

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

Carbonatpuffer + 3% FCS

zum Blockieren der Proteinbindungsstellen

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

PBS-Tween Puffer 20

zum Waschen der Platten

NaCl (Fa. Merck)	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Fa. Merck)	2,9 g
KH ₂ PO ₄ (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 ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Fa. Merck)	2,9 g
KH ₂ PO ₄ (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 ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Fa. Merck)	200 ml
ABTS® (Fa. Boehringer Mannheim GmbH)	160 mg
C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₆ S ₄ -(NH ₄)-M _r 548.7, 2 g	
102 946	

H₂O₂

Perhydrol® (Fa. Merck)

Wasserstoffperoxid 30% H₂O₂, 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-MgCl₂

Wasch- und Verdünnungspuffer für die Kultur

NaCl (Fa. Merck)	8,0	g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Fa. Merck)	2,9	g
KH ₂ PO ₄ (Fa. Merck)	0,2	g
KCL (Fa. Merck)	0,2	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ 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 ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Fa. Merck)	2,9	g
KH ₂ PO ₄ (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