

2. Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden, wenn nicht extra erwähnt, von Sigma oder Merck in z. A.-Qualität bezogen.

Agarose (embed certified)	NEB
Agarose (Low melting)	Gibco BRL
Agarose (SEAKEM GTG)	FMC
Agarose (SeaPlaque GTG)	FMC
Alconox	Aldrich
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bisacrylamid	BioRad
Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	Roth
GC medium base	Difco
Gelatine	Difco
Hefeextrakt	Difco
IPTG	Biomol
Magermilch (Skim Milk)	Difco
Piperidin	Fluka
Proteose Peptone Nr.3	Difco
SDS	BDH
β -Mercaptoethanol	Serva
TEMED	Serva
Tween 20	Serva
X-Gal	Biomol

2.2 Enzyme und DNA

AmpliTaq DNA Polymerase	Perkin Elmer
Lysozym	Boehringer Mannheim
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Ribonuklease A	Boehringer Mannheim
T4 DNA Ligase	Boehringer Mannheim
Lachs-Spermien DNA	Sigma

2.3 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme sind nach den Herstellervorschriften mit den mitgelieferten Reaktionspuffern eingesetzt worden.

Tabelle 2.1: **Verwendete Restriktionsenzyme.**

Enzym	Bezugsquelle
<i>AflIII</i>	Boehringer
<i>BamHI</i>	Boehringer
<i>BglIII</i>	NEB
<i>BssHII</i>	Boehringer
<i>ClaI</i>	NEB
<i>DdeI</i>	NEB
<i>DraI</i>	NEB
<i>DraIII</i>	Boehringer
<i>EcoNI</i>	NEB
<i>HindII</i>	NEB
<i>MaeIII</i>	Boehringer
<i>MluI</i>	Boehringer
<i>NaeI</i>	Boehringer
<i>NheI</i>	NEB
<i>NlaIV</i>	NEB
<i>PacI</i>	NEB
<i>PmeI</i>	NEB
<i>Sau3AI</i>	Boehringer
<i>SgfI</i>	Promega
<i>SpeI</i>	NEB
<i>Sty I</i>	Boehringer
<i>XbaI</i>	Boehringer
<i>XmnI</i>	NEB

2.4 Molekulargewichtsstandards

1 kb DNA Leiter (75-12216 bp)	Gibco BRL
λ DNA- <i>HindIII</i> Verdau (125-23130 bp)	NEB
Low range PFGE Marker (0,13-194 kb)	NEB
Mid range PFGE Marker I (15-291 kb)	NEB

2.5 Kits

ABI PRISM TM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
DIG Lumineszenz Detektierungs-Kit	Boehringer Mannheim
DIG PCR Proben Synthese Kit	Boehringer Mannheim
Gigapack II Gold Packaging Extract	Stratagene
JETSorb DNA Extraction Kit	Genomed
Lambda DASH II undigested Vector Kit	Stratagene
Quiagen Plasmid Isolation Kit	Quiagen
TA Cloning [®] Kit	Invitrogen

XL-PCR-Kit

Perkin-Elmer

2.6 Materialien

Einmal-Filterhalter 0,2 mm Rotrand

Schleicher & Schuell

Hybond-N⁺ Membran

Amersham

Polaroid Land-Film

Polaroid

3 MM Filterpapier

Whatman

Mikrotiter Platten:

96 „wells“, flacher Boden

NUNC

96 „wells“, V-förmiger Boden

Greiner

Röntgenfilm Exponierungskassetten

Kodak

2.7 Geräte

Brutschrank

Heraeus

Brutschrank 5% CO₂, 70% Luftfeuchtigkeit

Labotect

Elektrophoresesysteme:

Gelkammer 14 x 14 cm

Werkstatt MPI

FIGE Mapper Elektrophorese System

BioRad

PulsaphorTM PFGE-System

Pharmacia

Feinwaage AT-20

Mettler

Polaroidkamera (Professional) mit Orange-Filter

Polaroid

Klett-Photometer

Arthur H. Thomas

Mikrowellengerät Micromat 700

AEG

Minischüttler

Adolf Kühner

MultiTemp IITM Thermostatik Zirkulator

Pharmacia

PCR-Maschinen:

Thermocycler 60 (Wasserbad-PCR)

Biomed

GeneAmp 2400

Perkin Elmer

GeneAmp 9600

Perkin Elmer

Power Pack ECPS 3000/150

Pharmacia

Sonifizierer B30

Branson

Spektralphotometer UV-VIS 554

Perkin Elmer

Spektralphotometer GeneQuant

Pharmacia

Ultraschallbad RK510H

Bandelin

Umlaufkühler Multi Temp II

Pharmacia

UV-Transilluminator

UVP

Videokamera mit Orange-Filter

Mitsubishi

Wasserbad mit Heizung D8

Haake

Zentrifugen:

SpeedVac Concentrator SVC100H

Savant

Zentrifuge 3200 (ca. 8000 x g)

Eppendorf

Zentrifuge 5414S (ca. 15000 x g)

Eppendorf

Zentrifuge 5415C

Eppendorf

Zentrifuge 5416
 Zentrifuge 3 MK
 Zentrifuge Sorvall RCSB

Eppendorf
 Sigma
 Du Pont Instruments

2.8 Computer-Programme

Windows 95	Microsoft
Access 2.0	Microsoft
Designer 4.1 und 6.0	Micrografx
DNAMAN 2.5, 4.0	Lynnon BioSoft
Excel 7.0	Microsoft
HAPLOT	Thomas Whittam, Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania, USA, 1994
MACAW 2.0.5	G. Schuler, National Center for Biotechnologic Information, Bethesda, Maryland, USA, 1995
MEGA 1.02	S. Kumar, K.Tamura und M. Nei, Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania, USA
DNASP 3.0	J. Rozas und R. Rozas, Universität Barcelona, Spanien, 1998
PRIMERPREMIER4	PremierBiosoft, Palo Alto, Kalifornien, USA
PSFIND	Mark Achtman, MPI für molekulare Genetik, Berlin, 1997
Reference Manager für Windows 7.0	Research Inf. Systems
SPLITSTREE 3.0b	Daniel Huson, 1999, Universität Bielefeld ftp://ftp.uni-bielefeld.de/pub/math/splits/splitstree2
Winword 7.0	Microsoft
MacOS Version 6.0	Apple
ABI Prism 377XL Collection (Version 2.0, 1996)	Applied Biosystems
CodonUse 3.5.5	Conrad Halling, Monsanto Co., 700 Chesterfield Parkway St. Louis MO 63198
Sequence Analysis (Version 3.0, 1996)	Applied Biosystems
Digital-UNIX Version 4.0	Digital Corp.
ARB	W. Ludwig und O. Strunk, Lehrstuhl für Mikrobiologie TU München 1997
GCG 9	University of Wisconsin Genetics Computer Group, Wisconsin, USA
MIROPEATS	J.Parsons, European Bioinformatics Institute 1995, Cambridge, England (http://www.genome.ou.edu/miropeats.html)
STADEN-Package	Roger Staden, (http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/pubseq/)
ASP	SANGER Centre, http://www.sanger.ac.uk/Software/Sequencing/ASD/programs.shtml

Internet-Anwendungen

<i>N. meningitidis</i> genome sequencing (Sanger Centre)	http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis/
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 genome sequencing (Bruce Roe)	http://dna1.chem.ou.edu/gono.html
BLAST-Suche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast
PSI BLAST-Suche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-psi_blast
ORF-Finder	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/gorf/orfig
PSORT WWW Server	http://psort.nibb.ac.jp:8800/
NCBI-Genbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

2.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei den Firmen Gibco-BRL, Metabion und TIB Molbiol bestellt.

Tabelle 2.2: *lr*PCR-Primer für den Lambda-DASH II-Phagen.

Name	Sequenz	Position ⁰	Orientierung
DASH II T3 long	GCGGCCGCGAATTAACCTCACTAAAGGGAACG	-40	+
DASH II T7 long	GCGGCCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCG	44	-

0) Position relativ zu den *Bam*HI-Schnittstellen des Lambda DASH II Phagen

Tabelle 2.3: Amplifikations- und Sequenzierungsprimer für die *shot-gun*-Klonierung.

Name	Sequenz	Position ¹	Orientierung
pUC/M13 Forward	GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTG	-151	+
pUC/M13 Reverse	CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG	84	-
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGACC	27	-

1) Position relativ zur *Sma*I-Schnittstelle des pUC19-Vektors (Pharmacia)

Tabelle 2.4: *lr*PCR-Primer für die für die Produkte der chromosomalen Bestätigungssequenzierung und der Restriktionsanalysen.

*lr*PCR-Produkt A:

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
potF_lr_forw	TTGAAAATGCTGGAAACCGCCGACCCGGGCAACCA	1	+
lr_rev3	TTGACGGTAGACGGCTTGGCGCAAATACAGTCCTA	5251	-

*lr*PCR-Produkt B:

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
forw4	CGTGCACTCCGTATAAGTATGTGGCCCAAGCG	3912	+
rev4	GTCGTCCGCCATAACCTTCTGAGACAGTCCGTGCA	11639	-

*lr*PCR-Produkt C:

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
lr_forw5	GCAAGGGAAAGTGCCTGCAGCCCAACACCAGCGTA	10147	+
lr_rev5	ATTACCAAGCCTGTAAATGAGCTTGTGGTTCTAT	17499	-

Material und Methoden

lrPCR-Produkt D:

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
forw6	TCACCCGCCTTCTGCCAAGACCATTCTGCCCTTC	15902	+
rev6.2	CTGATTGTGTTCGTTTCGTCAACTATGTGCTGACCC	23638	-

2) Position relativ zum ersten Nukleotid der Sequenz von *potF* bis *opaA*-repeats in Z2491 (beginnt mit Primer potF_lr_forw)

Tabelle 2.5: Sequenzierungs-Primer für die chromosomalen lrPCR-Produkte aus Z2491 (Serogruppe A, Subgruppe IV-1).

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
s_f_tbp1down 26	AAACGTTTCAGCCCGTCCATCAT	310	+
s_r_tbp1down 26	GCACTTCGATGCCGACGTTGTTT	420	-
s_f_tbp1down 27	TCTGTCAGCCTGTGGCAGAAAAT	715	+
s_r_tbp1down 27	CTGCGGCTTTGTGCTTGTCCCT	851	-
s_f_tbp1down 28	TTTTCCGATAACGCCGTAACCTT	1130	+
s_r_tbp1down 28	GACGCGTTCGGATTACGACTGC	1234	-
s_f_tbp1down 29	TCCCACGAAAGTGGGAATCTAGA	1554/24133	+/-
s_r_tbp1down 29	TCCAATAAATGACCCCAACTTAA	1810	-
s_f_tbp1down 30.1	AAGTGGGAATCCAGTTCGTTTCGGTT	1867	+
s_r_tbp1down 30	GCTCCCATAAATGCCGAATCTCA	2239/8156	-/-
s_f_tbp1down 31	AGCAACAGAAGCCGCTCTGCCGTCA	2261/8178/8949	+/+
s_r_tbp1down 31	ACCTGTCGGTGCAGAACTTATCGG	2607	-
s_f_tbp1down 32	AATCCGAATACATCCGAACAGAAAC	2581	+
s_r_tbp1down 32	TTGGAAATGAAGTTTTAAACGTCCA	2876	-
s_f_tbpopa 1	ACTTCATTTCCAAGCTAAATGTG	2888	+
s_r_tbpopa 1	CACATTTAGCTTGGAAATGAAGT	2888	-
s_f_tbpopa 2	TCCTTGGCTTTGGAATAAGTCAG	3181	+
s_r_tbpopa 2	AGACCGCACCGATATCAATCAC	3290	-
s_f_tbpopa 3	CACGATGCCGGCTTCTTTGTGTA	3582	+
s_r_tbpopa 3	GCACTTCAACCGGCTTCCGCCTG	3681	-
s_f_tbpopa 4	CTGACCCAATAGGGTTGGTCTCT	3982	+
s_r_tbpopa 4	CTTTGACTCTAATCTCCGCCATC	4082	-
s_f_tbpopa 5	ACATATCCAAACCGTAGCGG	4381	+
s_r_tbpopa 5	CGACCACAAATACGGCGGTCTGT	4481	-
s_f_tbpopa 6	TTTTCGGTTTGCTTTTACACGTT	4784	+
s_r_tbpopa 6	GCGGCGTTCAGAGCTTTAACAGG	4881	-
s_f_tbpopa 7	ATACTCGATTTTCATTGATTGCG	5181	+
s_r_tbpopa 7	CTCGATACGCGGTATGGACAAAA	5297	-
s_f_tbpopa 8	ATATTTAATCGGAACAAATGTTG	5584	+
s_r_tbpopa 8	TAAGCACGGTTGCCGAACAATCA	5682	-
s_f_tbpopa 9	ACAATGGTAAAGGTTGCCG	5982	+
s_r_tbpopa 9	TGGAGCGGCAATGCTTCCGATAA	6084	-
s_f_tbpopa 10	TGAAGCGGCTGGATTGCCATTCT	6383	+
s_r_tbpopa 10	TCAAGCCAATCAAGGTACAAATG	6481	-
s_f_tbpopa 11	AAAAGCGGAAACCCAATTCCTCA	6784	+
s_r_tbpopa 11	GGAAAGCAACCGACAAACCCAAAA	6883	-
s_f_tbpopa 12	AAAATCCCAAGTACCTTTGTACA	7205	+
s_r_tbpopa 12	CCCGAAGTGGGCCTGACGGTTAT	7283	-
s_f_tbpopa 13	TACCAATTCCTCCGTTTCAACCT	7581	+
s_r_tbpopa 13	TTGATTCTGTCGATACCGAAGCC	7688	-
s_f_tbpopa 14	CCCACAAAAGTGGGAATCCGG	7982	+
s_r_tbpopa 14	TCCCGATAAATGCCGCAATTTCA	2239/8156	-/-
s_f_tbpopa 15	GAATGACGAATCCATCTATACGG	8299	+
s_r_tbpopa 15	GTGCAGGTTTCCGTATAGATGGA	8309	-
s_f_tbpopa 16	CCATCCATACGGAAACCTGCACT	8620	+
s_r_tbpopa 16	CGAAACCGAACGAACAGATTCC	8687	-
tbp2rep_up	AATAGCTGAAACTCAACGCACTG	1950/8765	-/-

Material und Methoden

tbp2rep_down	CGCTTGAGTTTCAGCTATTTAGA	1954/8796	+/+
s_f_tbpopa 17	TTGCCTTAGCATTGAATGTCTGG	2338/9023	+/+
s_r_tbpopa 17	TTTTAGCTTGTGGGTATTTACCG	1402/9092	-/-
s_f_tbpopa 19	GGAATGACGGGATTTGAGGTTTC	2651/9740	+/+
s_r_tbpopa 19	AGATTACAGAAACCTAAAAATCCC	9872	-
tbp2_uprepeat_rev	CGACAACAACAATCCCCGACTACCGT	10013	-
s_f_tbpopa 20	GGTTTCTTCGGCCGTTGTAATTG	10073	+
s_r_tbpopa 20	GACACGCTCGTCCGCACGCAGGC	10287	-
s_f_tbpopa 21	CTGCCCCGCCACCGCCGCAATCG	10472	+
s_r_tbpopa 21	TTTTGACTCGGGAATCGGCGGTT	10672	-
s_f_tbpopa 22	TGCAAAAACCTGCAAAACTGCC	10876	+
s_r_tbpopa 22	CTGCGCCCTGATGACCCAATCCG	11089	-
s_f_tbpopa 23	CAGGGAGGGCAATTTACCCC	11273	+
s_r_tbpopa 23	CCAGCGTCAGGCGGGTGTAGGTG	11523	-
s_f_tbpopa 24	CGCCGGTCAGAACACGCCCGACA	11694	+
s_r_tbpopa 24	TTGGGCGAGGTCGGCTTCGGGAG	11891	-
s_f_tbpopa 25	CCTTGGGTTACAACGTCTTTATG	12077	+
s_r_tbpopa 25	CATTGTTTTGCGTCTGTCTAAG	12273	-
s_f_tbpopa 26	CGCACCCGATATGCGTCTATCC	12480	+
s_r_tbpopa 26	AGTAGGTTTATGCCTGCCTTCAT	12672	-
s_f_tbpopa 27	ACGGACTCCGTGCGTAATATTGA	12839	+
s_r_tbpopa 27	TCGATACCGATTTCTCAATATT	12854	-
s_f_tbpopa 28	ACAGCGTTACCATAAGCGGGACA	13140	+
s_r_tbpopa 28	CGCCAAATTATTATGGAGATAAA	13260	-
s_f_tbpopa 29	TTGTTATCCGTATCTTCCGCACG	13548	+
s_f_tbpopa 30	TTCCCGATCTCCGGTAAACATTG	13941	+
s_r_tbpopa 30	GGTGTCCAATCCGCCCTACGGTG	14051	-
s_f_tbpopa 31	GCAATCCAAGCGGCTTCGATAGC	14335	+
s_r_tbpopa 31	TCAAACGCGGCTACCGTCTCGAT	14466	-
s_f_tbpopa 32	TTTTGGCGAGTTTGTAGATGTG	14735	+
s_r_tbpopa 32	GTGTTTGACGGCGGCTTTCCTG	14857	-
s_f_tbpopa 33	CCCGACGGTTGCCGCTCGAACAT	15139	+
s_r_tbpopa 33	GCGCCGCCCGGTTTCAACCAAA	15261	-
s_f_tbpopa 34	TTTGCTGCAAGTACGAGCGG	15533	+
s_r_tbpopa 34	GAACAATGGCGGCAGGCGCAGGA	15641	-
s_f_tbpopa 35	CCTTCGCGGATTGCGGTTCCGC	15932	+
s_r_tbpopa 35	CATCCGCATCCTCGCCGCCACGC	16035	-
s_f_tbpopa 36	CGCAACGGCAAACGCCTATACGG	16335	+
s_r_tbpopa 36	GCCAAAGCCGTCGGTACGGGCAT	16503	-
s_f_tbpopa 37	GATGAATGCCGTCAATTTCTTGG	16749	+
s_r_tbpopa 37	GGGTATTACGGTTTAAATCAAAC	16907	-
s_f_tbpopa 38	TAACAATATGGGAGACATGGCA	17194	+
s_r_tbpopa 38	TGATGGCAATCATTACATTGTAT	17335	-
s_f_tbpopa 39	TGTACCGAGCATCGGAAATCCCA	17584	+
s_r_tbpopa 39	GCATGCCAGAACTGATTATACGG	17721	-
s_f_tbpopa 40.1	ATTACCCCATCTCACACCTTG	17944	+
s_r_tbpopa 40	AAATCAGCCAATGATGGAGGTAA	18902	-
s_f_tbpopa 41	TGATTCATAACATACTCCTGTGCG	18452	+
s_f_tbpopa 41.1	CGAATGCCCGATGTTCAAGTTCGC	18593	+
s_r_tbpopa 41	CTGCCGTAAGGGCAGGCAACCG	18492	-
s_r_tbpopa 41.1	TTACCCCCATCGCCCAAATCCTC	18623	-
s_f_tbpopa 42	GCGCCGACATCACGGGCGGCTTG	18798	+
s_r_tbpopa 42	ACGTATTGGCGCAACAAGACAAA	18899	-
s_f_tbpopa 43	CGCATTGCGGACGGTAGCGATGT	19187	+
s_r_tbpopa 43	CCCGGGAAACCGTCCCAGCTTCG	19285	-
s_f_tbpopa 44	CGTCGCGGTTCAAATCGGG	19587	+
s_r_tbpopa 44	TATACGACGCGTTGGCGGAAGTG	19690	-

Material und Methoden

s_f_tbpopa 45	CGCCAGGGCGAGGAAGCCAACAG	1991	+
s_r_tbpopa 45	CAAAGTCATCGTTCGTACCCGAC	20096	-
s_f_tbpopa 46	CGTGGTGTGTTCGGTTCGTCTT	20386	+
s_r_tbpopa 46	CAGCAATGCCGAAGCCGCAAGGC	20502	-
s_f_tbpopa 47	AACCTGCTTGAAGCAGTTGTCTA	20785	+
s_r_tbpopa 47	CCGCTGACCATCGCCTATCTGGG	20885	-
s_f_tbpopa 48	TAATTTTCGCCTGAACGGTGGTTT	21171	+
s_r_tbpopa 48	CTCGCATCGTGCCTGGAAAGAAA	21272	-
s_f_tbpopa 49	CGGCGGCGAGTTGGGACAGGTTG	21572	+
s_r_tbpopa 49	TTTGCACTCAACATCATCACGAT	21688	-
s_f_tbpopa 50	CTGCCAGCCACCCAAGCCCTGCA	21981	+
s_r_tbpopa 50	TTCCGGACGCAAAGCCGCCAGAA	22070	-
s_f_tbpopa 51	GAATCGCGGGCAGGTAGGCATCG	22373	+
s_r_tbpopa 51	ATCGGACGAGAATTTATGCCTTC	22474	-
s_f_tbpopa 52	GAATCCGGACATCCAACGCTGCA	22793	+
s_r_tbpopa 52	CGGATATTTATCCGAAATAACGA	22889	-
s_f_tbpopa 53	AATAGGCGTACCAGATGCACCCC	23191	+
s_r_tbpopa 53	GCATCGTTGATGTGCTGCCGTT	23289	-
s_f_tbpopa 54	ATGCGCTGGCGGCGGAAGTGTAT	23590	+
s_r_tbpopa 54	CGCCGTCATGTCGGCAAGATTCC	23694	-
s_f_tbpopa 55	TCTTTGAGCTAAGGCGAGGTAAC	23990	+
s_r_tbpopa 55	TATCGGAAATGACCGAAACTGAA	24090	-

2) Position relativ zum ersten Nukleotid der Sequenz von *potF* bis *opaA*-repeats in Z2491 (beginnt mit Primer *potF_Ir_forw*)
Mehrfache Nennung einer Position zeigt daß der Primer in einem *Repeat* liegt und nur bei kleinen PCR-Produkten, die nicht zwei oder mehr der angegebenen Positionen überspannen, eingesetzt werden kann.

Tabelle 2.6: Spezielle Sequenzierungsprimer für das *tbpAB*-Operon aus Z4400 (ET-37 Komplex).

Name	Sequenz	Position ³	Orientierung
tbp2_ET-37-1	GGGCAAAGTCGTGTAGTTGGTTAT	385	+
tbp2_ET-37-D	TTGCCCATCTTCCATTTTGATTC	367	-
tbp2_ET-37-C	CGGATGATGCCTCTGCCTGATTAC	680	-
tbp2_ET-37-2	GCGTTACACCATTCAAGCAACTCT	831	+
tbp2_ET-37-B	TGAAAGCTCCACTCCGTCAACCAG	1165	-
tbp2_ET-37-3	ATTGAGCAAAACGGCGTGAAGGC	1231	+
tbp2_ET-37-A	GGCAGTAATAGTAAACGCAGGAGA	1534	-
tbp2_ET-37-4	TCCCACTATACGCATATTGAAGCC	1639	+
tbp1-E_ET-37	TAATGGCGGTTGTCCAAATG	2850	-
tbp1-4_ET-37	ACGCCGACTTTCTTATGAC	3151	+
tbp1-D_ET-37	TTTTTATCCGAACCGTCGTG	3219	-
tbp1-C_ET-37	TATCTTCCGAATGCGTGCTG	3686	-
tbp1-B_ET-37	TTGATACGGTTATAGGCAAG	4140	-

3) Position relativ zum ATG des *tbpB*-Gens im Stamm Z4400

Tabelle 2.7: Primer für die Amplifikation/ Sequenzierung der Genabschnitte aus *potF*, *tbpB*, *amiA* und *opaA*.

potF-Gen:

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
potF_Ir_forw	TTGAAAATGCTGAAAACCGCCGACCCGGCAACCA	1	+
potF_seq_forw	CCGAAAACGGCTGGGATTTG	116	+
potF_seq_rev	AACGGGTGTTCCACCAAGTTCC	621	-
potF_rev	TTTTCTGCCACAGGCTGACAGACAG	712	-

tbpB-Gen:

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
3' Met 2/ P1	TGCTATGGTGCTGCCTGTG	7754	-
tbp2_IV-1_comp	AATCCCAACCTACGTGCTC	7056	+
tbp2_ET-37-C	CGGATGATGCCTCTGCCTGATTAC	680 ³	-
5' inter 1/ P2	TGCCGTCTGAAGCCTTATTC	5661	+

amiC-Gen:

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
amiA_forw	AACAGCGTCTGCCTGATCGAATGGC	11243	+
amiA_seq_forw	ATTGCACGGACTGTCTCAGAAGGTT	11637	+
amiA_seq_rev	GTGAAAGCGTCGGCGTGGATG	12180	-
amiA_rev	GCTTCGTCCACCCTGCCTTTGTGC	12438	-

opaA-Gen:

Name	Sequenz	Position ⁴	Orientierung
opa_O824	TACGGAGTCGAAAATGAATCCAGCCCC	-13	+
opa_O80	AAGCAACCGGTGCAAACAACAAGC	180	+
opa_O87b	TTTTGAAGCGGGTGTTCCTCAAGC	747	-
opa_O258	GTCTGGCGCGGCACAGG	2543	-

2) Position relativ zum ersten Nukleotid der Sequenz von *potF* bis *opaA*-repeats in Z2491 (beginnt mit Primer *potF_lr_forw*),

3) Position relativ zum ATG des *tbpB*-Gens im Stamm Z4400,

4) Position relativ zum ATG-Startcodons des *opaA132*-Allels

Tabelle 2.8: Diverse Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Position ²	Orientierung
tbp1_stop_rev	GGTTTAGAAGTTACCCGAAAACCTC	2706	+
tbp1_A	GGCGGCATATCGGTTGTAAACGC	2924	+
tbp1down_lr	CCAAAGCCAAGGAAATCACAGAGTTGTTGGGCAGC	3159	-
rev3	CGTTACGACCCCGCATCGCCGTCGTCGAACAGGG	5341	-
tbp1_1	TGCAGAAAATGTGCAAGCCG	5547	-
G150_rev4	TCGCCACCAATACCACAGTCAACAGCAACGCCTAT	10337	-
forw5	CTGAAAGCAGAACGCGGATTGGCTGTTATAATGC	10805	+
amiA_lr_forw	TGTTTGCCGCAAACAGCGTCTGCCTGATCGAATGGC	11232	+
amiA_lr_rev	GCGTCATAAAGACGTTGTAACCCAAGGCTTCCAATT	12068	-
rev5	ATCGGTCAATACTCAAATGATTAGATTTAGAAGTG	17904	-

2) Position relativ zum ersten Nukleotid der Sequenz von *potF* bis *opaA*-repeats in Z2491 (beginnt mit Primer *potF_lr_forw*)

2.10 Plasmide

Tabelle 2.9: Verwendete Plasmide.

Name	genetische Eigenschaften
pUC19/SmaI/BAP	(2686 bp): <i>amp^r</i> (1626-2486), <i>ori</i> (861), Polylinkerregion (396-447)
pBR 322	(4363 bp): <i>tet^r</i> (86-1276), <i>amp^r</i> (3293-4156), <i>ori</i> (2535),
pCR TM II	(3932 bp, enthalten im TA Cloning [®] Kit): <i>lacZα</i> (1-571), Polylinkerregion (269-255), <i>F1 ori</i> (572-986), <i>cat^r</i> (987-2114), <i>amp^r</i> (2133-2992), ColE1 <i>ori</i> (3182-3765)

2.11 Bakterienstämme

Tabelle 2.10: *E. coli*-Stämme.

Stammbezeichnung	genetische Eigenschaften
XL-1 Blue:	<i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r_k^-, m_k^+) <i>supE44 thi-1 gyrA relA1 F 80 lacZDM15 D(lacZYA-argF) deoR I^-</i> .
DH5:	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> .

Tabelle 2.11: *N. meningitidis* -Stämme aus Gambia.

G-Nummer:	Sero-gruppe	Sub-gruppe	Referenz	Original-bezeichnung	Land	Isolations-Datum	Isolationsort
1	A	IV-1	Crowe et al.	W323	Gambia	08.04.1982	Rachen
4	A	IV-1	Crowe et al.	W075	Gambia	21.01.1983	Rachen
7	A	IV-1	Crowe et al.	W072	Gambia	21.01.1983	Rachen
11	A	IV-1	Crowe et al.	W070	Gambia	16.01.1983	Rachen
29	A	IV-1	Crowe et al.	8853	Gambia	17.02.1983	CSF
43	A	IV-1		0126	Gambia	23.02.1983	Blut
126	A	IV-1	Crowe et al.	2832	Gambia	22.11.1983	Rachen
135	A	IV-1	Crowe et al.	2365	Gambia	02.06.1983	Rachen
136	A	IV-1		1837	Gambia	21.04.1983	Rachen
137	A	IV-1	Crowe et al.	8627	Gambia	07.02.1983	Rachen
139	A	IV-1	Crowe et al.	0058	Gambia	21.02.1983	Rachen
152	A	IV-1		0940	Gambia	17.03.1983	Rachen
160	A	IV-1		0507	Gambia	01.03.1983	Rachen
169	A	IV-1		0927	Gambia	16.03.1983	Rachen
178	A	IV-1	Crowe et al.	0984	Gambia	18.03.1983	Rachen
204	A	IV-1		1907	Gambia	03.05.1983	Rachen
206	A	IV-1		1913	Gambia	03.05.1983	Rachen
211	A	IV-1		1944	Gambia	04.05.1983	Rachen
216	A	IV-1		2363	Gambia	02.06.1983	Rachen
218	A	IV-1		2348	Gambia	02.06.1983	Rachen
219	A	IV-1		2349	Gambia	02.06.1983	Rachen
221	A	IV-1		2018	Gambia	04.05.1983	Rachen
222	A	IV-1		2027	Gambia	04.05.1983	Rachen
223	A	IV-1		2048	Gambia	05.05.1983	Rachen
226	A	IV-1		1884	Gambia	03.05.1983	Rachen
230	A	IV-1	Crowe et al.	1859	Gambia	21.04.1983	Rachen
231	A	IV-1		1835	Gambia	21.04.1983	Rachen
264	A	IV-1	Crowe et al.	1561	Gambia	14.04.1983	Rachen
265	A	IV-1		1382	Gambia	11.04.1983	Rachen
268	A	IV-1		0342	Gambia	01.03.1983	Blut
277	A	IV-1		0549	Gambia	02.03.1983	Rachen
279	A	IV-1		0767	Gambia	15.03.1983	Rachen
322	A	IV-1	Crowe et al.	1090	Gambia	23.03.1983	Rachen
328	A	IV-1		2380	Gambia	02.06.1983	Rachen
333	A	IV-1		2376	Gambia	02.06.1983	Rachen
359	A	IV-1	Crowe et al.	W405	Gambia	01.01.1984	CSF
361	A	IV-1	Crowe et al.	W399	Gambia	31.01.1984	unbekannt
371	A	IV-1	Crowe et al.	B019	Gambia	05.11.1982	CSF
372	A	IV-1	Crowe et al.	B021	Gambia	15.04.1982	CSF
378	A	IV-1	Crowe et al.	B025	Gambia	06.04.1982	CSF
396	A	IV-1		8316	Gambia	31.01.1983	Rachen
526	A	IV-1		0360	Gambia	01.03.1983	Rachen
561	A	IV-1		0878	Gambia	16.03.1983	CSF
577	A	IV-1		0346	Gambia	01.03.1983	Rachen

Material und Methoden

623	A	IV-1	Crowe et al.	0949	Gambia	17.03.1983	Rachen
708	A	IV-1	Crowe et al.	W407	Gambia	26.01.1984	CSF
719	A	IV-1		1995	Gambia	04.05.1983	Rachen
760	A	IV-1		2502	Gambia	08.06.1983	Rachen
765	A	IV-1		1910	Gambia	03.05.1983	Rachen
767	A	IV-1		2026	Gambia	04.05.1983	Rachen
768	A	IV-1		2352	Gambia	02.06.1983	Rachen
774	A	IV-1	Crowe et al.	W264	Gambia	25.10.1983	unbekannt
776	A	IV-1	Crowe et al.	0921	Gambia	16.03.1983	Rachen
786	A	IV-1	Crowe et al.	B020	Gambia	15.03.1982	CSF
789	A	IV-1	Crowe et al.	W370	Gambia	01.01.1984	unbekannt
790	A	IV-1	Crowe et al.	W369	Gambia	01.01.1984	unbekannt
793	A	IV-1		1107	Gambia	23.03.1983	Rachen
804	A	IV-1		2400	Gambia	02.06.1983	Rachen
805	A	IV-1		1820	Gambia	21.04.1983	Rachen
806	A	IV-1		2370	Gambia	02.06.1983	Rachen
842	A	IV-1	Crowe et al.	S688	Gambia	01.05.1984	Rachen
849	A	IV-1	Crowe et al.	S690	Gambia	01.04.1984	Rachen
852	A	IV-1	Crowe et al.	S753	Gambia	01.05.1984	Rachen
857	A	IV-1	Crowe et al.	S760	Gambia	01.05.1984	Rachen
862	A	IV-1	Crowe et al.	S894	Gambia	01.05.1984	Rachen
867	A	IV-1	Crowe et al.	S842	Gambia	01.05.1984	Rachen
872	A	IV-1	Crowe et al.	S078	Gambia	01.05.1984	Rachen
881	A	IV-1	Crowe et al.	S683	Gambia	01.05.1984	Rachen
882	A	IV-1	Crowe et al.	S751	Gambia	01.05.1984	Rachen
889	A	IV-1	Crowe et al.	S830	Gambia	01.05.1984	Rachen
892	A	IV-1	Crowe et al.	S849	Gambia	01.05.1984	Rachen
902	A	IV-1	Crowe et al.	8012	Gambia	01.05.1984	Rachen
907	A	IV-1	Crowe et al.	S682	Gambia	01.05.1984	Rachen
912	A	IV-1	Crowe et al.	S054	Gambia	01.05.1984	Rachen
1210	A	IV-1	Crowe et al.	S049	Gambia	01.06.1985	Rachen
1211	A	IV-1	Crowe et al.	S050	Gambia	01.06.1985	Rachen
1212	A	IV-1	Crowe et al.	S053	Gambia	01.06.1985	Rachen
1213	A	IV-1	Crowe et al.	S055	Gambia	01.06.1985	Rachen
1214	A	IV-1	Crowe et al.	S058	Gambia	01.06.1985	Rachen
1215	A	IV-1	Crowe et al.	S059	Gambia	01.06.1985	Rachen
1216	A	IV-1	Crowe et al.	S060	Gambia	01.06.1985	Rachen
1217	A	IV-1	Crowe et al.	S007	Gambia	01.01.1985	unbekannt
1219	A	IV-1	Crowe et al.	S014	Gambia	01.01.1985	unbekannt
1221	A	IV-1	Crowe et al.	S017	Gambia	01.02.1985	unbekannt
1223	A	IV-1	Crowe et al.	S020	Gambia	01.04.1985	unbekannt
1226	A	IV-1	Crowe et al.	S999	Gambia	01.05.1985	CSF
1401	A	IV-1	Crowe et al.	42	Gambia	01.01.1988	Rachen
1403	A	IV-1	Crowe et al.	319	Gambia	01.01.1988	Rachen
1405	A	IV-1	Crowe et al.	492	Gambia	01.01.1988	Rachen
1407	A	IV-1	Crowe et al.	501	Gambia	01.01.1988	Rachen
1409	A	IV-1	Crowe et al.	512	Gambia	01.01.1988	Rachen
1411	A	IV-1	Crowe et al.	536	Gambia	01.01.1988	Rachen
1413	A	IV-1	Crowe et al.	734	Gambia	01.01.1988	Rachen
1415	A	IV-1	Crowe et al.	802	Gambia	01.01.1988	Rachen
1417	A	IV-1	Crowe et al.	1986	Gambia	01.12.1986	unbekannt
1420	A	IV-1	Crowe et al.	4250	Gambia	01.11.1986	unbekannt
1423	A	IV-1	Crowe et al.	jait	Gambia	01.09.1987	unbekannt
1425	A	IV-1	Crowe et al.	boja	Gambia	01.01.1988	unbekannt

CSF: Cerebrospinal-Flüssigkeit

Material und Methoden

Tabelle 2.12: *N. meningitidis*-Stämme aus Mali.

Z-Number	Serogr.	Subgr.	ET	Original- bezeichnung	Land	Isolations-Datum	Isolationsort
4181	C	ET-37 K.	4	88	Mali	13.05.1989	CSF
4182	C	ET-37 K.	4	2612891	Mali	26.12.1989	CSF
4183	C	ET-37 K.	4	02019002	Mali	02.01.1990	CSF
4185	C	ET-37 K.	4	16019001	Mali	16.01.1990	CSF
4187	C	ET-37 K.	4	160	Mali	28.11.1989	CSF
4193	C	ET-37 K.	3	2901902	Mali	29.01.1990	CSF
4194	C	ET-37 K.	unbekannt	2702901	Mali	27.02.1990	CSF
4195	C	ET-37 K.	4	2702901	Mali	27.02.1990	Rachen
4196	C	ET-37 K.	4	28029001	Mali	28.02.1990	CSF
4197	C	ET-37 K.	4	2802903	Mali	28.02.1990	CSF
4203	C	ET-37 K.	4	1003901	Mali	10.03.1990	CSF
4204	C	ET-37 K.	4	1303901	Mali	13.03.1990	CSF
4205	C	ET-37 K.	4	15039001	Mali	15.03.1990	CSF
4206	C	ET-37 K.	4	1903901	Mali	19.03.1990	CSF
4207	C	ET-37 K.	4	2003902	Mali	20.03.1990	CSF
4401	C	ET-37 K.	4	1704901	Mali	17.04.1990	CSF
4402	C	ET-37 K.	4	1804903	Mali	19.04.1990	CSF
4403	C	ET-37 K.	4	1804902	Mali	19.04.1990	CSF
4404	C	ET-37 K.	4	3004902	Mali	01.05.1990	CSF
4405	C	ET-37 K.	4	2005901	Mali	01.05.1990	CSF
4406	C	ET-37 K.	4	3105902	Mali	31.05.1990	CSF
4407	C	ET-37 K.	4	1506901	Mali	16.06.1990	CSF
4408	C	ET-37 K.	4	9010	Mali	18.04.1990	CSF
4410	C	ET-37 K.	4	2403901	Mali	24.03.1990	CSF
4411	C	ET-37 K.	4	2903901	Mali	29.03.1990	CSF
4412	C	ET-37 K.	4	3103902	Mali	03.04.1990	CSF
4413	C	ET-37 K.	4	9003	Mali	18.04.1990	CSF
4416	C	ET-37 K.	4	2004901	Mali	21.04.1990	CSF
4418	C	ET-37 K.	4	2304901	Mali	24.04.1990	CSF
4423	C	ET-37 K.	2	1905901	Mali	20.05.1990	CSF
4424	C	ET-37 K.	4	9004	Mali	18.04.1990	CSF
4425	C	ET-37 K.	4	9009	Mali	18.04.1990	CSF
4426	C	ET-37 K.	4	9006	Mali	18.04.1990	CSF
4427	C	ET-37 K.	4	1405902	Mali	15.05.1990	CSF
4427	C	ET-37 K.	4	1405902	Mali	15.05.1990	CSF
4804	C	ET-37 K.	4	1604912/11/B	Mali	25.04.1991	CSF
4805	C	ET-37 K.	4	04029101	Mali	04.02.1991	CSF
4806	C	ET-37 K.	4	0208902	Mali	21.08.1990	CSF
4808	C	ET-37 K.	unbekannt	2903911/29	Mali	07.04.1991	CSF
4809	C	ET-37 K.	unbekannt	0803911/4	Mali	18.03.1991	CSF
4810	C	ET-37 K.	unbekannt	19039102	Mali	12.04.1991	CSF
4814	C	ET-37 K.	4	1604912/10	Mali	25.04.1991	CSF
4815	C	ET-37 K.	unbekannt	1604912/7	Mali	25.04.1991	CSF
4816	C	ET-37 K.	4	2502911	Mali	13.03.1991	CSF
4817	C	ET-37 K.	unbekannt	1604912/12	Mali	25.04.1991	CSF
4819	C	ET-37 K.	unbekannt	0703911	Mali	13.03.1991	CSF
4820	C	ET-37 K.	unbekannt	0504911/5	Mali	12.04.1991	CSF
4821	C	ET-37 K.	unbekannt	0504911	Mali	07.04.1991	CSF
4824	C	ET-37 K.	unbekannt	1103911/6	Mali	14.03.1991	CSF
4825	C	ET-37 K.	unbekannt	0504912/48/B	Mali	16.04.1991	CSF
4827	C	ET-37 K.	unbekannt	010291001/4	Mali	11.03.1991	CSF
4828	C	ET-37 K.	unbekannt	010291002/12	Mali	11.03.1991	CSF
4829	C	ET-37 K.	unbekannt	0504912/39/B	Mali	16.04.1991	CSF
4831	C	ET-37 K.	unbekannt	0803911/2	Mali	18.03.1991	CSF
4832	C	ET-37 K.	unbekannt	07039101	Mali	13.03.1991	Rachen

Material und Methoden

4833	C	ET-37 K.	3	2903911/8	Mali	07.04.1991	CSF
4834	C	ET-37 K.	unbekannt	22039101	Mali	24.03.1991	CSF
4835	C	ET-37 K.	unbekannt	0103912	Mali	13.03.1991	CSF?
4836	C	ET-37 K.	unbekannt	0703911/7	Mali	12.03.1991	CSF
4837	C	ET-37 K.	unbekannt	2502911/10	Mali	06.03.1991	CSF
4839	C	ET-37 K.	unbekannt	1103912	Mali	13.03.1991	CSF
4840	C	ET-37 K.	unbekannt	070291001/14	Mali	11.03.1991	CSF
4841	C	ET-37 K.	unbekannt	0303912	Mali	13.03.1991	CSF
4842	C	ET-37 K.	unbekannt	170291001/6	Mali	20.02.1991	CSF
4843	C	ET-37 K.	unbekannt	170291001/24	Mali	20.02.1991	CSF
4844	C	ET-37 K.	unbekannt	170291001/21	Mali	20.02.1991	CSF
4845	C	ET-37 K.	unbekannt	170291001/42	Mali	20.02.1991	CSF
4846	C	ET-37 K.	unbekannt	170291001/9	Mali	20.02.1991	CSF
4847	C	ET-37 K.	unbekannt	170291001/19	Mali	20.02.1991	CSF
4848	C	ET-37 K.	unbekannt	0703911/2	Mali	12.03.1991	CSF
4849	C	ET-37 K.	unbekannt	1604912/2/B	Mali	25.04.1991	CSF
4850	C	ET-37 K.	unbekannt	170291001/11	Mali	20.02.1991	CSF
4851	C	ET-37 K.	unbekannt	170291001/43	Mali	20.02.1991	CSF
4859	C	ET-37 K.	unbekannt	2111901	Mali	22.01.1991	CSF
4862	C	ET-37 K.	unbekannt	1001914	Mali	22.01.1991	CSF
4872	C	ET-37 K.	unbekannt	0803911	Mali	13.03.1991	CSF
4874	C	ET-37 K.	unbekannt	0103912	Mali	13.03.1991	Rachen
4875	C	ET-37 K.	unbekannt	0703912	Mali	13.03.1991	CSF
4877	C	ET-37 K.	unbekannt	23029101	Mali	13.03.1991	CSF
4878	C	ET-37 K.	unbekannt	2502911	Mali	13.03.1991	Rachen
4879	C	ET-37 K.	unbekannt	1503911	Mali	13.03.1991	CSF
4880	C	ET-37 K.	unbekannt	2803911	Mali	05.04.1991	CSF
4883	C	ET-37 K.	unbekannt	25019101	Mali	10.04.1991	CSF
4885	C	ET-37 K.	unbekannt	17039101	Mali	12.04.1991	CSF
4886	C	ET-37 K.	unbekannt	0404911	Mali	12.04.1991	CSF
4887	C	ET-37 K.	unbekannt	0604911	Mali	12.04.1991	CSF
4890	C	ET-37 K.	unbekannt	1204911	Mali	16.04.1991	CSF
4895	C	ET-37 K.	unbekannt	1804911	Mali	21.04.1991	CSF
4896	C	ET-37 K.	unbekannt	1804912	Mali	21.04.1991	CSF
4897	C	ET-37 K.	unbekannt	19049101	Mali	21.04.1991	CSF
5119	C	ET-37 K.	4	1401901	Mali	14.01.1990	CSF
5743	C	ET-37 K.	4	0904903	Mali	09.04.1990	CSF
6102	C	ET-37 K.	unbekannt	1605911	Mali	06.06.1991	CSF
6128	C	ET-37 K.	unbekannt	2503923	Mali	27.03.1992	CSF
6150	C	ET-37 K.	unbekannt	2403921	Mali	27.03.1992	Rachen
6154	C	ET-37 K.	unbekannt	2403921	Mali	25.06.1992	CSF
6155	C	ET-37 K.	unbekannt	2403921	Mali	27.03.1992	CSF

ET-37 K.: ET-37 Komplex, CSF: Cerebrospinal-Flüssigkeit

Tabelle 2.13: Weitere untersuchte Stämme.

Z-Nummer	Sero- gruppe	Sub- gruppe	Land	Jahr	Neisseria-Spezies	Fall oder Träger	Original bezeichnung
1293	A	IV-2	U.S.A.	1917	N. meningitidis	Fall,CSF	054
1362	A	IV-1	Cameroon	1966	N. meningitidis		243
2491	A	IV-1	Gambia	1983	N. meningitidis	Fall,CSF	C751
2720	A	IV-1	Gambia	1983	N. meningitidis		
3204	A		Gambia	1983	N. meningitidis		
3906	A	III	China	1966	N. meningitidis	Fall	00154
4191			Mali	1990	N. lactamica		2502901G4
4199			Mali	1990	N. lactamica		2502901M11
4200			Mali	1990	N. lactamica		2802903G27
4201			Mali	1990	N. lactamica		2802903D33
4208			Mali	1990	N. lactamica		15039001D31

Material und Methoden

4209			Mali	1990	N. lactamica		15039001G38
4409	A	IV-1	Mali	1990	N. meningitidis	Fall	23039002
4420	A	IV-1	Mali	1990	N. meningitidis	Fall	2904901
4421	A	IV-1	Mali	1990	N. meningitidis	Fall	2059001
4807	unbekannt	andere	Mali	1991	N. meningitidis		0504912/18
4811	C	andere	Mali	1991	N. meningitidis		0504912/30
4812	unbekannt	andere	Mali	1991	N. meningitidis		0504912/3
4813	C	andere	Mali	1991	N. meningitidis		0504912/14
4818			Mali	1991	N. lactamica		0803911/?
4822	C	andere	Mali	1991	N. meningitidis		0504912/67
4823	unbekannt	andere	Mali	1991	N. meningitidis		0504912/62
4830	C	andere	Mali	1991	N. meningitidis		0504912/53
4838			Mali	1991	N. sicca		1604912/8
4860	A	IV-1	Mali	1991	N. meningitidis		18029102
4865	X	E-2	Mali	1991	N. meningitidis		250191001/1
4869	X	E-2	Mali	1991	N. meningitidis		250191001/3
4871	unbekannt	andere	Mali	1991	N. meningitidis		4029101/36
4888			Mali	1991	N. lactamica		0504912/14
4894	unbekannt	andere	Mali	1991	N. meningitidis		0505912/31
5302	C		Mali	1970	N. meningitidis	Träger	3104
5303	X		Mali	1970	N. meningitidis		1970
5312	Y		Mali	1970	N. meningitidis	Träger	1835
5315	unbekannt		Mali	1970	N. meningitidis		3999
5316	unbekannt		Mali	1970	N. meningitidis		886
5317	unbekannt		Mali	1970	N. meningitidis		1628
5318	unbekannt		Mali	1970	N. meningitidis		1888
5319	B		Mali	1970	N. meningitidis		B2092
5460	A	IV-1	Gambia	1983	N. meningitidis		
6132	A	IV-1	Mali	1992	N. meningitidis		3003921
6138	A	IV-1	Mali	1992	N. meningitidis		3003922

CSF: Cerebrospinal-Flüssigkeit

2.12 Medien und Platten

Für *E. coli*:

LB-Flüssigmedium:

10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Bacto Hefeextrakt, 10 g/l NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren (20 min, 121°C). Bei Bedarf werden 50 µg/ml Ampicillin zugefügt.

LB-Agar:

Entspricht LB-Flüssigmedium mit zusätzlich 15 g/l Difco Agar. In Petrischalen jeweils 25 ml gießen und bei 8°C lagern. Antibiotikaplatten enthalten 50 µg/ml Ampicillin.

Für *N. meningitidis*:

25%ige (w/v) Hefeextraktlösung:

250g Hefeextrakt werden in 1 l H₂O bidest. gelöst und gegen 2 l H₂O bidest. über Nacht dialysiert. Die Flüssigkeit außerhalb des Dialyseschlauches wird anschließend autoklaviert und weiterverwendet.

GC-Agar:

36 g/l GC medium base werden 20 min bei 121° C autoklaviert, auf ca. 50° C abgekühlt und folgende sterile Zusätze zugeben: 25 ml/l 25%ige (w/v) Hefeextraktlösung, 100 mg/l L-Glutamin, 300 mg/l L-Cystein, 12,5 ml/l 40%ige (w/v) Glukose, 10 ml/l 0,17% (w/v) Fe(NO₃)₃·9H₂O (sterilfiltriert), 3 mg/l Vankomycin, 7,5 mg/l Polymyxin B Sulfat, 2 mg/l Nystatin. Jeweils 25 ml in eine Petrischale gießen und bei 8° C lagern.

GC-Flüssigmedium:

15 g Proteose Peptone Nr. 3, 1,0 g lösliche Stärke, 5,2 g K₂HPO₄·3H₂O, 1,0 g KH₂PO₄ und 5,0 g NaCl werden in 1 l H₂O bidest. gelöst und 20 min bei 121° C autoklaviert. Es folgt die Zugabe der oben beschriebenen Zusätze.

2.13 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer werden mit zweifach destilliertem H₂O hergestellt.

Für die Lagerung von *E. coli* Bakterien

Einfriermedium: LB Flüssigmedium/Glycerin (87%) im Verhältnis 1:4 gemischt

Für die Lagerung von *N. meningitidis* Bakterien

Magermilch: 100 g/l autoklavierte Magermilch

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *N. meningitidis*

2x Lysis-Puffer: 0.8 M Saccharose, 100 mM Tris, pH 8,0, 4 mM EDTA, pH 8,0, 2% (w/v) SDS
TE-Puffer, pH 8,0: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0
5 M NH₄OAc: 385,4 g/l lösen und sterilfiltrieren

Für die Herstellung von DNA eingebettet in Agarose

EC-Lysierungspuffer:	6 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, pH 8,0, 1% (w/v) N-Laurylsarkosin, 1 µg/ml RNase A
ESP-Puffer:	0.5 M EDTA, pH 8,0, 1% (w/v) N-Laurylsarkosin, 1 mg/ml Proteinase K

Für die Polymerase-Kettenreaktion

10x DMSO:	10 ml reines DMSO, p.A. mit 10 ml H ₂ O bidest. mischen, Endkonzentration 50% DMSO
10x PCR-Puffer:	500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM MgCl ₂ , 0,1% (v/v) Gelatine, Puffer durch 0,2 µm NC-Filter sterilfiltrieren

Für die Reinigung von PCR Produkten mit PEG₈₀₀₀

5M NaCl-Lösung:	20 g NaCl in 100 ml H ₂ O bidest. lösen
40% PEG ₈₀₀₀ :	40 g PEG ₈₀₀₀ in 100 ml H ₂ O bidest. durch Kochen lösen.

Für die Gelelektrophorese von DNA

50x TAE-Puffer für analytische Agarosegele:	242 g/l Tris Base (2 M), 57,1 ml/l Eisessig, 37,2 g/l EDTA (100 mM), pH 8,5
10x TBE-Puffer für Pulsfeld- und Feldinversionsgele:	108 g Tris Base (890 mM), 55 g Borsäure (890 mM), 40 ml 0,5 M EDTA (20 mM), pH 8,0
6x Auftragspuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (w/v) Glycerin oder 0,25% (w/v) Xylenblau, 30% (w/v) Glycerin

Für die Ligation von DNA

10x Ligationspuffer:	660 mM Tris HCl (pH 7,5), 50 mM MgCl ₂ , 10 mM Dithioerythritol (DTE), 10 mM ATP
----------------------	---

Für Southern Blots

Transferpuffer:	0,4 M NaOH
20x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

Für die DIG-Hybridisierung und Chemilumineszenz Detektierung

10x Blockierungs-Lösung:	Mitgeliefertes Blockierreagenz zu einer Endkonz. von 10% (w/v) in Maleinsäurepuffer unter Erhitzen und Schütteln lösen
Waschpuffer 1:	2x SSC, 0,1% (w/v) SDS
Waschpuffer 2:	0,5x SSC, 0,1% (w/v) SDS
Hybridisierungslösung:	5x SSC, 0,1% (w/v) N-Laurylsarkosin, 0,02% (w/v) SDS, 1x Blockierlösung

Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure, 0,14 M NaCl, mit NaOH pH 7,5 einstellen
Detektierungspuffer:	0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂
Stripping-Puffer:	0,2 M NaOH, 0,1% (w/v) SDS

Für die automatische Sequenzierung

10x TBE-Puffer:	108 g Tris Base (890 mM), 55 g Borsäure (890 mM), 40 ml 0,5 M EDTA (20 mM), pH 8,0
40% (w/v) Acrylamid:	30 g Acrylamid/Bis Gemisch (19:1, BioRad) in 48 ml H ₂ O (Millipore) lösen und filtrieren
10% (w/v) Ammoniumpersulfat:	10 g Ammoniumpersulfat in 100 ml H ₂ O bidest. lösen und sterilfiltrieren. Lagerung bei -20° C
Probenladepuffer:	50 mM EDTA (pH 8,0) und Formamid im Verhältnis 1:5 mischen. Formamid über Amberlite M2 30 min rühren und über Faltenfilter filtrieren

2.14 Lagerung und Anzucht von Bakterien

E. coli:

Die Bakterien werden bei -80° C in 1,8 ml Kryoröhrchen (Nunc) in Einfriermedium gelagert. Zum Anlegen einer Stammkultur wurden 5 ml LB-Flüssigmedium (bei Bedarf mit 50 µg/ml Ampicillin) mit einer *E. coli* Einzelkolonie von der Platte angeimpft und über Nacht 16 h bei 37° C inkubiert. Davon wurde 0,9 ml Übernacht-Kultur abgenommen und mit 0,9 ml Einfriermedium gut vermischt. Nach 30 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Glycerinkultur schließlich bei -80° C eingefroren. Diese Glycerinkulturen dienten als Ausgangsquelle für Übernacht-Kulturen oder zum Ausstreichen von Einzelkolonien auf eine LB-Platte.

N. meningitidis:

Zum Anlegen einer Stammkultur wurden Glaskugeln ($\phi = 3$ mm) mit Leitungswasser gespült, mit 0,1 M HCl gewaschen und anschließend wieder mit H₂O bidest. gespült bis der pH-Wert neutral war. Die Glaskugeln wurden autoklaviert (20 min, 121° C), in 1,5 ml Kryoröhrchen transferiert und mit *N. meningitidis*, die von einer GC-Platte in Magermilch resuspendiert waren, benetzt, bevor sie bei -80° C gelagert wurden.

Zum Anlegen einer Übernacht-Kultur wurden unter sterilen Bedingungen auf eine vorgewärmte GC-Agarplatte eine oder mehrere Glaskugeln gebracht, mit 1-2 Tropfen GC-Flüssigmedium aufgetaut und ausplattiert. Die Platten wurden 16 h über Nacht bei 37° C und 70% Luftfeuchtigkeit in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank inkubiert.

2.15 Präparation chromosomaler DNA aus *N. meningitidis*

Nach einer 16 stündigen Inkubation wurden die Neisserien mit einem Objektträger von der Platte geschabt und in 2 ml TE-Puffer pH 8,0 vollständig resuspendiert. Danach erfolgte die Lyse der Bakterien durch Zugabe von 2 ml 2x Lysis-Puffer, Schütteln der Probe bis sich eine homogene Phase ausbildete und eine anschließende 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Ab diesem Schritt war es wichtig, daß die Proben nicht gevortext oder intensiver geschüttelt wurden, um das Scheren der chromosomalen DNA zu verhindern. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion, bei der gleiche Volumenanteile eines Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol 25:24:1 Gemisches zugegeben wurde. Nach vorsichtigem Mischen der Probe bis zur Homogenität wurde die Phasentrennung über Nacht bei 4° C im Kühlschrank durchgeführt. Die obere wäßrige Phase, in der sich die DNA/RNA befand, wurde abgenommen und einer Chloroform-Extraktion unterworfen (Durchführung wie Phenol/Chloroform Extraktion, jedoch nur mit Chloroform/Isoamylalkohol 24:1). Die aus der oberen Phase abgenommene DNA/RNA-Lösung wurde mit 2,5 Volumenanteilen kaltem 96%igem Ethanol ausgefällt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (10 min, 12000 x g, SS34 Rotor) wurde das Pellet nach Abnehmen des Überstandes luftgetrocknet und in 1 ml TE-Puffer pH 8,0 gelöst. Zur Entfernung der RNA wurde der Lösung 50 µl 1 mg/ml RNase (Endkonz. 50 µg/ml) zugesetzt, gemischt und bei 37° C 30 min inkubiert. Nach einer weiteren Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA mit 700 µl 5 M Ammoniumacetat-Lösung (Endkonz. 2 M) versetzt und mit 2,5 Volumenanteilen kaltem 96%igem Ethanol gefällt. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (10 min, 12000 x g, SS34 Rotor) wurde das Pellet nach Lufttrocknen in 1,5 ml TE-Puffer pH 8,0 gelöst.

2.16 Chromosomale DNA Präparation für die Pulsfeld-Gelelektrophorese

Nach einer 14-16 stündigen Inkubation wurden mit einem Glasstab ein Teil der Bakterien von der Platte aufgenommen und in 10 ml 1x PBS zu einer Endkonzentration von 120 (± 10) Klett-Einheiten (5×10^8 Zellen/ml) resuspendiert. Der Zelltiter wurde mit Hilfe eines Klett-Photometers bestimmt. (Die Einheit Klett mißt die Zellzahl der Bakterien über die Streuung des einfallenden Lichtes. Zur genauen Berechnung der Zellzahl muß zunächst eine Eichung erfolgen. Die Einheit Klett und OD stehen nicht in einem linearen Verhältnis zueinander. Die Einheit OD mißt die Zellmasse über die Absorption von einem ausgesendeten Lichtstrahl durch die Zellsuspension bei einem Wellenlängenbereich ungefähr 560 nm.) Nach 10 minütiger Zentrifugation (3000 x g, SS34 Rotor) wurde das Pellet in 42° C warmer 1%iger

Agarose (NEB, embed certified) vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde sofort in 2 x 5 x 10 mm große Blockformen gegeben und 20 min gekühlt. Es folgte eine Inkubation der in den Agaroseblöcken eingeschlossenen Zellen bei 37° C über Nacht in EC-Lysierungspuffer (50 ml pro 10 Blöcke) und nach Pufferwechsel mit ESP-Puffer (2,5 ml pro 10 Blöcke) eine weitere 24 stündige Inkubation bei 50° C. Die Blöcke wurden im letzten Schritt viermal für 30 min in TE Puffer bei 37° C gewaschen. Sie können bei 4° C bis zu 6 Monaten aufbewahrt werden, die DNA degeneriert aber mit der Zeit.

2.17 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Eine Plasmid-DNA Isolierung aus *E. coli* Bakterien erfolgte nach dem "Qiagen Plasmid Mini Protokoll". 15 ml 50 µg/ml Ampicillin enthaltendes LB-Flüssigmedium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und 16 h über Nacht bei 37° C unter Schütteln kultiviert ($OD_{560} = 2,0-2,2$). Die Bakterien wurden bei 4300 x g im SS34 Rotor zentrifugiert und das Pellet in 0,3 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml P2-Puffer, Mischen durch Invertieren und 5 minütiger Inkubation der Probe bei Raumtemperatur wurden 0,3 ml gekühlter P3-Puffer zugegeben, durch vorsichtiges 4-6 maliges Invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Das ausgefallene Material wurde 15 min zentrifugiert (Eppendorf 5415C, 15000 x g) und der Überstand auf eine mit 3 ml QBT-Puffer equilibrierte Quiagen tip-20 Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet an die Säule. Die Säule wurde viermal mit 1 ml QC-Puffer gewaschen, die Plasmid-DNA mit 0,8 ml QF-Puffer eluiert, und das Eluat mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol ausgefällt. Eine 30 minütige Zentrifugation bei 15000 x g (Eppendorf 5414S) und Waschen des Pellets mit 70%igem kaltem Ethanol ergab nach kurzem Trocknen in der Vakuumzentrifuge eine Ausbeute von 10-20 µg Plasmid-DNA. Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer pH 8,0 resuspendiert.

2.18 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia). 1 OD_{260} entspricht einer Doppelstrang-DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA. Bei sauberer DNA liegt das Verhältnis bei $\geq 1,8$.

2.19 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion kann man die DNA aus einem bestimmten Genomabschnitt über eine Million mal vervielfältigen - vorausgesetzt, man

kennt einen Teil der betreffenden Nukleotidsequenz. Synthetisch hergestellte Sequenzteile aus der Umgebung des gewünschten zu amplifizierenden DNA-Abschnittes, sog. Oligonukleotid-Primer, dienen als Startpunkt für die *in vitro*-DNA-Synthese, die von der Taq-DNA Polymerase katalysiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene PCR-Techniken angewandt, die in den folgenden Abschnitten erklärt werden.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt folgendes:

10 µl Matrizen-DNA (20-50 ng), je 10 pmol der beiden Oligonukleotide, 10 µl der vier dNTP's in einer Konz. von je 2 mM (jeweils 200 µM Endkonz.), 10 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer und 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 U). Diese Mischung wird mit H₂O bidest. auf 100 µl aufgefüllt.

Für die Amplifikation von Neisserien-Genen wurde noch 5% DMSO zusätzlich in den Puffer gegeben (10 µl einer 50% DMSO-Lösung per Reaktion).

Die Denaturierung der Matrizen-DNA erfolgte für 1 min bei 94-96° C, die Oligonukleotid-Hybridisierung für 1 min nach Abkühlung auf 50-60° C und die DNA-Synthese für 1 min bei 72° C. Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion nach einer 5 minütigen Inkubation bei 72° C (Auffüllung evtl. noch vorhandener einzelsträngiger Enden) auf 4° C abgekühlt. 5 - 10 µl des PCR Produktes wurden zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

In der Regel wurde dieser typische PCR-Ansatz mit der oben beschriebenen Durchführung angewandt. Falls nicht anders erwähnt wird, gilt er als Standard-PCR-Reaktion.

PCR zur Amplifizierung der Genfragmente für die Sequenzierung

Die Amplifizierung der Genfragmente aus den Meningokokken-Stämmen erfolgte direkt von genomischer DNA über die für jedes Gen (*potF*, *tbpB*, *amiC* und *opaA*) spezifischen Amplifikationsprimer (siehe Tabelle 2.7). Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide betrug 56° C für *tbpB* und 60° C für *potF*, *amiC* und *opaA*.

PCR zur Amplifizierung der *lr*PCR-Produkte für die Restriktionsanalyse

Die vier *lr*PCR-Fragmente für die Nachsequenzierung aus dem Chromosom und für die Restriktionsanalysen wurden mit Hilfe eines Long-Range-PCR-Kits der Firma Perkin-Elmer synthetisiert.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet: je 4 µl Primer (10 pmol/µl) (siehe Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4), 4,8 µl Mg-Acetat (25 mM), 2µl dNTPs (10mM), 30 µl 3,3x PCR-Puffer, 1 µl rTh-Polymerase (2 units/µl) und 52,3 µl H₂O bidest. Mit dem folgendem PCR-Programm wurde amplifiziert: 1 min 94° C, 16x (15s 94° C, 10 min 68° C) und danach 12x (15s 94° C, 10 min 68° C mit einer Verlängerung in jedem

Zyklus um 15s). Abschließend wird der Ansatz noch für 10 min auf 68° C gehalten, um eventuell noch nicht fertiggestellte PCR-Produkte vollenden zu können. 3 µl der Reaktion werden zur Kontrolle der Reaktion auf ein Agarose-Gel auftragen und auf die korrekte Länge und Reinheit überprüft. Als Reinigung folgte eine PEG-Fällung (siehe Kapitel 2.20).

Kolonie-PCR

Die in die verschiedenen Plasmide (Tabelle 2.9) klonierten PCR Produkte wurden direkt mit Hilfe der PCR getestet. Eine *E. coli*-Kolonie wurde in 20 µl H₂O bidest. resuspendiert und davon 5 µl als Matrize mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 2.3 eingesetzt. Gegebenenfalls erfolgte eine Aufreinigung (Kapitel 2.20) und Sequenzierung (Kapitel 2.31) des PCR Produktes.

2.20 Reinigung von PCR Produkten

DNA, die als Matrize in der Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird, muß frei von Oligonukleotiden und anderen Ausgangsprodukten der PCR sein, da es sonst nicht zu einem optimalen Sequenzierungsergebnis kommt. Die DNA soll auch nicht in TE-Puffer gelöst sein, da das darin enthaltene EDTA die in dem PCR Reaktionsgemisch enthaltenen Magnesiumionen komplexiert und die Taq DNA Polymerase in ihrer Enzymreaktion hemmen würde. PCR Produkte wurden meist mit einer PEG₈₀₀₀-Fällung (Embley, 1991) oder automatisch auf dem Rosys-System aufgereinigt, seltener mit den MICROCON-Filtern.

Polyethylenglykol (PEG)-Fällung:

Zur PEG-Fällung wurden 100 µl PCR Produkt mit 60 µl einer frisch hergestellten 20% PEG₈₀₀₀/2,5 M NaCl Lösung auf eine Endkonzentration von 12% PEG₈₀₀₀ und 1,5 M NaCl versetzt und 10 min bei 37° C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation in einer Tischsentrifuge (15.000 x g) für 10 min. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes mit einer Pipette wurde das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen, nochmalig 5 min zentrifugiert (wie oben), das Pellet 2 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 60-80 µl H₂O bidest. gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Automatische Reinigung mit dem Rosys-System:

Die automatische Aufreinigung von PCR-Produkten in 96-Loch-Platten wurde auf einem Rosys-System durchgeführt. Als Prinzip ist hier die Bindung von DNA > 100 bp an eine in der Lösung bewegliche Matrix zu sehen. Die untere Längen-Grenze für diese Aufarbeitung liegt bei 200 bp, die obere bei 200 kb. Es werden ca. 60-80% des eingesetzten PCR-Produkts wiedergewonnen. Die Matrix sind beim Rosys-System mit einem Anionenaustauscher beschichtete Magnetpartikel, genauere Informationen sind

aufgrund patentrechtlicher Geheimhaltung nicht verfügbar. Diese Partikel wurden auf 0,5M EDTA, pH 8,0 eingestellt und 50 µl der PCR-Reaktion mit 10 µl der Magnet-Partikel und 50 µl Hybridisationspuffer (2,5 M NaCl, 20% PEG₈₀₀₀) für 10 min bei Raumtemp. (RT) inkubiert. Die Partikel wurden nach der DNA-Bindung mit einer Magnetplatte an der Wandung fixiert und nach Absaugen der Hybridisationslösung zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Dabei wurden die Partikel durch Umsetzen der Gefäße auf der Magnetplatte durch die Lösung bewegt, so daß ein Wascheffekt (zur Entfernung der unverbrauchten Nukleotide und Primer) eintrat. Nach einer kurzen Trockenzeit (2 min) wurde durch eine pH-Verschiebung mit Hilfe des Elutionspuffers (10mM Tris-Acetat, pH 7,8, 5 min Inkubation bei RT) die gebundene DNA wieder in Lösung gebracht. Nach erneuter Fixierung der Magnet-Partikel wurde die DNA entnommen. Das Rosys-System führte nach der Aufreinigung noch eine Konzentrationsbestimmung aller gereinigten Produkte auf einer 96-Loch Quartz-Küvette (Helma) durch und erstellte ein Meßprotokoll.

Reinigung mit MICROCON-Filtern

Eine weitere Methode der Reinigung von PCR-Produkten ist eine Zentrifugation durch die MICROCON-100 oder -50 Filter. Sie bietet neben der Schnelligkeit der Aufreinigung den Vorteil der gleichzeitigen Entsalzung der PCR-Produkte. Dabei werden wegen der geringen Porengröße nur Nukleotide und Primer durchzentrifugiert, während die PCR-Produkte auf dem Filter verbleiben (Porenausschlußgröße). Für die Aufreinigung wurde ein 100 µl Ansatz mit H₂O bidest. auf 500 µl aufgefüllt und für 8 min bei 6000 rpm in einer Eppendorf 5414S Tischzentrifuge (MC-100) oder 14.000 rpm (MC-50) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und der Filter nochmals mit 500 µl H₂O bidest. gewaschen. Mit ca. 100 µl H₂O bidest. wurde die Membran benetzt und nach kurzem Schütteln das MICROCON-Filter umgedreht in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. Mit einer Zentrifugation mit 3000 rpm für 3 min wurde die gelöste DNA wiedergewonnen. Eine nachträgliche Größenbestimmung für *lr*PCR-Produkte um 10 kb ist nach dieser Aufreinigung nicht mehr möglich, da die DNA leicht geschert wird.

2.21 "Nebulisation" und "end-repair" der *lr*PCR-Fragmente

Um aus großen DNA-Fragmenten kleinere Bruchstücke zu erhalten, die statistisch verteilt sind, kann man die Methode der "Nebulisation" anwenden. Sie funktioniert über die mechanische Scherung von DNA in Lösung mittels Stickstoffeinleitung. Hierzu wird die DNA in einer 25-50%igen Glycerol-Lösung auf Eis mit einem Überdruck von 0,7 bar für 15-20 min behandelt. Dafür war ein spezielles Gefäß nötig, das von der Firma *IPI Medical Products* bezogen wurde. Nach geringfügigen

Änderungen des für Inhalationen gedachten Plastikgefäßes wurde es für die Nebulisation eingesetzt. Hierzu mußte der Plastikonus aus dem Innenteil entfernt, sein Rand abgeschnitten und der Konus umgedreht wieder eingesetzt werden. Außerdem wurde ein Stopfen auf die große Inhalationsöffnung des Deckels gesetzt und der Rand mit Parafilm abgedichtet. Beschrieben ist dieser Vorgang ausführlich unter http://dna1.chem.uoknor.edu/protocol_book/protocol_index.html. Nach der Nebulisierung wurde das Gefäß kurz anzentrifugiert, die verbleibende Flüssigkeit auf vier 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und mit 1/10 Vol. 3M Na-Acetat, pH 4,8 und 2 Vol. 96%igem Ethanol bei -20° C für mindestens 5h gefällt. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 4° C mit 12.000g wurde das Pellet 2x mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschliessend bei 37° C getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 30µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4° C zur vollständigen Auflösung stehen gelassen. Nach einer Kontrolle auf einem Gel (2µl müssen gut sichtbar sein) wurde die restliche Lösung für die "end-repair"-Reaktion eingesetzt. Hierzu wurden die 28µl DNA-Lösung mit 4µl 10x T4-Polymerase-Puffer, 2µl dNTPs (0,25mM), 2µl Klenow-Polymerase (5U/µl), 2µl T4 DNA-Polymerase (3U/µl) und 2µl H₂O für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei dieser Reaktion werden eventuell überhängende Enden der Doppelstränge entweder abgebaut (Klenow) oder aufsynthetisiert (T4-Pol.). Ziel sind völlig glatte Enden aller Fragmente für die folgende Klonierung in den mit *Sma*I geschnittenen, dephosphorilierten pUC19-Vector oder nach einer Inkubation mit dATP und *Taq*-Polymerase zur Erzeugung überhängender Adenosinreste die Klonierung in den TA-Cloning-Vektor pCRTMII.

2.22 Klonierung von PCR Produkten

Zur Klonierung von PCR Produkten wurde meist der TA Cloning[®] Kit von Invitrogen benutzt. Das System nutzt die terminale Transferaseaktivität der *Taq* DNA Polymerase aus, mit der unabhängig von der Matrizen-DNA an beiden 3'-Enden des PCR Produktes ein Desoxy-Adenosin angehängt wird. Diese 3' A-Überhänge paaren sich mit den 3' T-Überhängen des linearisierten Vektors pCRTMII. Die Insertionsstelle liegt auf dem Vektor innerhalb der ersten 146 Aminosäuren des β -Galaktosidase-Gens *lacZ*, dem ein *lac* Promotor vorgeschaltet ist. Zusätzlich gibt es auf dem Vektor Gene für die Ampicillin- und Kanamycinresistenz. Nach Transformation von Bakterien, die den entsprechenden C-terminalen Teil des β -Galaktosidase-Gens kodieren, wird eine Blau-Weiß Selektionierung ermöglicht. Bakterien, die auf dem chromogenen Substrat X-Gal angezogen werden und enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase haben, bilden blaue Kolonien. Diese enthalten kein PCR Produkt auf ihrem Vektor, da das *lacZ* α Fragment

intakt ist. Bei weißen Kolonien ist die Expressierung des *lacZ* α Fragmentes normalerweise durch das aufgenommene PCR Produkt unterbrochen.

Die Ligation wurde über Nacht in 10 μ l Volumen mit 1-2 μ l PCR Produkt, 1 μ l 10x Ligationspuffer, 2 μ l linearisiertem Vektor pCRTMII (50 ng), 1 μ l T4 DNA Ligase (1 U) und 4-5 μ l H₂O bidest. bei 16° C durchgeführt. PCR Produkt und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Die Menge des PCR Produktes wurde auf einem Gel abgeschätzt.

Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte mittels Elektroporation in die mitgelieferten elektrokompenten *E. coli* INV α F' Zellen ("One shot competent cells"). Bei der Elektroporation wird der Zell-DNA-Lösung ein Stromstoß versetzt, dabei öffnet sich die Zellmembran und lässt die DNA in die Zelle eindringen. Die Zellen haben eine Transformationseffizienz von 10⁸ Transformanten pro μ g zirkulärer Plasmid-DNA. 50 μ l auf Eis aufgetaute kompetente Zellen wurden mit 2 μ l 5 M β -Mercaptoethanol und 1 μ l Ligationsansatz vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis gehalten. Der Ligationsansatz wurde zu 40 μ l XL1-Blue Zellen gegeben, 30 sec auf Eis inkubiert und dann elektroporiert. Die Zeitkonstante lag bei 5,0-5,4 milli-sec. Sofort wurden 1 ml SOC-Medium zugegeben, alles in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37° C inkubiert. Parallel dazu wurden 50 mg/ml Ampicillin enthaltende LB-Platten (LB-Amp⁵⁰) mit 50 μ l einer X-Gal-Lösung (20 mg/ml X-Gal in DMF) beschichtet und dann 25-100 μ l Aliquots des Transformationsansatzes ausplattiert und mindestens für 18 h bei 37° C inkubiert. Zur besseren Unterscheidung von weißen und blauen Einzelkolonien folgte eine zweistündige Inkubation bei 4° C. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden die erhaltenen Einzelkolonien gezählt. Weiße Einzelkolonien wurden gepickt und die Transformanten mit einer Kolonie-PCR auf das erwartete Insert untersucht.

Diverse PCR-Produkte wurden auch in den von Pharmacia mit *Sma*I bereits vorgeschrittenen und dephosphorylierten Vektor puC19 kloniert. Dazu wurden die PCR-Produkte ohne eine Weiterbehandlung direkt nach der Reinigung eingesetzt, da hier eine Ligation über die stumpfen Enden der *Sma*I-Schnittstelle und dem PCR-Produkt erfolgt. Die Ligation erfolgte analog zum TA-Klonieren bei 16° C über Nacht, die weitere Behandlung war identisch.

2.23 Restriktionsansätze

Die Wahl der Restriktionsendonukleasen-Puffer und Inkubationstemperatur für jedes Enzym richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers (siehe Tabelle 2.1).

Restriktion der *lr*PCR Produkte

Die Restriktion der *lr*PCR Produkte für die Analyse der Varianten erfolgte über Nacht in 20 µl Volumen. Ein Ansatz bestand aus folgender Zusammensetzung: 2 µl 10x Restriktionsendonukleasen-Puffer, 1-2 U Restriktionsenzym und 1 µg (3-10 µl) *lr*PCR Produkt. Nach der Restriktion wurden 3 µl Probenauftragspuffer zu dem Ansatz gegeben und 10 µl davon auf einem 1,2%igem Agarosegel analysiert.

Restriktion von chromosomaler DNA

Für Analyse von chromosomaler DNA nach ihrer Präparation wurde 1 µg DNA mit 5-10 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl restringiert. Die Inkubationszeit betrug 3 h mit den in Tabelle 2.1 angegebenen Enzymen. Die Fragmente wurden auf 1%igen Agarose-Gelen analysiert.

Restriktion von in Agaroseblöcke eingebetteter chromosomaler DNA

Für die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurden die DNA-Proben speziell vorbereitet, um möglichst jede Scherung des Ausgangsmaterials zu vermeiden. Dazu wurde ein Viertel Block in Agarose eingebettete chromosomale DNA (Kapitel 2.15) mit 500 µl 1x Restriktionsendonukleasen-Puffer 15 min bei Raumtemperatur equilibriert. Nach Austausch des Puffers mit 100 µl frischem 1x Restriktionsendonukleasen-Puffer folgte die Zugabe von 10 U *NheI*, 5 U *SpeI*, 5 U *PacI*, 10 U *BglIII*, 5 U *PmeI*, oder 5 U *SgfI* und die Inkubation bei 37° C über Nacht. Die Reaktion wurde mit 500 µl 0,5x TBE gestopt und die Flüssigkeit mit einer Pipette vollständig abgenommen.

2.24 Agarosegelelektrophorese

Unter elektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen der Nucleinsäuren ionisiert und die Polydesoxynucleotide liegen als Polyanion vor. Sie bewegen sich somit im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und ihre Beweglichkeit hängt weitgehend von der Molekülgröße ab. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA Fragmente wurden verschiedene Elektrophorese-Techniken angewandt.

Zur analytischen Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten zwischen 40 bp und 5 kb wurden je nach Größenzusammensetzung 0,8%ige bis 2%ige Agaroseflachgele und für chromosomale DNA 0,7%ige Gele verwendet. Die Größe der Gele betrug 13 x 7,5 cm. Hierfür wurden 0,8 bis 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer eingewogen und im Mikrowellenherd bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Pro Gelkammer, die zuvor mit einem Kamm bestückt worden war, wurden nach Abkühlen der Agaroselösung auf 60° C 50 ml gleichmäßig hineingegossen. Nach Erstarren ist das Gel mit etwa 150 ml 1x TAE-Puffer überschichtet worden. Die Elektrophorese erfolgte mit ca. 6-7 V/cm über eine Zeitspanne von ungefähr 1 h.

2.25 Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE)

Zur Trennung von großen DNA Fragmenten (25-50 kb) wurde das *FIGE Mapper Elektrophorese System* (Biorad) verwendet. Die Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE) kann DNA Fragmente zwischen 100 bp und 200 kb effektiv auftrennen. Dies beruht auf den Gebrauch von hohen Volt-Gradienten und kurzen periodischen Schaltzeiten zwischen zwei Elektroden (180° Orientierungswinkel), wie sie in einer konventionellen Gelkammer vorliegen. Die Polarität des Feldes wird dabei ständig verändert.

Zur analytischen und präparativen FIGE wurde ein 1%iges Agaroseflachgel (SeaPlaque GTG, FMC) mit einer Größe von 15 x 15 cm verwendet. Die Elektrophorese wurde über 20 h in 0,5x TBE Puffer mit einer Feldstärke von 180 V vorwärts und 120 Volt rückwärts durchgeführt. Die Schaltintervalle betragen 0,4-0,8 s mit linearem Anstieg.

2.26 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurde Anfang der 80er Jahre entwickelt. Schwartz zeigte, daß die Trennung von Hefe Chromosomen (einige 100 kb groß) im Gel von den Zeitintervallen eines alternierenden elektrischen Feldes abhängig ist (Schwartz and Cantor, 1984). Der Reorientierungswinkel im elektrischen Feld (d.h. der Winkel, der ein Molekül sich bei einem Wechsel des Feldes angleichen muß) ist im Gegensatz zum FIGE variabel.

Zur Durchführung der PFGE wurde das *PulsaphorTM*-System von Pharmacia verwendet. Dies ist eine CHEF (*contour clamped homogenous electric field*) Apparatur, bei der eine hexagonale Elektrode verwendet wird. Die angelegte Spannung wird dabei so zwischen den Elektroden aufgeteilt, daß die Feldstärke über das gesamte Gel konstant ist. Der Reorientierungswinkel ist dabei auf 60° oder 120° festgelegt. CHEF hat den Vorteil, viele DNA Proben gleichzeitig trennen zu können. Als Gel wurde ein 1%iges 15 x 15 cm großes Agarosegel (Seakem GTG, FMC) verwendet. Je nach Art des Kammes wurden 23 oder 12 DNA Proben gleichzeitig analysiert.

Ein Viertel Agaroseblock mit restringierter DNA (Kapitel 2.16) wurde geschmolzen (65° C, ca. 10 min) und davon 10 µl auf das Gel geladen. Die Elektrophorese fand mit einer konstanten Eingangsspannung von 165 V bei 10° C in 0,5x TBE Puffer statt. Die Zeitintervalle stiegen über 16 h kontinuierlich von 6 s auf 13 s und dann über weitere 8 h von 13 s auf 30 s an.

2.27 Anfärben und Photographie von DNA-Banden in Agarosegelen

Nach dem Elektrophoreselauf wurden Agarosegele in einer 5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung 10-15 min angefärbt und das Bandenmuster unter 260 nm UV-Licht mit Hilfe von Polaroid Fotos oder einer Videokamera dokumentiert.

2.28 Fixierung von DNA an Nylon Membranen (*Southern Blot*)

Das Pulsfeldgel wurde zur Spaltung der in Agarose eingeschlossenen DNA in 0,25 M HCL 20 min geschüttelt, und kurz mit H₂O bidest. abespült. Die DNA-Übertragung auf eine Hybond N⁺ geladene Nylon Membran erfolgte durch Kapillarkräfte. Hierfür wurde die Membran auf ein feuchtes 16 x 16 cm großes 3 MM Filterpapier gelegt, das auf einem 10-12 cm hohen Stapel von Papiertüchern lag. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit drei 3 MM Filterpapieren abgedeckt. Auf den Aufbau wurde ein zweilagiges 20 x 45 cm großes 3 MM Filterpapier gelegt, das mit seinen Enden in den Transferpuffer (0,4 M NaOH) eintauchte. Eine Glasplatte (0,5 kg) beschwerte den Aufbau. Der Transferpuffer wurde durch die Papiertücher angesaugt und dabei die DNA aus dem Gel auf die Membran transportiert und dort gebunden. Nach 2-3 h Transferzeit wurde die Membran 2 min in 2x SSC Puffer gewaschen und zwischen zwei 3 MM Filterpapieren 1 h bei 80° C gebacken, wodurch sich die DNA irreversibel kovalent mit der Membran verband. Die Membran konnte nun für die DIG-Hybridisierung eingesetzt werden.

2.29 DIG-Markierung von doppelsträngiger DNA

Durch den Einbau von DIG-11-dUTP anstelle von dTTP in einer PCR-Reaktion können die Produkte sehr sensitiv markiert werden.

In dieser Arbeit wurde zur direkten Markierung einer Probe der DIG PCR Proben Synthese Kit benutzt. Die PCR Reaktion unterschied sich hinsichtlich einer anderen PCR nur in der Zugabe des mitgelieferten dNTP Gemisches, der DIG-11-dUTP zu dTTP in einem Verhältnis von 1:2 enthielt. Die Amplifizierung erfolgte in einer Standard-PCR Reaktion (Kapitel 2.19.). Das DIG-markierte PCR Produkt wurde mit der PEG-Fällung aufgereinigt und die DNA Konzentration bestimmt.

Zur genauen Quantifizierung der Effektivität der DIG-Markierungsreaktion wurde die DIG-markierte Probe mit einer im Kit mitgelieferten Standardprobe verglichen. Hierzu wurde 1 µl Kontroll-DNA mit einer Konzentration von 1 ng/µl in 1:10 Verdünnungsschritten auf eine Hybond-N⁺-Membran aufgetropft. Die Endkonzentration der Kontrollspots betrug 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,1 pg und 0,01 pg. 1 µl DIG-PCR Probe wurde ebenfalls in 1:10 Verdünnungsschritten auf

dieselbe Membran aufgetragen. Der visuelle Vergleich nach Detektierung zeigte, daß bei allen hergestellten DIG-PCR Proben die Intensität vergleichbar bis 0,1 pg/ μ l der Kontroll DNA war. Damit ergab eine Konzentration von ca. 1 ng/ μ l der PCR markierten DNA.

2.30 Spezifische DNA-Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung und Detektierung spezifischer DNA-Proben erfolgte mit dem DIG-System von Boehringer Mannheim. Bei der Detektierung wurde in die Chemilumineszenz Methode benutzt, mit der ein Lichtsignal auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann. Bei dem DIG-System wird das Steroid Digoxigenin verwendet, welches über ein Brückenarm an der Sonde (Oligonukleotid oder PCR Produkt) gebunden ist. An die markierte Sonde bindet ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Digoxigenin Antikörper. Das Signal wird schließlich durch chemilumineszente Phosphatase Substrate erzeugt.

Hybridisierung mit einer DIG markierten DNA Probe

Nach Fixierung der DNA auf der 16 x 16 cm großen Nylon Membran erfolgte unter leichtem Schütteln bei 68° C 2 h die Vorhybridisierung in einer Plastiktasche oder Glasröhren mit 50 ml DIG-Hybridisierungslösung. Das gereinigte DIG markierte PCR Produkt wurde 5 min bei 96° C denaturiert und der Lösung zu einer Endkonzentration von 5 bis 10 ng/ml zugegeben. Nach 12-14 stündiger Inkubation bei 68° C unter leichtem Schütteln wurde die Membran zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit 200 ml Waschpuffer 1 und weitere zweimal 15 min mit 200 ml Waschpuffer 2 bei 68° C zur Beseitigung unspezifisch gebundener DNA gewaschen.

Detektierung von DIG markierten PCR Produkten

Die zur Chemilumineszenz-Detektierung erforderlichen drei Schritte wurden bei Raumtemperatur in einer Plastikschielle durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 1 min in Maleinsäurepuffer equilibriert und 1 h in 50 ml Blockierlösung leicht geschüttelt. Der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-DIG-Antikörper wurde 1:10.000 in 40 ml Blockierlösung verdünnt und die Membran weitere 30 min in der Antikörperlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 15 min mit Maleinsäurepuffer und einer 2-minütigen Equilibrierung der Membran in DIG-Detektierungspuffer erfolgte die Zugabe des Substrates CSPD. Hierzu wurde die Membran in eine Plastiktasche oder Glasröhre überführt und das 1:100 verdünnte Substrat in 5 ml DIG-Detektierungspuffer zugegeben. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Lösung entfernt, die Membran weitere 10 min bei 37° C inkubiert und auf einen Röntgenfilm 10-20 min exponiert. Die Filmentwicklung erfolgte nach den Vorschriften der Hersteller.

Wiederaufarbeitung der markierten Membran

Zur wiederholten Hybridisierung und Detektierung wurde die Membran kurz in H₂O bidest. gespült und zweimal 20 min in Stripping-Puffer bei 37° C geschüttelt. Nachdem die Membran in 2x SSC Puffer kurz gewaschen wurde, stand diese wieder sofort zur Hybridisierung zur Verfügung, bzw. konnte nach Trocknen bei 4° C gelagert werden.

2.31 Sequenzierung

Seit 1986 bietet Applied Biosystems ein automatisiertes Elektrophorese- und Detektierungssystem an, das mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte DNA Moleküle detektiert und analysiert.

Der Prozeß der automatischen Sequenzierung besteht aus der Aufreinigung der zu sequenzierenden DNA wie PCR-Produkte, Plasmide und genomische DNA, der Sequenzierungsreaktion, der elektrophoretischen Auftrennung und Detektierung der Banden und anschließende Analyse der Sequenzabfolgen mit Hilfe von Computerprogrammen. Das Prinzip der Sequenzierungsreaktion besteht aus der Durchführung einer linearen PCR, bei der nur ein Oligonukleotid eingesetzt wird und der Abbruch der Strangpolymerisation zufällig durch ein mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiertes ddNTP erfolgt. Dies hat zur Folge, daß es während der Polymerisation an jeder Nukleotidposition statistisch zum Abruch kommt und daraus die DNA-Sequenz ermittelt werden kann.

Sequenzierungsreaktion:

Eine typische Sequenzierungsreaktion fand in 20 µl Volumen statt und enthielt 10 pmol Oligonukleotid, 20-300 ng Matrizen-DNA und 4 µl ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Dieser Kit ist eine Mischung aus den markierten ddNTP's, dNTP's, AmpliTaq DNA Polymerase FS und MgCl₂ (Endkonzentration 1 mM). Tabelle 2.6 gibt die Menge an eingesetzter Matrizen-DNA in Abhängigkeit von der Größe an.

Typ der DNA	Größe	Eingesetzte Menge
PCR Produkt	300 bp	30 ng
PCR Produkt	500 bp	40 ng
PCR Produkt	700 bp	50 ng
PCR Produkt	800 bp	60 ng
PCR Produkt	1 kb	80 ng
PCR Produkt	2 kb	120 ng
PCR Produkt	3 kb	150 ng
PCR Produkt	6 kb	600 ng
Plasmid	6 kb	600 ng
Genom	2,2 Mb	5 µg

Tabelle 2.14: **Eingesetzte DNA Menge in der Sequenzierungsreaktion in Abhängigkeit von der Größe.**

Der Reaktionsansatz wurde in einem Perkin-Elmer Cetus Typ 2400 oder 9600 PCR Gerät bei folgenden Temperaturzyklen durchgeführt: Denaturierung der Matrizen-DNA bei 98° C für 10 s, Anlagerung der Primer bei 40-60° C für 5 s und Strangsynthese bei 60° C für 4 min. Nach 25 Zyklen wurde die Reaktion durch Kühlen auf 4° C abgebrochen. Die Hybridisierungstemperatur betrug 3-5° C weniger als die ermittelte Schmelztemperatur des Oligonukleotids. Diese wurde entweder thermodynamisch (Breslauer *et al.*, 1986) oder bei Oligonukleotiden zwischen 15-20 bp Länge durch die 2 + 4 Regel ermittelt. ($T_m = 2^\circ \text{C} \times [\text{Anzahl (A, T)}] + 4^\circ \text{C} \times [\text{Anzahl (G, C)}]$). Oligonukleotide mit einer Schmelztemperatur über 65° C wurden trotzdem bei 60° C hybridisiert.

Aufreinigung des Sequenzierungsproduktes:

Die Aufreinigung des Sequenzierungsproduktes erfolgte durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 60 µl 96%igen Ethanol mit anschließender Zentrifugation (Eppendorf 5416, 1700 x g) für 45 min bei 20° C. Der Überstand wurde verworfen und die gefällte DNA mit 200 µl 70%igen Ethanol durch nochmalige 15 minütige Zentrifugation gewaschen. Das Pellet wurde 2-4 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 2 µl Probenladepuffer für die Elektrophorese gelöst.

Gelelektrophorese in der Sequenzierung:

Nachdem ein 4,75%iges Polyacrylamidgel im Applied Biosystems Model 377A 15 min vorgewärmt wurde, erfolgte die Auftragung von je 2 µl der Proben mit Hilfe einer 8-Kanal Hamilton-Pipette auf das Gel. Auf einem Gel mit 72 Spuren konnten 64 Sequenzierungsreaktionen aufgetragen werden, in den Spuren 0 und 65 liefen 2 Plasmid-Standards als Kontrolle. Die Elektrophorese wurde bei 30-31 W (1500 V, 20 mA) für 4-6 h durchgeführt, bei gleichzeitiger Detektierung der Fragmente durch Laseranregung.

Die Gellösung für das 4,75% Polyacrylamidgel setzte sich aus 30 g Harnstoff, 7,1 ml 40%ige Acrylamid/Bislösung (19:1), 6 ml 10x TBE-Puffer und 25,4 ml Millipore H₂O zusammen, die 10 min entgast wurde. Nach Zugabe von 24 µl TEMED und 180 µl 10%igem APS polymerisierte die Lösung 2 h zwischen den mit Alconox-gesäuberten ABI377A-Sequencer-Glasplatten. Die Gel-Stärke betrug 0,3 mm.

2.32 Computeranalyse der erhaltenen Sequenzdaten

Jede weitere Analyse erfolgte nur noch *in silico*, d.h. auf dem Computer. Dazu mußten die Daten auf verschiedenen Computersystemen wie MacIntosh, UNIX und Windows95 bearbeitet werden. Ein Austausch der Daten wurde über ein Ethernet-Netzwerk bewerkstelligt.

2.32.1 Bearbeitung der Rohsequenzen

Die von dem ABI 377A System automatisch ermittelten Rohsequenzen wurden auf einem Apple PowerMac 8600/200 mit den von Applied Biosystems angebotenen DNA Analyseprogrammen "Sequence Analysis" (Version 3.0, 1996) und der "ABI Prism 377XL Collection" (Version 2.0, 1996) bearbeitet und korrigiert. Diese so auf dem Macintosh erhaltenen Daten wurden dann auf das UNIX-System übertragen und mit Hilfe des im Sanger-Center entwickelten Programm-Packets ASP (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Sequencing/ASD/programs.shtml>) bearbeitet. ASP erstellt aus den ABI-Daten die SCF- (enthalten die Sequenzkurven der Probe) und EXP-files (enthalten die Information über die Probe wie Vektorname, Primer u.a.), markiert enthaltene Vektorsequenzen über einen Vergleich mit den eventuell verwendeten Sequenzierungs- und Klonierungsvektoren und vergibt Qualitätspunkte für jede einzelne Base, die bei dem Zusammenbau verschiedener Sequenzläufe herangezogen werden können. Mit dem Programm GAP4 (Versionen 4.0 bis 4.3, STADEN-Package, (Staden, 1996)) werden dann die einzelnen Sequenzläufe zu größeren Einheiten, den sog. *Contigs*, zusammengesetzt.

Dazu wurden alle zu einem DNA-Stück gehörenden Reaktionen in eine GAP4 Datenbank eingelesen und auf eine Überlappung der Sequenzläufe untereinander geprüft. Dabei wurden Fehlstellen und nicht zueinander passende Basen automatisch markiert, es erfolgte selbstständig eine Korrektur mit Hilfe von den Basen zugeordneten Qualitätswerten bei fraglichen Baseneinträgen bei der Erstellung der Konsensus-Sequenz der *Contigs*. Diese Korrekturen wurden dann per Hand kontrolliert und bei fraglichen Stellen nachgebessert.

Mehrere dieser *Contigs* konnten entweder per Hand oder mit Hilfe von Suchfunktionen für Überlappungen vereinigt werden. Die Konsensus-Sequenzen wurden aus GAP4 im Fasta-Format exportiert, um sie weiter analysieren zu können. Die Analyse konnte weiter auf der UNIX-Plattform oder ggf. nach Konvertierungen auf der Windows95-Ebene erfolgen.

2.32.2 Analyse der Konsensus-Sequenzen

Die Konsensus-Sequenzen wurden mit Hilfe folgender Programme untersucht:

UNIX-Plattform:

Das GCG Packet (Version 9, 1997) wurde zur Erstellung von Alignments zweier oder mehrerer Sequenzen (GCG-Unterprogramme: BESTFIT, PILEUP, PRETTY) und Analyse von Sequenzpolymorphismen (TRANSLATE, PILEUP) verwendet; ebenso zur Darstellung verwandschaftlicher Beziehungen zwischen verschiedenen Stämme

(PILEUP, DISTANCES). Das Programm MIROPEATS diente der Analyse repetitiver Elemente in den *Contigs* und als Hilfe für den Zusammenbau verschiedener *Contigs*.

Windows95-Ebene:

PRIMER PREMIER 4.0 wurde für die Auswahl der Sequenzprimer verwendet, DNAMAN (Version 2.2 und 4.0) diente zur Analyse von Restriktionsschnittstellen, HAPLOT zur graphischen Darstellung von Sequenzpolymorphismen. MACAW wurde für die vergleichenden Analysen verschiedener *Contigs* aus *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* verwendet. Phylogenetische Untersuchungen erfolgten mit dem Program MEGA Version 1.02. Das Programm PSFIND wurde zur Konvertierung der von dem GCG-Program PILEUP (UNIX) erzeugten MSF-Dateien in das MEGA-Dateiformat benutzt. DNASP 3.0 wurde für die Errechnung der Ks/Ka-Werte verwendet. Die graphische Darstellung von Verwandtschaften erfolgte mit SPLITSTREE.

Internet-Anwendungen:

Alle gefundenen DNA- und Protein-Sequenzen wurden mit Hilfe der Internetanwendungen BLAST, PSI-BLAST, ORF-Finder und PSORT untersucht. Als Datenbanken wurden die NCBI-Genbank und die laufenden Genomsequenzierungen der Stämme *N. meningitidis* Z2491 sowie *N. gonorrhoeae* FA1090 verwendet. (siehe Kapitel 2.8, Seite 35)