Merck)	0,2	g
KCL (Fa. Merck)	0,2	g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck)	1,016	g
Aqua bidest.	ad 1000,0	ml
pH-Wert-Einstellung bei RT (Zugabe von 1 N NaOH)	pH 7,4	
Sterilisation des Mediums durch Filtration (Celluloseacetatmembranfilter; 0,20 µm der Fa. Sartorius)	bei 37°C	

### PBS-Puffer

Wasch- und Verdünnungspuffer für den IFT

NaCl (Fa. Merck)	8,0	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck)	2,9	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Merck)	0,2	g
KCL (Fa. Merck)	0,2	g
Aqua bidest.	ad 1000,0	ml
pH-Wert-Einstellung bei RT (Zugabe von 1 N NaOH)	pH 7,4	
Sterilisation des Mediums durch Filtration (Celluloseacetatmembranfilter; 0,20 µm der Fa. Sartorius)		

**Konjugat**

Verdünnung 1:20

ANTI-HORSE IgG (whole molecule) FITC Conjugate (Fa. Sigma)

Antibody developed in Rabbit, 2 ml

F-7759

Verdünnung 1:100 000

+ EVANS BLUE (Fa. Sigma)

C.I. 23860, Direct Blue 53

Dye content: Approx. 80%

$C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$

FW 9608