

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft der verwendeten Materialien

3.1.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

Für die Präparation von DNA

Biophotometer: Eppendorf, AG, Hamburg

Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®: Biozym, Hessisch Oldendorf

Fixvolumen-Pipetten: Abimed, Langenfeld

Küvetten: Bio-Rad, München

Lamina HeraSafe: Heraeus, Hanau

QIAamp® DNA Mini Kit: Qiagen, Hilden

Safe-Lock-Zentrifugengefäße (1,5 ml; 2 ml): Eppendorf AG, Hamburg

Schüttelbad Typ 1083: GFL, Burgwedel

Vortex-Genie™: Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Zentrifugen (Typ 5415C und 5417R): Eppendorf AG, Hamburg

Für die Durchführung von PCR, Gelelektrophorese und REA

1 kb-DNA Ladder: Lifetechnologies™ Gibco Brl, Galthersburg, USA

100 bp-DNA Ladder: New England Biolabs, Frankfurt a.M.

50 x dNTP-Mastermix (je 12,5 mM pro dNTP): Invitex, Berlin

Biopur-Zentrifugen-Gefäße (0,5 ml): Eppendorf AG, Hamburg

Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®: Biozym, Hessisch Oldendorf

Elektrophoresekammer Horizon®: Lifetechnologies™ Gibco Brl, Galthersburg, USA

Fixvolumen-Pipetten: Abimed, Langenfeld

iCycler iQ™ und die dazugehörige Software: Bio-Rad, München

Lamina HeraSafe: Heraeus, Hanau

Long-Distance-PCR Kit: Invitex, Berlin

Magnetrührer: Janke & Kunkel GmbH & Co KG, IKA-Werk, Staufen

MetaPhor® Agarose: Biozym, Hessisch Oldendorf

NuSieve® 3:1 Agarose: Biozym, Hessisch Oldendorf

Power Supply: Bio-Rad, München

Primer: Carl Roth, Karlsruhe

Qiagen Multiplex PCR Kit: Qiagen, Hilden

QuantiTect Multiplex PCR Kit: Qiagen, Hilden

Ready-To-Go™ PCR Beads: Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg

Restriktionsenzyme *KpnI*, *EcoRV* und *ApaI* mit dem jeweils empfohlenen Puffer und bovinem Serumalbumin (BSA), hundertfach: New England Biolabs, Frankfurt a.M.

Seakem® LE Agarose: Biozym, Hessisch Oldendorf

TaqMan-Sonden®: BioTeZ, Berlin

Thermoblöcke (Thermomixer comfort, Thermostat 5320): Eppendorf AG, Hamburg

Thermocycler T3: Biometra, Göttingen

Thin Wall Tubes: Bio-Rad, München

Videodokumentationssystem Bioprint DS und dessen Software BioCapt Version 97.05: LTF Labortechnik, Wasserburg

Für das Herstellen von DNA-Sonden und das Anfertigung der Dot-Blots

Anti-DIG AP Conjugate: Roche, Mannheim

Blocking-Reagenz: Roche, Mannheim

Biopur-Zentrifugen-Gefäße (0,5 ml): Eppendorf AG, Hamburg

Compact Line Hybridisierungsöfen OV4: Biometra, Göttingen

Disodium 3-(4-meth-oxyspiro [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan]-4-yl)phenyl phosphate (CSPD), 25 mM: Roche, Mannheim

DNA Labeling and Detection Kit, non radioactive: Boehringer, Mannheim

Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®: Biozym, Hessisch Oldendorf

Entwickler LX24: Kodak Industrie, Chalon s/Saône

Fixierer AL4: Kodak Industrie, Chalon s/Saône

Fixvolumen-Pipetten: Abimed, Langenfeld

Hybridisierungsflaschen: Biometra, Göttingen

Hybridisierungsnetze: Biometra, Göttingen

Hybridisierungsöfen: Biometra, Göttingen

Lachssperma: Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Lumi-Film Chemiluminescent Detection-Film: Roche, Mannheim

Maleinsäure: Sigma-Aldrich, Deisenhofen

MgCl₂: Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

Millipore Ultrafree®MC: Millipore Corporation, Bedford/USA

N-Laurylsarcosine: Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

Nylontransfermembran (Nytran®0,2): Schleicher & Schuell, Dassel

Pipettierhilfen (Accuboy): Integra Bioscience, Fernwald

SDS: Boehringer, Mannheim

Thermoblöcke (Thermomixer comfort, Thermostat 5320): Eppendorf AG, Hamburg

Tween[®]20: Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

UV–Stratalinker 2400: Stratagene, Heidelberg

UV–Transilluminator Typ UVT 2053 (302 nm, mittelwellig): Herolab, Wiesloch

Vortex–Genie™: Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Zentrifugen (Typ 5415C und 5417R): Eppendorf AG, Hamburg

Für die Klonierung von PCR–Amplifikaten in Plasmid–Vektoren und die Präparation von Plasmiden

Agar: Lifetechnologies™ Gibco Brl, Galthersburg, USA

Biopur–Zentrifugen–Gefäße (0,5 ml): Eppendorf AG, Hamburg

Bühler–Schüttelinkubator: J. Otto GmbH, Hechingen

Einmalpipettenspitzen Safeseal–Tips[®]: Biozym, Hessisch

Fixvolumen–Pipetten: Abimed, Langenfeld

Hefeextract: Difco, Michigan / USA

Küvetten–Test[®]Photometer LKT: Dr. Lange, Berlin

Lamina HeraSafe: Heraeus, Hanau

Magnetrührer: Janke & Kunkel GmbH & Co KG, IKA–Werk, Staufen

Millipore Ultrafree[®]MC: Millipore Corporation, Bedford/USA

Minifuge GL: Heraeus, Hanau

pGEM[®]–T Vektor System II: Promega, Madison, USA

Pipettierhilfen (Accuboy): Integra Bioscience, Fernwald

Polyallomerröhrchen SW28, SW41: Beckman Coulter, California, USA

Qiagen Plasmid Midi Kit: Qiagen, Hilden

Safe–Lock–Zentrifugengefäße (1,5 ml; 2 ml): Eppendorf AG, Hamburg

Thermoblöcke (Thermomixer comfort, Thermostat 5320): Eppendorf AG, Hamburg

Tryptose–Boullion: Difco, Michigan / USA

Ultrazentrifugen SW28, SW41: Beckman Coulter, California, USA

UV–Transilluminator Typ UVT 2053 (302 nm, mittelwellig): Herolab, Wiesloch

Vortex–Genie™: Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Zentrifugen (Typ 5415C und 5417R): Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifugenröhrchen (50 ml): TPP, Trasadingen, Schweiz

Für die Vermehrung von Virus in der Zellkultur

96 Well Platten und 24 Well Platten für Zellkultur: TPP, Trasadingen, Schweiz

Benzyl–Penicillin: Heyl, Berlin

Brutschrank: Heraeus, Hanau

Columbiaagar mit Schafblut: Oxoid GmbH, Wesel

Fetales Kälberserum: Biochrom KG, Berlin

Filtereinheit 30/0 (45 CA): Schleicher & Schuell, Dassel

Fuchs–Rosenthal–Kammer: Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim

Lamina HeraSafe: Heraeus, Hanau

M 199 mit Earls Salzen: Biochrom, Berlin

Magnetrührer: Janke & Kunkel GmbH & Co KG, IKA–Werk, Staufen

Minifuge GL: Heraeus, Hanau

Pipettierhilfen (Accuboy): Integra Bioscience, Fernwald

SPF–Hühnereier: Lohmann Tierzucht, Cuxhaven

Streptomycin–Sulfat: Heyl, Berlin

Trypsin: Difco, Michigan / USA

Ultra Turrax Typ TP 18/10: Janke & Kunkel GmbH & Co KG, IKA–Werk, Staufen

Waymouth–Medium: Lifetechnologies™ Gibco Brl, Galthersburg, USA

Zellkulturflaschen (25 cm² oder 75 cm²) mit Filterdeckel: TPP, Trasadingen, Schweiz

Zentrifugenröhrchen (50 ml): TPP, Trasadingen, Schweiz

Für die serologischen Tests

Agar: Lifetechnologies™ Gibco Brl, Galthersburg, USA

Brutschrank: Heraeus, Hanau

Chekite[®] 10X Konzentrat für die Herstellung von Verdünnern und Waschlösungen: Dr. Bommeli
AG, Bern, Schweiz

Chekite[®] Chromogen: Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz

Chekite[®] Stopplösung: Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz

Deckgläschen: Menzel–Gläser, Braunschweig

Edelstahldruckfiltrationsgerät (2 l Aufgußraum): Sartorius, Göttingen

ELISA–Reader MRX: Dynex Technologies, Denkendorf

Fetales Kälberserum: Biochrom KG, Berlin

FITC–Konjugat anti–chicken: Serotec, Düsseldorf

Flockcheck[®]–REV: IDEXX, Wörrstadt

Fluoreszenz–Mikroskop: Leitz, Wetzlar

HRPO–Konjugat: Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, USA
Magermilchpulver: Resana, Essen
Magnetrührer: Janke & Kunkel GmbH & Co KG, IKA–Werk, Staufen
Membranvakuumpumpe (Typ MZ2C): Vacuubrand GmbH+Co, Wertheim
Objektträger: Menzel–Gläser, Braunschweig
Pipettierhilfen (Accuboy): Integra Bioscience, Fernwald
Pockenantigen: Animal Health Service, Deventer, Niederlande
PVC–ELISA–Platten: Costar, Corning, USA
Revelation V. 3.04: Dynex Technologies, Denkendorf
Safe–Lock–Zentrifugengefäße (1,5 ml; 2 ml): Eppendorf AG, Hamburg
Schälchen f. Zellkultur: TPP, Trasadingen, Schweiz
Sonofier B–12: Branson, Danbury, USA
Spiral–Membran–Filterpatronen S1: Millipore Corporation, Bedford/USA
Ultrafiltrator Amicon CH2A: Amicon, Beverly, USA
Vakuumkammer: Kartell, Noviglio, Italien
Zellulose–Acetat Filter, Porenweite 0,8 µm: Sartorius, Göttingen

Für die Durchführung der Tierversuche

Feindosierungsspritze, 1 ml: B. Braun, Melsungen
Ficoll–Paque™ Research Grad: Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Lithium–Herparinröhrchen, 1,3 ml: Sarstedt, Nümbrecht
Minifuge GL: Heraeus, Hanau
Pipettierhilfen (Accuboy): Integra Bioscience, Fernwald
Polypropylen Reagenzröhrchen (14 µl): Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Safe–Lock–Zentrifugengefäße (1,5 ml; 2 ml): Eppendorf AG, Hamburg
Schafblut (defibriniert): Oxoid, Wesel
SPF–Hühnereier: Lohmann Tierzucht, Cuxhaven
Sterican–Kanülen, Gr. 1: B. Braun, Melsungen
Vacutainer™ BD mit Natrium–Citrat, 5 ml: Becton Dickinson Labware, Heidelberg

Nicht besonders aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth, Karlsruhe, oder Merck, Darmstadt, bezogen.

3.1.1.2 Inhalt der verwendeten Kits

DNA Labeling and Detection Kit, non radioactive (Boehringer, Mannheim)

Hexanukleotidmix, dNTP Markierungsmix, Klenow Enzym

Flockcheck[®]-REV (IDEXX, Wörrstadt)

mit REV-Antigen beschichtete Platten, REV-Positivkontrolle, Negativkontrolle, Meerrettichperoxidase-Konjugat anti Huhn von der Ziege, Probenverdünnungspuffer, TMB-Substratlösung, Stopplösung

Long-Distance-PCR Kit (Invitek, Berlin)

CombiZyme DNA Polymerase mit OptiPerfom Buffer III (10 x), OptiZyme Enhancer (5 x), MgCl₂-Lösung

Millipore Ultrafree[®] – Kit (Millipore Corporation, Bedford, USA)

Filtersäule

Promega pGEM[®]-T Vektor System II (Promega Corporation, Madison, USA)

Ligationspuffer (2 x Rapid), pGEM[®]-T-Vektor (50 ng/μl), T4 DNA Ligase (3 U/μl), Bakterienzellen JM 109 High Efficiency Competent Cells (1 x 10⁸ cfu / μg DNA)

QIAamp[®] DNA Mini Kit Qiagen, Hilden

Proteinase K (20 mg/ml), Lysispuffer ATL, Lysispuffer AL, QIAamp[®] Filterröhrchen, Waschpuffer AW 1 und AW 2, Elutionspuffer AE

QIAfilterTM Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)

QIAfilterCartridge, Qiagen-tip (Filter), Puffer 1 (Resuspensionspuffer), Puffer 2 (Lysispuffer), Puffer 3 (Neutralisationspuffer), Equilibrierungspuffer QBT, Waschpuffer QC, Elutionspuffer QF

Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden)

Qiagen Multiplex Master Mix (enthält: Hotstart-Polymerase, Nukleotidmix, Puffer), Q-Lösung, nukleasefreies Wasser

Quantitect Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden)

Quantitect Multiplex Master Mix (enthält: Hotstart-Polymerase, Nukleotidmix, Puffer), nukleasefreies Wasser

Ready-To-Go™ PCR Beads Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg

PCR-Gefäße Puffer-, Nukleotid- und Polymerasemix in Kugelform; im vorgesehenen Endvolumen von 25 µl sind enthalten: 1,5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, Stabilisatoren einschließlich Bovines Serumalbumin, 200 µM je dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat; dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

3.1.1.3 Zelllinie LMH

Die permanente Zelllinie LMH, die aus einem durch Diethylnitrosamin induzierten hepatozellulärem Karzinom eines Leghorn-Hahnes der Rasse LM gewonnen wurde, (Kawaguchi et al., 1987), lag am Institut für Geflügelkrankheiten vor.

3.1.1.4 Virusstämme, Bakterienstämme

Der FPV-Vakzinestamm HP B wurde lyophilisiert von Lohmann Animal Health, Cuxhaven, bezogen. Der FPV-Stamm HP 1 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr zur Verfügung gestellt. Der REV-Stamm CSV sowie die zur Überprüfung der Multiplex-PCR verwendeten Virus- bzw. Bakterienstämme lagen am Institut für Geflügelkrankheiten vor. Das Material aus Feldausbrüchen von Geflügelpocken wurde zur Routinediagnostik an das Institut für Geflügelkrankheiten eingeschickt.

3.1.1.5 Seren

Das Hyperimmun-Anti-Pockenserum wurde vom Animal Health Service, Deventer, Niederlande, bezogen.

Die zur Überprüfung der Spezifität des Pocken-ELISA verwendeten heterologen Seren gegen das Aviäre Leukose-Virus, gegen das aviäre Paramyxovirus 1 (Virus der Newcastle-Disease), gegen das Virus der Infektiösen Bursitis, gegen Mycoplasma meleagridis und gegen REV wurden den ELISA-Kits der Firma IDEXX, Wörrstadt, entnommen. Drei weitere Seren gegen REV, ein weiteres Serum gegen das Virus der Infektiösen Bursitis, vier Seren gegen Hühner-Adenoviren (Serotypen 1, 3, 4 und 11), zwei Seren gegen Reoviren und je ein Serum gegen das aviäre Pneumovirus und das Gallide Herpesvirus 1 (Virus der infektiösen Laryngotracheitis) lagen in der Institutssammlung vor.

Die auf Antikörper gegen FPV untersuchten SPF- und Feldseren wurden im Rahmen der Routinediagnostik eingeschickt.

3.1.1.6 Software

Die nicht der Literatur entnommenen Primer und TaqMan[®]-Sonden wurden entweder mit Hilfe des im Internet frei zugänglichen Programmes Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000) oder mit dem Programm Beacon-Designer 3.0 (PremierBiosoft, Palo Alto, USA) entworfen.

Die Sammlung und Auswertung der Daten und die Erstellung von Graphiken erfolgte mit den Programmen Microsoft Office Access 2003, Microsoft Office Excel 2003 oder SPSS für Windows 12.01.

Die two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) Analyse erfolgte mit dem Freeware-Programm CMDT (Greiner et al., 1995).

3.1.2 **Verwendete Medien und Puffer**

Für PCR und Gelelektrophorese		<u>TBE-Puffer (Tris-Borat-Elektrophoresepuffer)</u>	
<u>Größenmarker 1 kbp</u>		Tris	89 mM
1 kb-DNA Ladder	30 µl	Borsäure	89 mM
(1 µg DNA/µl)		EDTA Dinatriumsalz	2 mM
Probenladepuffer	50 µl	pH 7,5	
ddH ₂ O	200 µl		
 <u>Größenmarker 100 bp</u>		Für das Anfertigen der Dot-Blots	
100 bp-DNA Ladder	30 µl	<u>Antikörper-Lösung</u>	
(0,5 µg DNA/µl)		Blockierungspuffer	20 ml
Probenladepuffer	30 µl	Anti-DIG AP	2 µl
ddH ₂ O	185 µl	Conjugate	
 <u>Probenladepuffer</u>		<u>Blocking-Solution</u>	
Bromphenolblau	0,25 %	Maleinsäurepuffer	30 ml
Xylencyanol	0,25 %	Blocking-Reagenz	3 g
Glycerin	30,0 %	aufkochen und unter Rühren lösen	
in TBE-Puffer (4 x)		<u>CSPD-Lösung</u>	
		Equilibrierungspuffer	10 ml
		CSPD, 25 mM	20 µl

Denaturierungspuffer 1

HCl 2,5 M

Denaturierungspuffer 2

NaOH 0,4 M

NaCl 0,6 M

Denaturierungspuffer 3

NaCl 1,5 M

Tris-HCl, pH 7,5 0,5 M

Equilibrierungspuffer

Tris-HCL 5 ml

NaCl, 5 M 1 ml

MgCl₂, 1 M 2,5 mlddH₂O ad 50 mlHybridisierungspuffer A

Formamid 12,5 ml

20 X SSC 12,5 ml

N-Laurylsarcosine (35 %) 0,1 ml

SDS (10 %) 2 µl

Blocking-Solution 1 ml

ddH₂O ad 50 mlMaleinsäurepuffer

Maleinsäure 0,1 M

NaCl 0,15 M

pH 7,5

SSC-Puffer (Standard-Natrium-CitratPuffer, Saline-Sodium-Citrat; 20 x)

NaCl 3,0 M

NaCitrat 0,3 M

Tris-HCl

Tris 1 M

pH 9,5

Waschpuffer

Maleinsäurepuffer

Tween[®]20 0,2% (V/V)**Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in Plasmid-Vektoren und die Präparation von Plasmiden**Flüssiges LB-Ampicillin-Medium

LB-Medium

Ampicillin 50 µg/ml

Luria-Bertani (LB-Medium)

Trypton 10 g/l

Hefeextrakt 5 g/l

NaCl 10 g/l

pH 7,5

Lysispuffer

NaOH (1 M) 4 ml

SDS (10 %) 2 ml

ddH₂O ad 20 mlNeutralisationspuffer

Kaliumazetat 29,4 g

Eisessig 11,5 ml

ddH₂O ad 100 ml

Resuspensionspuffer

Tris-HCl (1 M)	2,5 ml
EDTA (0,5 M)	2,0 ml
Glukose (2 M)	2,5 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml
Sterilfiltrieren	

Salz-optimiertes Medium (Salt Optimized Broth, SOB Medium)

Trypton	6,0 g
Hefe	1,5 g
NaCl (5 M)	600 µl
KCl (1 M)	750 µl
ddH ₂ O	ad 300 ml
pH 7,5	
autoklavieren (15 min, 121 °C)	
MgCl ₂ /MgSO ₄ (1 M)	1 % (V/V)

Salz-optimiertes Medium mit Glukose (Salt Optimized + Carbon, SOC Medium)

SOB Medium	
Glukose (2 M)	1 % (V/V)

Tris-HCl

Tris	1 M
pH 9,5	

Tryptose-Boullion

Tryptose-Boullion	29,5 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
autoklavieren (15 min, 121 °C)	

Für die Vermehrung von Virus in der ZellkulturAntibiotika-Lösung

PBS	100 ml
Benzyl-Penicillin	4 Mio IE
Streptomycin-Sulfat	4 g

Färbelösung zur Zellzählung

PBS	4,9 ml
Kristallviolettlösung	5 ml

HEF-Ansatzmedium

M 199 mit Earls Salzen	84,5 %
Tryptose-Boullion	10 %
Fetales Kälberserum	5 %
Antibiotika-Lösung	0,5 %

HEF-Erhaltungsmedium

M 199 mit Earls Salzen	87,5 %
Tryptose-Boullion	10 %
Fetales Kälberserum	2 %
Antibiotika-Lösung	0,5 %

Kristallviolettlösung

ddH ₂ O	250 ml
Zitronensäure	5,26 g
Kristallviolett	0,25 g
mit dem Magnetrührer lösen	

LMH-Medium

Waymouth-Medium	88 %
FKS	10 %
Antibiotika-Lösung	2 %

M 199 mit Earls Salzen

M 199 mit Earls Salzen 9,26 g
ddH₂O ad 1000 ml

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung,
Phosphate Buffered Saline)

NaCl 137 mM
KCl 1,47 mM
KH₂PO₄ 1,47 mM
Na₂HPO₄ 6,46 mM
pH 7,4

PBS-T

Trypsin-Stammlösung 1 : 100 in PBS

Trypsin-Stammlösung

dH₂O 475 ml
NaCl 4 g
KCl 0,2g
Trypsin 25g
1 h bei RT rühren
Zentrifugation (15 min, 2200 xg)
Sterilfiltration

Trypsin-Versen-Lösung

PBS-T
Versen-Stammlösung 1% (V/V)

Versen-Stammlösung

PBS
Versen Titriplex III 1% (m/V)
autoklavieren (15 min, 121 °C)

Für die serologischen TestsCoating-Puffer

Na₂CO₃ 1,59 g
NaHCO₃ 2,94 g
dH₂O ad 1000 ml
pH 9,4

ELISA-Waschpuffer

Chekit[®] 10X Konzentrat 1 : 10 in dH₂O

Glyzerin-Tris

Glyzerin 1 VT
Tris-HCl 9 VT

Konjugat-Lösung (Pocken-ELISA)

HRPO-Konjugat, 1 : 5000 verdünnt in
Probenverdünnungspuffer (Pocken-
ELISA)

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung,
Phosphate Buffered Saline)

NaCl 137 mM
KCl 1,47 mM
KH₂PO₄ 1,47 mM
Na₂HPO₄ 6,46 mM
pH 7,4

Probenverdünnungspuffer (Pocken-ELISA)

ELISA-Waschpuffer
Fetales Kälber Serum 10 %
Magermilchpulver 2 %

3.2 Beschreibung der angewandten Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.1.1 DNA-Präparation

3.2.1.1.1 *Aufbereitung und Lagerung der Proben zur DNA-Extraktion*

Zur Diagnostik eingesandte Trachealtupfer wurden in PBS aufgenommen. Die gelösten Tupfer, Zellkulturmaterial, gelöste Vakzinen, in PBS aufgenommene PBMC und Organproben wurden bis zur DNA-Extraktion am gleichen Tag bei 4 °C gekühlt, ansonsten bei -20 °C gelagert.

3.2.1.1.2 *DNA-Präparation aus Tupfern, Vakzinen, Zellkulturmaterial und PBMC*

Die DNA-Präparation wurde mittels des QIAamp® DNA Mini Kit nach dem modifizierten Herstellerprotokoll durchgeführt. Zum Mischen der Proben wurde das Vortex-Genie™ auf Stufe 6 eingesetzt. Die Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zu 200 µl gelösten Tupfern, Vakzinen, Zellkulturmaterial oder in PBS aufgenommenen PBMC wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Lysispuffer AL gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz eine Stunde im Wasserbad bei 56 °C geschüttelt und anschließend 10 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl eiskaltem, absoluten Ethanol wurde das Gemisch auf das mitgelieferte Filterröhrchen überführt und zentrifugiert (1 min, 5200 xg).

Das Filtrat wurde verworfen und 500 µl Waschpuffer AW 1 auf den Filter gegeben. Nach erneuter, gleichzeitiger Zentrifugation und Verwurf des Filtrats erfolgte ein zweiter Waschschritt durch Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW 2 und eine hochtourige Zentrifugation (3 min, 16000 xg). Das Filtrat wurde wiederum verworfen.

Nach Zugabe von 100 µl des auf 70 °C vorgewärmten Puffers AE erfolgte die Elution der DNA durch Zentrifugation (1 min, 5200 xg) aus dem Filter.

3.2.1.1.3 *DNA-Präparation aus Gewebeproben*

Eine Probe von ca. 25 mg wurde in einem Zentrifugengefäß (2 ml) mit einer sterilen Schere grob zerkleinert. Zu dem Organmaterial wurden 20 µl Proteinase K und 180 µl Lysispuffers ATL gegeben und gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 56 °C im Schüttelbad über Nacht. Am folgenden Tag wurden 200 µl Lysispuffer AL zugegeben und der Ansatz nach kurzem Mischen 10 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte analog zu 3.2.1.1.2.

3.2.1.1.4 *Bestimmung der DNA-Konzentration*

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte im BioPhotometer bei einer Lichtwellenlänge von 260 nm gegen dH₂O als Leerwert. Zur Messung wurde die DNA 1 : 50 in dH₂O verdünnt. Die Gesamt-DNA-Konzentration wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung in ng/μl angegeben. Eine Differenzierung zwischen viraler und zellulärer DNA war bei dieser Methode nicht möglich.

3.2.1.2 Design von Primern und Sonden für PCR und qPCR

Die nicht der Literatur entnommenen Primer gagC, gagD, polO, polX und L5 wurden mit Hilfe des Programmes Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000) entworfen. Die für die qPCR benötigten Primer (qP 1, qP 2, qR5, qR6) und TaqMan[®]-Sonden (qSP, qSR) wurden mittels des Programms Beacon-Designer 3.0 entworfen.

Die selbst entworfenen Primer und Sonden sind mit ihren Eigenschaften in Tabelle 6 wiedergegeben.

3.2.1.3 Durchführung von PCR, Multiplex-PCR und Long-Distance-PCR

3.2.1.3.1 *PCR mittels Ready-To-Go™ PCR Beads-Kit*

Die Amplifizierung von Produkten mit nur einem Primerpaar und einer erwarteten Länge von bis zu 1 000 bp erfolgte unter Verwendung der Ready-To-Go™ PCR Beads.

Eine Übersicht über die verwendeten Primer und ihre Eigenschaften bieten Tabelle 6 und Tabelle 7. Soweit nicht anders angegeben wurde von den Primern 25 pmol eingesetzt.

In die PCR-Gefäße wurden zu dem als Kugel vorliegenden Puffer- Nukleotid- und Polymerasemix auf Eis insgesamt 25 μl Flüssigkeit, bestehend aus den gelösten Primern, der DNA und nukleasefreiem Wasser gegeben.

Bei DNA aus Tupfern, Vakzinen, Zellkulturmaterial und PBMC wurden ca. 50 ng DNA, bei DNA aus Gewebeproben und Hauthomogenaten maximal 1000 ng DNA in die PCR eingesetzt.

Die Durchführung der PCR erfolgte im Thermocycler. Die Temperaturprofile der verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Anlagerungstemperatur wurde, soweit nicht der Literatur entnommen, etwa 5 °C niedriger als die Schmelztemperatur gewählt und ggf. empirisch optimiert.

3.2.1.3.2 *Multiplex-PCR mittels Qiagen Multiplex PCR Kit*

Die Multiplex-PCR zur gleichzeitigen Amplifizierung von fünf FPV- bzw. REV-spezifischen Produkten wurde mit dem Qiagen Multiplex PCR Kit durchgeführt. Zu 12,5 μl Mastermix wurden bei Raumtemperatur 2,5 μl Q-Lösung, die gelösten Primer (Tabelle 5), die DNA und nukleasefreies Wasser zu einem Endvolumen von 25 μl gegeben. Bei DNA aus

Tupfern, Vakzinen, Zellkulturmaterial und PBMC wurden ca. 50 ng DNA, bei DNA aus Gewebeproben und Hauthomogenaten maximal 1000 ng DNA in die PCR eingesetzt. Die Durchführung der PCR erfolgte im Thermocycler.

Zur Optimierung der Multiplex-PCR wurden zunächst von Tabelle 5 abweichende Primerkonzentrationen getestet (s. 4.1.2.2) und zur Wahl der Anlagerungstemperatur wurde eine Gradienten-PCR auf dem iCycler durchgeführt. Das Temperaturprofil der Gradienten-PCR entsprach dem der Multiplex-PCR, mit Ausnahme der Anlagerungstemperatur, für die Werte zwischen 52 und 62 °C getestet wurden. Das Temperaturprofil des PCR-Programms ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 5: Menge der in der Multiplex-PCR eingesetzten Primer

Primerpaar	Zielgen	Menge in 25 µl	Amplikon-Größe
FP 1/B	FPV – 4b core protein	Je 3,125 pmol	539 bp
Pol O/X	REV – pol	Je 6,25 pmol	767 bp
Gag C/D	REV – gag	Je 12,5 pmol	395 bp
L 1/2	REV – LTR	Je 12,5 pmol	292 bp
E 3/4	REV – env	Je 25 pmol	644 bp

3.2.1.3.3 Long-Distance-PCR

Die Amplifizierung von Produkten mit nur einem Primerpaar und einer erwarteten Länge von über 1000 bp erfolgte unter Verwendung des Long-Distance-PCR Kits. Dazu wurde auf Eis ein Ansatz aus 1 µl CombiZyme DNA Polymerase, 5 µl OptiPerform Buffer III, 10 µl bei 65 °C gelöster OptiZyme Enhancer, 1,5 µl MgCl₂-Lösung (1,5 mM), 1 µl dNTP Mastermix, je 100 pmol der Primer L1 und L5 (2000 µM), 1000 ng DNA und nukleasefreiem Wasser ad 50 µl in ein Biopur-Zentrifugen-Gefäß pipettiert. Die Durchführung der PCR erfolgte im Thermocycler. Das Temperaturprofil des verwendeten PCR-Programms ist Tabelle 8 zu entnehmen.

3.2.1.3.4 Produktanalyse nach PCR, Multiplex-PCR oder Long-Distance-PCR mittels Agarosegelelektrophorese

Der Prozentgehalt des Gels an Agarose und der Typ Agarose wurden abhängig von der erwarteten Fragmentgröße zwischen 0,5 % und 1,5 % gewählt. Die Agarose wurde in 100 ml TBE aufgekocht, mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und zu horizontalen, etwa 5 mm starken Gelen mit 14 oder 20 Probenaschen gegossen.

Zur Auftrennung wurden jeweils 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Probenladepuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard wurden bei einer

erwarteten Amplifikat-Größe bis zu 1 kbp 8 µl 100 bp-Marker, ansonsten 8 µl 1 kbp-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 60–65 V über 2–2,5 h in TBE als Laufpuffer statt. Bei sehr großen Fragmenten (> 7000 bp) fand die Elektrophorese teilweise auch bei 20 V über Nacht statt. Die Sichtbarmachung der Amplifikat-Banden im Gel und deren Dokumentation erfolgte mittels des Videodokumentationssystem Bioprint DS und dessen Software BioCapt 97.05.

3.2.1.4 Qualitätssicherung bei der Durchführung von DNA-Präparation und PCR

Um das durch die hohe Sensitivität der PCR bedingte Kontaminationsrisiko zu minimieren, wurden folgende Sicherheitsmaßnahmen eingehalten:

- getrennte Arbeitsräume für die verschiedenen Arbeitsschritte
- Herstellung der Reagenzien und Lösungen in nur dafür vorgesehenen Räumen und Gefäßen
- getrennte Reagenzien und Lösungen für jeden Untersucher
- Tragen spezieller, arbeitsraumabhängiger Laborkleidung
- Benutzung gestopfter Einmalpipettenspitzen.
- Mitführen einer Präparationskontrolle von Beginn der DNA-Extraktion an bzw. einer PCR-Negativkontrolle von Beginn der PCR an zum Erkennen möglicher Kontaminationen

Tabelle 6: Selbst entworfene Primer und Sonden und ihre Eigenschaften

Name	Sequenz	Länge	T _M	Zielsequenz (Accession-Nummer, Referenz)	Position	Polarität
GagC	GGCTCAATTCTGGATGAGA	20bp	60 °C	REV – gag (V01200; O'Rear und Temin, 1982)	1005 – 1024	Vorwärts
GagD	CGTAAAACAGGGTACGGAGGA	20bp	62 °C	REV – gag (V01200; O'Rear und Temin, 1982)	1401 – 1382	Rückwärts
PolO	ACTGAGGGGACCAAAGACT	20bp	62 °C	REV – pol (X01455; Wilhelmsen et al., 1984)	285 – 304	Vorwärts
PolX	CACATCCTACACGGGAACT	20bp	62 °C	REV – pol (X01455; Wilhelmsen et al., 1984)	1051 – 1032	Rückwärts
L5	CTGATGCTTGCCTTCAACAA	20bp	58 °C	REV – LTR (M22224; Singh et al., 2000)	431 – 412	Rückwärts
qP1	TCAGCA GTTGT TACAAGACA	21 bp	58 °C	FPV ¹ (M25781; Binns et al., 1989)	1825 – 1845	Vorwärts
qP2	CCATTTCCGTGAATAGAA TAG TAT	24 bp	64 °C	FPV ¹ (M25781; Binns et al., 1989)	1933 – 1910	Rückwärts
qP5	ATCTCCGCCGTCGCAACTTCCA	22 bp	70 °C	FPV ¹ (M25781; Binns et al., 1989)	1890 – 1869	Rückwärts
qR5	GTTTTCTATACACACCAGCCTACCT	25 bp	72 °C	REV – gag (V01200; O'Rear und Temin, 1982)	1339 – 1363	Vorwärts
qR6	TCCTGACCTCCCGCCTACT	19 bp	62 °C	REV – gag (V01200; O'Rear und Temin, 1982)	1450 – 1432	Rückwärts
qRS	CTGTCC TCACCC TCTCCC TCTCCTCCA	27 bp	88 °C	REV – gag (V01200; O'Rear und Temin, 1982)	1429 – 1402	Rückwärts

¹Gen des 4b core protein

Tabelle 7: Der Literatur entnommene Primer und ihre Eigenschaften

Name	Sequenz	Länge	T _M	Zielsequenz (Accession-Nummer, Referenz)	Position	Polarität	Referenz
FP 1	CAGCAGGTGCTAACCAACAA	20 bp	58 °C	FPV ¹ (M25781; Binns et al. 1989)	458 – 477	Vorwärts	Lee und Lee, 1997
FP 2	CGGTAGCTTAAAGCCGAA TA	20 bp	60 °C	FPV ¹ (M25781; Binns et al. 1989)	1035 – 1016	Rückwärts	Lee und Lee, 1997
FPB	GACG TAGCCTA TGG AAT CCTG	22 bp	66 °C	FPV ¹ (M25781; Binns et al. 1989)	997 – 976	Rückwärts	Lüschow und Hafez, 2003
L 1	CATACTGGAGCCAAATGGTT	19 bp	56 °C	REV – LTR (M22224; Swift et al., 1987)	237 – 255	Vorwärts	Aly et al., 1993
L 2	AATGTTGTAGCGAAGTACT	19 bp	52 °C	REV – LTR (M22224; Swift et al., 1987)	517 – 499	Rückwärts	Aly et al., 1993
E 3	TCGATTGCGGTAGCTCCAC	19 bp	60 °C	REV – env (X01455; Wilhelmssen et al. 1984)	1551 – 1569	Vorwärts	Singh et al., 2000
E 4	CCA TCGAGAGTGACA TTGC	19 bp	58 °C	REV – env (X01455; Wilhelmssen et al. 1984)	2181 – 2163	Rückwärts	Singh et al., 2000
E 5	GAAAAGGCTCAGGAAATGCAC	20 bp	60 °C	REV – env (X01455; Wilhelmssen et al. 1984)	1737 – 1756	Vorwärts	Lüschow, unveröffentlicht
E 6	GGGGATTGAGTTCCAAGA GTC	21 bp	64 °C	REV – env (X01455; Wilhelmssen et al. 1984)	2143 – 2123	Rückwärts	Lüschow, unveröffentlicht
A 1	TCCGTTGGAGTTGATCCTTC	20 bp	60 °C	Huhn – β-Aktin (X00182; Kost et al., 1983)	1933 – 1952	Vorwärts	Hoffmann, 2005
A 2	GCAAAAAGGAGAAAGTGGTG	20 bp	60 °C	Huhn – β-Aktin (X00182; Kost et al., 1983)	2330 – 2311	Rückwärts	Hoffmann, 2005
R 1	AACAATGATACGTCTCTTCC	20 bp	56 °C	FPV ORF 202 ² (AF198100; Afonso et al. 2000)	232404 – 232423	Vorwärts	Singh et al., 2000
R 1	CACACGAATATACCAATAAAG	21 bp	58 °C	FPV ORF 202 ² (AF198100; Afonso et al. 2000)	232888 – 232868	Rückwärts	Singh et al., 2000

¹Gen des 4b core protein²enthält die Integrationsstelle des REV-Provirus

Tabelle 8: Temperaturprofile der verwendeten PCR- Programme

Primer	Initiale Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Anlagerung	Synthese	Finale Synthese
A1/A2	2 min, 94 °C	35	1 min, 94 °C	1 min, 57 °C	1 min, 72 °C	2 min, 72 °C
E3/E4, E5/E6, R1/R2, R1/L2	2 min, 94 °C	35	1 min, 94 °C	1 min, 55 °C	1 min, 72 °C	2 min, 72 °C
F1/F2	2 min, 94 °C	35	1 min, 94 °C	1 min, 60 °C	1 min, 72 °C	2 min, 72 °C
gagC/gagD, polO/polX	2 min, 94 °C	35	1 min, 94 °C	1 min, 58 °C	1 min, 72 °C	2 min, 72 °C
Multiplex	15 min, 95 °C	35	30 sec, 94 °C	1,5 min, 57 °C	1,5 min, 72 °C	10 min, 72 °C
L1/L5	2 min, 94 °C	35	45 sec, 94 °C	1 min, 57 °C	6 min, 72 °C	10 min, 72 °C
qP1/qP2, qR5/qR6 ¹	1 min, 95 °C	40	15 sec, 94 °C	0,5 min, 50 °C	0,5 min, 72 °C	5 min, 72 °C
qP1/qP2, qR5/qR6 ²	15 min, 95 °C	45	1 min, 94 °C	1 min, 60 °C ³		–

¹Durchführung mit Ready-To-Go™ PCR Beads zur Klonierung des Amplifikats als Standard

²Durchführung der qPCR

³Messung der Fluoreszenz

3.2.1.5 Restriktionsenzymanalyse

Pro Ansatz wurden etwa 500–1000 ng des PCR–Produktes, 20 Einheiten des Enzyms, 2 µl der mitgelieferten Reaktionspuffer, ggf 2 µl zehnfachem BSA und ddH₂O ad 20 µl vermischt. Der Ansatz wurde für 1–5 h in einem Thermoblock bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Die verwendeten Enzyme sind mit ihrer Spaltstelle und Inkubationstemperatur in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme

Enzym	Spaltstelle	Inkubationstemperatur	Zugabe von BSA
<i>KpnI</i>	<pre> GGTACC CCATGG </pre>	37 °C	Nein
<i>EcoRV</i>	<pre> GAT ATC CTA TAG </pre>	37 °C	Nein
<i>ApaI</i>	<pre> GGGCC CCGGG </pre>	25 °C	Ja

Die gelelektrophoretische Aufgetrennung erfolgte analog zu 3.2.1.3.4. Abweichend davon wurde Gehalt an Agarose abhängig von der erwarteten Fragmentgröße zwischen 0,5% und 3% gewählt und der gesamte REA–Ansatz mit 5 µl Probenladepuffer vermischt auf das Gel aufgetragen.

3.2.1.6 Quantitative PCR (qPCR)

3.2.1.6.1 Ansatz

Die qPCR für die quantitativen Untersuchungen wurde mit dem QuantiTect Multiplex PCR Kit durchgeführt. Zu 25 µl Mastermix wurden bei Raumtemperatur in einem Thin Wall Tube die gelösten Primer und Sonden (Tabelle 10), die DNA und nukleasefreies Wasser ad 50 µl gegeben. Bei DNA aus Tupfern, Vakzinen, Zellkulturmaterial und PBMC wurden ca. 50 ng DNA, bei DNA aus Gewebeproben und Hauthomogenaten maximal 500 ng DNA in die PCR eingesetzt. Um die Gefahr zufälliger Fehler bei der quantitativen Bestimmung zu reduzieren, wurden von jeder DNA drei Ansätze untersucht. Die Durchführung der qPCR erfolgte im iCycler iQ™. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 10: Menge der in der qPCR eingesetzten Primer und Sonden

Primerpaar/ Sonde	Zielgen	Menge in 25 µl	Fluorophor	Quencher
qP 1/2	FPV – 4b core protein	25 pmol	–	–
qPS	FPV – 4b core protein	10 pmol	Cyan 5	BHQ ² 2
qR 5/6	REV – gag	25 pmol	–	–
qRS	REV – gag	10 pmol	6-FAM ¹	BHQ 1

¹FAM = Karboxifluoreszein; ²BHQ = Black Hole Quencher®

3.2.1.6.2 Auswertung

Die zum iCycler iQ™ gehörende Software nahm aufgrund der gemessenen Fluoreszenz folgende Berechnungen vor: Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz, Berechnung und Subtraktion der PCR-Baseline mit der Möglichkeit der manuellen Korrektur, Vorschlag eines Schwellenwertes mit der Möglichkeit der manuellen Korrektur und darauf beruhend die Berechnung der Schwellenwert-Zyklen (Threshold-Cycles, C_T).

Falls eine Verdünnungsreihe definiert wurde, wurde durch die Software der Mittelwert der Schwellenzyklen jeder Verdünnungsstufe gegen den Logarithmus zur Basis zehn der Verdünnung aufgetragen. Aus der resultierenden Eichgerade wurde die Effizienz der qPCR nach Formel 1 berechnet (Pfaffl, 2001).

Formel 1: Berechnung der Effizienz der qPCR aus der Steigung der Eichgeraden

$$E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

E = Effizienz der qPCR

m = Steigung der Eichgeraden

Das Verhältnis R zwischen proviraler REV-DNA und FPV-DNA wurde aus den Effizienzen der qPCRs zum Nachweis von FPV- bzw. REV-DNA und den Differenzen zwischen den jeweiligen Schwellenzyklen der unbekannt Probe und eines bekannten Standards berechnet (Formel 2). Als bekannter Standard wurden zwei durch MIDI-Präparation gewonnene Plasmid-DNAs, die je eines der beiden qPCR-Amplikons als Insert trugen (3.2.1.9 – 3.2.1.12), im Kopien-Verhältnis 1 : 1 gemischt.

Formel 2: Berechnung des Verhältnis R zwischen FPV–DNA und REV–proviraler–DNA (Pfaffl, 2001)

$$R = \frac{E_{FPV}^{C_{T,FPV,Probe} - C_{T,FPV,Standard}}}{E_{REV}^{C_{T,REV,Probe} - C_{T,REV,Standard}}}$$

$C_{T,REV}$ = Schwellenzyklus bei der qPCR zum Nachweis von proviraler REV–DNA

E_{REV} = Effizienz der qPCR zum Nachweis von proviraler REV–DNA

$C_{T,FPV}$ = Schwellenzyklus bei der qPCR zum Nachweis von FPV–DNA

E_{FPV} = Effizienz der qPCR zum Nachweis von FPV–DNA

3.2.1.7 Gelreinigung von PCR–Produkten

Das PCR–Produkt, das gelgereinigt werden sollte, wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.1.3.4), jedoch wurde abweichend davon das gesamte PCR–Produkt (25 µl) mit 5 µl Probenladepuffer vermischt aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Bande des gewünschten Amplifikats im ethidiumbromid–gefärbten Agarosegel auf dem UV–Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

Der ausgeschnittene Gelblock wurde in ein Zentrifugen–Gefäß (2 ml) überführt, zerkleinert und mit 1 Volumen Phenol versetzt. Nach gutem Mischen wurde das Gefäß für 30 sec in flüssigen Stickstoff getaucht und sofort zentrifugiert (25 min, 20800 xg, 20 °C). Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform–Isoamylalkohol (24 : 1) gemischt und unter gleichen Bedingungen für 2 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wiederum abgenommen und mit 0,1 Volumen 3M Natriumacetat und 2,5 Volumen absoluten Ethanols vermischt. Nach 30 min bei –70 °C folgte eine Zentrifugation (15 min, 20800 xg, 4 °C). Das resultierende Pellet wurde mit 100 µl Ethanol (70 %) gewaschen und anschließend in 10 µl TE–Puffer aufgenommen.

In einigen Fällen erfolgte die Extraktion der DNA aus dem Gelblock mittels des Millipore Ultrafree[®]–MC nach der Anleitung des Herstellers.

Zur Konzentrationsabschätzung wurden 1 µl des PCR–Produktes mit 1 µl Probenladepuffer und 8 µl des 100 bp–Markers in zwei Taschen eines 1,2%igen Agarosegels pipettiert und bei 60–65 V über 2–2,5 h mit 1 x TBE als Laufpuffer aufgetrennt (3.2.1.3.4). Durch Vergleich der Bandenstärke des PCR–Produkts mit den bekannten Bandenstärken des Markers wurde die Konzentration des gereinigten PCR–Produktes geschätzt.

3.2.1.8 Dot-Blot

3.2.1.8.1 *DNA-Sondenherstellung*

Zur DNA-Sondenherstellung wurde das DNA Labeling and Detection Kit nach Herstelleranleitung verwendet. Ca. 100 ng gelgereinigtes PCR-Produkt (3.2.1.7) wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl gebracht und über 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgte eine sofortige Kühlung auf Eis sowie die Zugabe von 2 µl Hexanukleotidmix, 2 µl dNTP und 1 µl Klenow Enzym. Nach vorsichtigem Mischen folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C in einem Thermoblock.

Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch zehninütige Erhitzung auf 65 °C gestoppt. Nach Zugabe von 2,5 µl Lithiumchlorid (4 M) und 75 µl kaltem absoluten Ethanol sowie nach Kühlung bei -20 °C über 120 min erfolgte eine Zentrifugation (15 min, 15300 xg, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 50 µl kaltem Ethanol (70 %ig) aufgenommen und das Gemisch 5 min gleichmäßig zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Ethanols wurde das luftgetrocknete Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.8.2 *Auftragen der DNA auf die Membran*

3.2.1.8.48 µl des PCR-Produktes wurden 5 min bei 95 °C in einem Thermoblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach kurzem Zentrifugieren (1 sec, 3300 xg) wurden 5 µl auf die trockene Nylonmembran pipettiert und durch fünfmalige Bestrahlung im UV-Linker (jeweils 120 mJ/cm²) fixiert.

3.2.1.8.3 *Prähybridisierung und Hybridisierung*

Die Nylonmembran mit der fixierten DNA wurde auf ein Hybridisierungsnetz gelegt und zusammengerollt in eine Hybridisierungsflasche gegeben, wobei die Membranoberfläche mit der DNA in das Flascheninnere zeigte.

Alle weiteren Schritte wurden in Hybridisierungsöfen und, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur vorgenommen.

Die Prähybridisierung erfolgte mit 20 ml Hybridisierungspuffer A, dem 200 µl denaturiertes Lachssperma beigegeben wurden, bei 60 °C über 6 h. Nach Entfernung des Hybridisierungspuffers wurde die im kochenden Wasserbad 5 min hitzedenaturierte und sofort auf Eis gekühlte Sonde in 2,5 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und in die Hybridisierungsflasche gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 47 °C über Nacht.

3.2.1.8.4 *Chemilumineszenz der Membran und Entwicklung des Filmes*

Nach Rückgewinnung der Sonde wurde die Membran zweimal für je 5 min in 2xSSC mit 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) und zweimal für je 15 min in 0,1xSSC mit 0,1 % SDS bei 68° C gewaschen. Daran schlossen sich folgende Inkubationsschritte an:

- 1–5 min in 100 ml Waschpuffer
- 30 min in 100 ml Blockierungspuffer
- 30 min in 20 ml Antikörper-Lösung
- zweimaliges Waschen für je 15 min in je 100 ml Waschpuffer
- 3–5 min in 20 ml Equilibrierungspuffer
- 5 min in 10 ml CSPD-Lösung

Anschließend wurde die Membran der Hybridisierungsflasche entommen, luftblasenfrei in Frischhaltefolie versiegelt und zur Exposition mit der DNA-Seite auf den Lumi-Film gelegt.

Die Filmentwicklung erfolgte nach einer Stunde, nach drei weiteren Stunden sowie ggf. nach Exposition über Nacht durch nacheinander folgendes Eintauchen und sanftes Bewegen des Filmes in Entwickler (3 min), destilliertem Wasser (1 min) und zuletzt Fixierer (2 min).

3.2.1.9 Klonierung von Amplifikaten in Plasmidvektoren

Zur Klonierung eines Amplifikates in einem Plasmidvektor wurde das gelgereinigte PCR-Produkt (3.2.1.7) in den Vektor ligiert und der Vektor anschließend in Bakterien transferiert.

3.2.1.9.1 *Herstellung von Platten für Bakterienkulturen*

Zur Herstellung von Platten für die Bakterienkulturen wurden 15g Agar in 1000ml Luria Bertoni (LB) Medium gelöst. Nach Autoklavieren bei 121 °C für 15 min und Abkühlen wurde das verfestigte Medium bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde es durch Erwärmen verflüssigt. Nach Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml) wurden je 15ml in Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm) gegossen. Nach Verfestigung wurden die Platten bis zur Testdurchführung bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.1.9.2 *Ligation von Amplifikaten in Plasmidvektoren*

Zur Ligation und Transformation wurde das Promega pGEM[®]-T Vektor System II nach Herstellerangaben verwendet. Die Bezeichnungen stammen von der Firma. Der verwendete Vektor lag linear vor.

Das als Insert in den Vektor zu ligierende PCR-Produkt lag gelgereinigt (3.2.1.7) vor. Für die Ligation wurden nach Herstellerempfehlung 10–30 ng PCR-Produkt eingesetzt, um das optimale molare Verhältnis von 1 : 1 bis 1 : 3 zwischen Insert und Vektor zu erreichen.

Das entsprechende Volumen PCR-Produkt wurde in sterile 0,5 ml Gefäße pipettiert und mit 5 µl Ligationspuffer, 50 ng pGEM[®]-T-Vektor sowie mit drei Einheiten des Enzyms T4 DNA Ligase versetzt und durch nukleasefreies Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte die Ligation über Nacht bei 4 °C.

3.2.1.9.3 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Der Ligationsansatz wurde bei 3300 xg für 1 sec zentrifugiert, 2 µl in ein steriles 1,5 ml Zentrifugen-Gefäß überführt und mit 50 µl auf Eis aufgetauten Bakterienzellen versetzt. Durch vorsichtiges Antippen wurde die Suspension gemischt und anschließend 20 min auf Eis gekühlt. Danach wurde sie 50 sec auf 42 °C erwärmt und danach sofort für 2 min auf Eis gekühlt. Zu der Suspension wurden 950 µl Salz-optimiertes Medium mit Glukose (SOC Medium) gegeben und das Gemisch 90 min bei 150 rpm und 37 °C geschüttelt.

Währenddessen wurden die Platten für Bakterienkulturen auf Raumtemperatur gebracht und 20 µl 5-Bromo-4Chloro-3Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) sowie 100 µl Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid (IPTG) auf die Agaroberfläche aufgetragen und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Danach wurden sie 30 min bei 37 °C äquilibriert. 100 µl der transformierten Bakterien wurden auf den Platten mit einem sterilen Drigalskispatel verteilt und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.2.1.9.4 Beurteilung des Klonierungserfolges

Da das Plasmid für eine Ampicillin-Resistenz kodierte, konnten auf den mit Ampicillin supplementierten Platten nur transformierte Bakterien wachsen. Außerdem unterbrach das Insert das Gen der β-Galactosidase, so daß nur Bakterien mit einem Plasmid ohne Insert den beigefügten Zucker Galactopyranosid zu einem blauen Farbstoff umsetzen konnten. Im Gegensatz dazu bildeten Bakterienklone mit einem Plasmid mit Insert weiße Kolonien.

3.2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, sofern es nicht anders erwähnt wird.

Weißer Kolonien (3.2.1.9.4) wurden mittels eines sterilen Zahnstochers einzeln gepickt, in 2,5 ml flüssiges LB-Ampicillin-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Bühler-Schüttelinkubator bei 150 rpm bebrütet.

2 ml der Übernachtskultur wurden in ein Zentrifugengefäß (2 ml) überführt und für 1 min bei 20800 xg zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und 200 µl Lysispuffer hinzugefügt. Nach vorsichtigem Schwenken der Suspension und Zugabe von 150 µl eiskaltem Neutralisationspuffer erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis und eine weitere Zentrifugation (5 min, 20800 xg).

Der Überstand wurde in ein Zentrifugengefäß (1,5 ml) überführt und mit 1 Volumen Phenol–Chloroform–Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach leichtem Schwenken (1 min) und gleichzeitiger Zentrifugation erfolgte ein Überführen des Überstandes in ein neues Gefäß und die Zugabe von 2 Volumen eiskaltem absoluten Ethanol.

Nach zweiminütiger Inkubation wurde die Zentrifugation wiederholt, der Überstand abgenommen und das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde abschließend in 25 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

3.2.1.11 Bestätigung der Insert–Aufnahme nach Präparation der Plasmid–DNA

Zur Bestätigung der Aufnahme des Inserts in den Vektor wurden 1 µl der präparierten Plasmid–DNA sowie zirkuläre Plasmid–DNA ohne Insert mit je 1 µl Probenladepuffer gemischt und zusammen mit dem Größenmarker (1 kbp) in die Taschen eines mit 5 µl Ethidiumbromid versetzten 0,5 %igen Agarosegels pipettiert (s. 3.2.1.3.4). Die erfolgreiche Insert–Aufnahme zeigte sich durch eine höhere Bande des Vektors mit Insert.

Eine genauere Bestätigung der Insert–Aufnahme erfolgte nach Bestimmung der DNA–Konzentration (3.2.1.1.4) durch die jeweilige PCR (3.2.1.3.1).

3.2.1.12 Präparation von Plasmid–DNA mit dem QIAfilter™ Plasmid Midi Kit

Zur Gewinnung reinerer Plasmid–DNA in größeren Mengen wurde das QIAfilter™ Plasmid Midi Kit nach Herstelleranleitung verwendet. Die Namen der Puffer stammen von der Firma. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, sofern es nicht anders erwähnt wird.

Der plasmidtragende Bakterienklon wurde aus dem Rest der Übernachtskultur (3.2.1.10) auf einer frischen Platte für Bakterienkulturen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Als Vorkultur wurden 2 ml flüssiges LB–Ampicillin–Medium mit Kulturmaterial von der Platte beimpft und 5–7 h im Schüttelinkubator bei 300 rpm und 37 °C inkubiert.

Je nach Trübung der Vorkultur wurden 25 ml flüssiges LB–Ampicillin–Medium mit 25–50 µl der Vorkultur versetzt. Anschließend fand die bakterielle Vermehrungsphase bei 37 °C im Bühler–Schüttelinkubator über Nacht statt. Danach wurde die optische Dichte (OD) bei 550 nm gegen unbeimpftes flüssiges LB–Ampicillin–Medium photometrisch gemessen und durch Zugabe von LB–Ampicillin–Medium ein OD–Wert von 1,5 eingestellt.

Nach anschließender Zentrifugation (15 min, 5000 xg, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen. Danach wurden je 4 ml Puffer 1 und Puffer 2 zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Suspension mit 4 ml kaltem Puffer 3 versetzt und vorsichtig durch Schwenken gemischt.

Nach sofortiger Überführung in die QIAfilterCartridge wurde zunächst 10 min gewartet und dann die Suspension auf den bereits mit 10 ml Puffer QBT equilibrierten Qiagen–tip

gegeben. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend erfolgten zwei Waschdurchgänge mit jeweils 10 ml Puffer QC. Danach wurde die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert.

Der Durchlauf wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, zentrifugiert (30 min, 7600000xg) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 7600000xg). Der Überstand wurde verworfen und das luftgetrocknete Pellet in 100 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

3.2.1.13 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten durch das Labor AGOWA, Berlin. Dazu wurden etwa 3–5 µg der mittels QIAfilter™ Plasmid Midi Kit präparierten Plasmid–DNA (3.2.1.12) unter Angabe von DNA–Konzentration, des verwendeten Vektors, der Anzahl der Basenpaare sowie der Herkunft der eingesetzten DNA–Fragmente eingeschickt. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung der SP6 und T7 Promoter Primer.

3.2.2 **Vermehrung von Virus in der Zellkultur**

3.2.2.1 Ansatz der HEF–Zellkulturen

Der stumpfe Pol elf Tage bebrüteter, embryonierter SPF–Eier wurde mittels sterilem Besteck geöffnet, die Eihäute entfernt und der Embryo entnommen. Von dem Embryo wurden Kopf, innere Organe außer Lunge und Niere, sowie die Gliedmaßen entfernt. Der verbleibende Torso wurde mit einer Schere zerkleinert. Der so gewonnene Embryobrei wurde wiederholt so oft mit sterilem PBS gewaschen und über 10 min bei 140xg zentrifugiert, bis der Überstand klar blieb.

Anschließend wurde mit auf 37 °C vorgewärmten PBS–T unter Rühren trypsinisiert. Alle 20–30 min wurden die trypsinisierten Zellen abgegossen und frisches PBS–T zugesetzt. Die abgegossenen Trypsin–Zell–Lösungen wurden gesammelt und zentrifugiert (10 min, 140xg), die Überstände verworfen und das Zellsediment in HEF–Ansatzmedium suspendiert. Die Zellsuspension wurde über Gaze gefiltert, erneut abzentrifugiert (10 min, 140xg) und in HEF–Ansatzmedium aufgenommen.

Von dieser Zellsuspension wurden 0,1 ml in 9,5 ml Färbelösung zur Zellzählung gegeben und die Zellzahl in einer Fuchs–Rosenthal–Kammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde mit HEF–Ansatzmedium auf ca. 600 000 Zellen/ml eingestellt. Von ihr wurden etwa 0,3–0,4 ml/cm² in Zellkulturflaschen, 96–Well–Platten oder 24–Well–Platten eingesät.

Die Zellkulturgefäße wurden im Brutschrank bei 37 °C und einer 5%igen CO₂–Spannung über Nacht inkubiert.

3.2.2.2 Passagierung von LMH-Zellen

Die Passagierung der Zellen erfolgte alle vier Tage. Dafür wurde das Waymouth-Medium abgegossen, der Zellrasen einmal mit Trypsin-Versen-Lösung gewaschen, danach mit Trypsin-Versen-Lösung benetzt und, unter ständiger Kontrolle, bei 37 °C inkubiert. Nach vollständiger Ablösung des Zellrasens wurden die Zellen in einer geringen Menge Waymouth-Medium suspendiert und durch wiederholtes Pipettieren vereinzelt. Danach wurde mit Waymouth-Medium auf das vierfache der ursprünglichen Menge aufgefüllt (Umsetzungsrate 1 : 4) und 0,3–0,4 ml/cm² in Zellkulturflaschen eingesät.

3.2.2.3 Aufbereitung von Gewebeproben zur Infektion der Zellkultur

Etwa 2 mg Organmaterial wurden mit 3 ml PBS versetzt und mittels des UltraTurrax dreimal für 10 sec homogenisiert. Nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen erfolgte eine Zentrifugation (10 min, 1200 xg). Der Überstand wurde in ein Zentrifugengefäß (1,5 ml) überführt und erneut zentrifugiert (10 min, 2000 xg). Anschließend wurde der Überstand mittels der Filtereinheit 30/0 (0,45 µm Porenweite) sterilfiltriert. Die Sterilität wurde durch Ausstreichen auf Columbiaagar mit Schafblut und Inkubation bei 37 °C über Nacht überprüft.

3.2.2.4 Infektion des Zellrasens

Nach Ausbildung eines einheitlichen Zellrasens wurde das jeweilige Medium abgegossen und der Zellrasen je nach Größe des Kulturgefäßes mit 0,1–1 ml Organhomogenat (3.2.2.3) oder Zellkulturmaterial (3.2.2.5) benetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden 0,3–0,4 ml/cm² Erhaltungsmedium für HEF-Kulturen bzw. Waymouth-Medium für LMH-Kulturen auf den Zellrasen gegeben.

3.2.2.5 Gewinnung von Zellkulturmaterial

Die Zellkulturen wurden täglich unter dem Mikroskop auf die Ausbildung eines CPE kontrolliert. Nach Auftreten eines deutlichen CPE, spätestens jedoch nach zehn Tagen (HEF-Kulturen) bzw. sechs Tagen (LMH-Kulturen), wurde das Zellkulturmaterial dreimal eingefroren und wieder aufgetaut und zur weiteren Passagierung genutzt. Die Lagerung über längere Zeiträume erfolgte bei –20 °C.

3.2.2.6 Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung der Zellkultur-infektiöse Dosis 50 (TCID₅₀) wurde von dem Ausgangsmaterial mit Medium eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen hergestellt. Je sechs Wells einer 96 Well Platte oder je drei Wells einer 24 Well Platte, in die einen Tag vorher Zellen eingesät worden waren, wurden mit 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe infiziert

(3.2.2.4 bzw. 3.2.2.2). Nach sechs Tagen wurde der Test abgelesen und die TCID₅₀ nach der Methode von Spearman–Kärber (Formel 3) berechnet.

Formel 3: Berechnung des TCID₅₀ nach Spearman–Kärber (Villegas, 1998)

$$\lg(\text{TCID}_{50}) = \frac{1}{2} - \lg(a) - \frac{\lg(v) \cdot n^-}{n}$$

a = höchste getestete Verdünnung

n⁻ = Anzahl der Wells, die keinen CPE aufweisen

n = Anzahl der Wells pro Verdünnungsstufe

3.2.3 Serologische Untersuchungen

3.2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von Antikörpern gegen Pocken

HEF–Kulturen wurden angesetzt (s. 3.2.2.1). Nach Ausbildung eines einheitlichen Zellrasens wurde am nächsten Tag das Medium abgenommen. Der Zellrasen wurde kurz in 10 ml Trypsin–Versen–Lösung gewaschen, danach mit Trypsin–Versen–Lösung benetzt und ca. 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach vollständiger Ablösung des Zellrasens wurden die Zellen in einer geringen Menge HEF–Erhaltungsmedium und durch wiederholtes Pipettieren vereinzelt. Danach wurde mit HEF–Erhaltungsmedium auf das doppelte der ursprünglichen Menge Medium aufgefüllt. Zu der Zellsuspension wurde 1% HP 1–Zellkulturmaterial gegeben und je 4 ml in Schälchen, in denen gereinigte, sterile Deckgläschen lagen, eingesät.

Vor Ausbildung eines CPE wurden die Deckgläschen nach einem Tag aus den Schälchen genommen, in PBS gespült und trocken gelassen. Anschließend wurden sie für 8 min bei RT in Azeton fixiert und wieder trocken gelassen.

0,2 ml der 1:50 in PBS verdünnten Seren wurden auf die bewachsene Seite der Deckgläschen gegeben. Nach 30 min bei RT wurden die Deckgläschen zwei Mal für je 10 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde FITC–Konjugat anti–chicken 1:100 in PBS verdünnt, und die bewachsene Seite der Deckgläschen damit bei Raumtemperatur 30 min mit 0,2 ml inkubiert. Zuletzt wurden die Deckgläschen nochmals zwei Mal für 10 min in PBS gewaschen.

Zur Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde ein Tropfen Glycerin–Tris auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit der bewachsenen Seite darauf gelegt.

3.2.3.2 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV (Pocken-ELISA)

3.2.3.2.1 *Beschichtung der ELISA-Platten*

Zellen und Überstand von mit HP 1 infizierten LMH-Kulturen (3.2.2) wurden nach Auftreten eines deutlichen CPE drei Mal eingefroren und wieder aufgetaut und anschließend mit dem Sonifier B-12 beschallt. Größere Zellbestandteile wurden zunächst durch Zentrifugation (30 min, 2200xg) und dann durch Filterung durch einen in das Edelstahlruckfiltrationsgerät eingelegten Zellulose-Acetat Filter (Porenweite 0,8 µm) abgetrennt. Das Virus wurde durch Ultrafiltration mittels des Ultrafiltrators Amicon CH2A und der dazu passenden Spiral-Membran-Filterpatronen weiter konzentriert. Die Herstellung des Antigens für die Negativ-Beschichtung erfolgte entsprechend aus nicht infizierten LMH-Kulturen.

Nach dem Prinzip der Positiv-Negativ-Beschichtung wurden in die vertikalen Reihen einer PVC-ELISA-Platte abwechselnd verdünntes negatives und positives Antigen (100 µl/Well) gegeben. Zur Austestung der Beschichtungskonzentration wurde das Antigen 1:5, 1:10, 1:15 und 1:20 in Coating-Puffer verdünnt. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Wells je drei Mal mit PBS und danach mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Platte in Alufolie eingepackt und über Nacht bei -70 °C belassen.

Danach wurde der ELISA mit positivem und negativem Kontrollserum durchgeführt (3.2.3.2.2). Als Antigenverdünnung für die Beschichtung der restlichen Platten wurde die höchste Verdünnung gewählt, bei der die ODD (Differenz der optischen Dichte) der Positivkontrolle zwischen 0,5 und 1,5 lag. Für diese Arbeit wurden zwei Chargen, die mit einer Verdünnung von 1:15 bzw. 1:20 beschichtet waren, verwendet.

Die restlichen Platten wurden mittels des oben beschriebenen Verfahrens mit der gewählten Antigenverdünnung beschichtet und bis zum Gebrauch bei -70 °C in Alufolie gelagert.

3.2.3.2.2 *Durchführung des ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV*

Vor der Testdurchführung wurden die Wells der Platten mit ELISA-Waschpuffer drei Mal gewaschen und die Plasma- oder Serumproben, sowie Positiv- und Negativkontrolle 1:100 in Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Von den Kontrollen und den verdünnten Proben wurden je 100 µl in ein positiv und ein negativ beschichtetes Well gegeben. Danach folgte eine Inkubation bei 37 °C für eine Stunde im Dunkeln, nach der die Wells entleert und drei Mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen wurden. Anschließend wurden 100 µl Konjugat-Lösung in jedes Well pipettiert und wiederum für eine Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Wiederholung des

Waschschritten wurden 100 µl Chekit® Chromogen in jedes Well gegeben. Nach 30 min bei 37 °C im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Chekit® Stopplösung beendet.

Die optische Dichte wurde bei 405/492 nm mittels des ELISA-Readers MRX und des Programmes Revelation V. 3.04 gemessen und ausgewertet. Der S/P-ratio wurde aus der Differenz der optischen Dichten des mit positivem und des mit negativem Antigen beschichteten Wells nach **Formel 4** berechnet (Zahner et al., 1981).

Formel 4: Berechnung des S/P-ratios für den FPV-Antikörper-ELISA

$$S/P = \frac{ODD_{\text{Probe}} - ODD_{\text{NC}}}{ODD_{\text{PC}} - ODD_{\text{NC}}}$$

ODD_{Probe} = Differenz der optischen Dichten der Probe

ODD_{NC} = Differenz der optischen Dichten der Negativkontrolle

ODD_{PC} = Differenz der optischen Dichten der Positivkontrolle

3.2.3.3 AGP

Zur Herstellung von Platten für den AGP wurden 5g Agar in 495ml 8%iger NaCl-Lösung unter Erwärmen aufgelöst und auf pH 7,5 eingestellt. Nach Autoklavieren über 20 min bei 121 °C wurde der pH-Wert auf 7,2 gesenkt und der Agar nochmals über 20 min bei 100 °C sterilisiert. Anschließend wurden je 15 ml in Petrischalen mit einem Durchmesser von 8,5cm gegossen. Nach Verfestigung des Agars wurden die Platten bis zur Testdurchführung bei 4 °C aufbewahrt.

Vor der Benutzung wurden mit einem Stempel sechs, im Abstand von je 4 mm kreisförmig um ein siebtes angeordnete Löcher mit einem Durchmesser von je 5 mm ausgestanzt. Anschließend wurden die Agarplatten 10 sec in eine an eine Membranvakuumpumpe angeschlossene Vakuumkammer mit 0,8 bar gebracht.

Zur Testdurchführung wurden in die peripheren Löcher 30 µl Serum oder Plasma und in das zentrale Loch 30 µl Pocken-Antigen gegeben. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Test visuell über einer Lichtquelle ausgewertet. Das Vorliegen präzipitierender Antikörper wurde durch das Auftreten einer feinen Präzipitationslinie zwischen den Vertiefungen mit dem untersuchten Serum und dem Antigen angezeigt.

3.2.3.4 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen REV

Die Bestimmung des Antikörpertiters gegen REV erfolgte mittels des ELISA Kits Flockcheck®-REV gemäß der Anleitung des Herstellers. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Plasma- oder Serumproben wurden 1:500 in Probenverdünnungspuffer verdünnt. Anschließend wurden 100 µl Positiv- und Negativkontrolle in je zwei Wells und 100 µl

verdünnte Serum- bzw. Plasmaproben in je ein Well gegeben. Nach 30 min wurden die Wells entleert und drei Mal mit dH₂O gewaschen. Danach wurden 100 µl Konjugat in jedes Well pipettiert und die 30-minütige Inkubation und der Waschschrift wiederholt. Schließlich wurden 100 µl TMB-Substratlösung in jedes Well gegeben. Die Reaktion wurde nach 15 min mit 100 µl Stopplösung beendet.

Die optische Dichte wurde bei 650 nm mittels des ELISA-Readers MRX und des Programmes Revelation V. 3.04 gemessen und ausgewertet. Der S/P-ratio wurde nach Formel 5 berechnet (Zahner et al., 1981). Proben mit einem S/P-ratio von mehr als 0,5 wurden als positiv bewertet.

Formel 5: Berechnung des S/P-ratios für den REV-Antikörper-ELISA

$$\text{S/P-ratio} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{NC}}}{\text{OD}_{\text{PC}} - \text{OD}_{\text{NC}}}$$

OD_{Probe} = optische Dichte der Probe

OD_{NC} = optische Dichte der Negativkontrolle

OD_{PC} = optische Dichte der Positivkontrolle

3.2.3.5 Hämagglutinationstest zum Nachweis von Antikörpern gegen Schafserythrozyten

Das Schafblut wurde bei 320 x g zentrifugiert und das Serum abgenommen. Anschließend wurden die Erythrozyten so oft mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar blieb. Zur Injektion der Tiere wurde dann eine 50 %ige Lösung eingestellt, zur Durchführung des Hämagglutinationstestes eine 0,5 %ige Lösung.

In eine Mikrotiterplatte wurden in jedes Well 50 µl PBS vorgelegt. Von jeder über 30 min bei 56 °C inaktivierten Plasmaprobe wurden 50 µl in das erste Well jeder Zeile zugegeben und durch Überpipettieren von je 50 µl eine 1 : 2-Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurden in jedes Well 50 µl 0,5 %ige Schafserythrozytensuspension hinzugegeben. Die Platten wurden für 2 h im Kühlschrank gelagert und anschließend abgelesen. Als Titer wurde die letzte Verdünnung gewertet, die noch eine Hämagglutination zeigte.

3.2.4 Durchführung der Infektionsversuche

3.2.4.1 Tiere

Für die Versuche wurden aus SPF-Eiern geschlüpfte Eintagsküken verwendet.

3.2.4.2 Haltung

Die Aufstallung erfolgte einstreulos in Isolatoren. Die Be- und Entlüftung wurde automatisch gesteuert. Als zusätzliche Wärmequelle dienten Rotlichtlampen. Die Gabe von Futter und Wasser erfolgte ad libitum.

3.2.4.3 Infektion

Die intrakutane Infektion erfolgte durch Durchstechen der Flügelspannhaut mit einer zuvor autoklavierten Impfdoppelnadel, die in das Zellkulturmaterial bzw. die Vakzine getaucht worden war (Wing-Web-Methode), die intravenöse Infektion mittels Feindosierungsspritze in die Drosselvene.

3.2.4.4 Probennahme

Die Entnahme von Blutproben erfolgte entweder mittels Feindosierspritze aus der Drosselvene, nach Anritzen der Flügelvene tropfend in Lithium-Heparinröhrchen oder nach Durchtrennen der Drosselvene in einen geöffneten Vacutainer™ mit vorgelegtem Natrium-Zitrat.

3.2.4.5 Präparation der PBMC

Zur Präparation der PBMC aus heparinisiertem oder Citrat-Vollblut wurde zunächst das Plasma abzentrifugiert (10 min, 730xg) und abgenommen. Die verbleibenden zellulären Bestandteile des Blutes wurden in 3ml PBS aufgenommen und in einem Polypropylen Reagenzröhrchen über 3 ml Ficolle-Paque™ geschichtet. Nach Zentrifugation (20 min, 560xg, 20 °C, ungebremst) konnten die PBMC an der Phasengrenze abpipettiert und in ein Zentrifugegefäß (2 ml) überführt werden. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 2000xg) wurden die PBMC in 200 µl sterilem PBS aufgenommen.