

3 Material und Methoden

3.1 Versuch 1: Fallstudie zum Vorkommen pathogener *E. coli* beim Ferkel

Anhand dieser Fallstudie sollte das PCR-System hinsichtlich des Einsatzes bei Bakterienisolaten optimiert und getestet werden. Zusätzlich diente sie als beispielhafte Übersicht über die Verteilung der Pathogenitätsfaktoren insbesondere adhäsiver *E. coli* im Darmtrakt eines Absetzferkels mit schwerer Diarrhoesyndromatik.

3.1.1 Tierbestand und Fütterung

Zur Untersuchung des Vorkommens pathogener *E. coli*-Bakterien wurde ein Hybridferkel eingesetzt, das am 14. Lebenstag ein Ergänzungsfutter für Saugferkel und ab dem 28. Lebenstag ein Ferkelaufzuchtfutter erhielt (siehe Tabelle 2). Bis zum Absetzen wurde das Tier im klimatisierten Abferkelstall und danach mit mehreren Tieren gemeinsam in einer Box mit Stroh-Tiefstreu gehalten. Zum Zeitpunkt der Probenahme zeigte das Ferkel Anzeichen einer schweren, wässrigen Diarrhoe bei sonst ungestörtem Allgemeinbefinden.

Tabelle 2: Versuchsdiäten und ermittelte Nährstoffgehalte

Komponenten, g/kg	Sauenfutter	Ergänzungsfutter für Saugferkel	Ferkelaufzuchtfutter
Gerste	379	-	-
Weizen	360	527.53	646.11
Sojaextraktionsschrot	180	270	260
Sojaöl	30	25	25
Weizenkleie	-	15	20
Magermilchpulver	-	120	-
Mineralstoff-Vormischung*	20	15	13
Cephcaphos**	7	-	13.9
Dicalciumphosphat	-	12.94	-
Kohlensaurer Futterkalk	18	9.97	17.2
L-Lysin	4	1.83	2.61
DL-Methionin	1	1.61	1
Tryptophan	-	0.72	0.57
Threonin	1	-	0.08
Optilac-Duplex	-	0.4	5.6
Trockenmasse (g/kg)	900.8	905.1	901.3
ME (MJ/kg)	13.4	13.9	13.6
Rohprotein (g/kg)	198.6	234.6	202.3
Rohfett (g/kg)	23.9	18.8	41.5
Rohfaser	47.8	38	36.9

*Inhaltsstoffe je kg: 1200.000 IE Vit. A, 120.000 IE Vit. D₃, 4.000 mg Vit. E, 200 mg Vit. B₁, 600 mg Vit. B₂, 2.500 mg Niacin, 400 mg Vit. B₆, 4500 µg Vit B₁₂, 20.000 µg Biotin, 1800 mg Pantothersäure, 160 g Na, 50 g Mg, 10.000 mg Zn, 7.500 mg Fe, 7.500 mg Mn, 150 mg J, 70 mg Co, 40 mg Se

** Monocalciumphosphat

3.1.2 Diagnostische Schlachtungen und Probengewinnung

Das Ferkel wurde am 35. Lebenstag nach der Sedation mit Stresnil (Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) durch eine intrakardiale Injektion mit T61 (Hoechst-Roussel Vet., Frankfurt, Deutschland) getötet. Der Darmtrakt wurde entnommen und in Duodenum, Jejunum (drei gleichlange Abschnitte), Ileum, Caecum und Colon geteilt. Der in Abschnitten entnommene, eröffnete und entleerte Darm wurde für 30 min in einem Minimalmedium (s. Anhang) gewaschen. Die Mucosa wurde unter Einsatz eines Vortex-Gerätes mit Minimalmedium gemischt, die Suspension in log₁₀-Verdünnungen auf Mc Conkey Agar Platten ausgestrichen und für 20 Stunden bei 37 °C aerob inkubiert.

3.1.3 DNA-Präparation

Dem Mc Conkey Agar wurden 93 violette, Lactose positive Kolonien mit Metallglanz entnommen, in sterilem Wasser gelöst, im Wasserbad für 5 min gekocht und bei 13000 x g für 5 min zentrifugiert. Ein µl Überstand wurde als Probe in die Multiplex PCR eingesetzt.

3.1.4 Bakterienstämme

Als Positiv- und Negativkontrollen für die Optimierung der PCR-Methodik dienten insgesamt 16 *E. coli*-Stämme (Tabelle 3), die freundlicherweise das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin und das Bundesgesundheitsamt für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Dessau zur Verfügung stellten.

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme für PCR Optimierungen

Herkunft	Serovar	Pathogenitätsfaktoren (Gen)	Bezogen von
Mensch.	O126:H27	astA	Institut f. Mikrobiologie und Tierseuchen FU-Berlin
Mensch.	O157:H-	eae, hlyEHEC	
Mensch.	O127:H6	eae	
Mensch.	O78:K80:H11	est-I, elt-Ia, astA	
Mensch.	O111:H-	stx	
Kalb	O78:K80	stx , cnf	
Schwein	O138:K81	stx2e, est-Ib, est-II, fedA, hlyA	
Rind	O78	elt-1	
Schaf	O78:K80	-	
Mensch	O3:H2	astA, hlyA	
Schwein	O149:K91	fae, fas, est-Ib, elt-Ia, astA, hlyA	
Kalb	O91:K-	est-I, elt-Ia, hlyA	
Kalb	O101:H-	fan, fimf41, est-Ia	
Schwein	O147:K89:K88	fae, est-II, elt-Ia	
Rind	O9:K35:K99	est-Ib, fan, fimf41	
Ferkel	CS2011	fas, est-Ib, est-II	

Gen	Codierender Faktor	Gen	Codierender Faktor
<i>astA</i>	hitze stabiles Enterotoxin d. enteroagg. E.coli	<i>stx2e</i>	Shiga-like Toxin II (edema disease)
<i>eae</i>	Intimin	<i>cnf</i>	Cytonekrose Faktor
<i>hlyEHEC</i>	Hämolysin d. enterohämorrh. E.coli	<i>fedA</i>	F18 (Fimbrium)
<i>hlyA</i>	Alpha-Hämolysin	<i>fan</i>	F5 (Fimbrium)
<i>est-Ia/b</i>	hitze stabiles Enterotoxin I (StaP)	<i>fae</i>	F4 (Fimbrium)
<i>est-II</i>	hitze stabiles Enterotoxin II (Stb)	<i>fas</i>	F6 (Fimbrium)
<i>elt-Ia</i>	hitze labiles Enterotoxin	<i>fimf41</i>	F41 (Adhesin)
<i>stx</i>	Shiga-like Toxin		

Die Reinkulturen der *E. coli*-Referenzstämme wurden in je 40 ml LB-Flüssigmedium bei 37 °C für 20 Stunden aerob inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Boullion bei 4000 x g, 4 °C für 15 min in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml sterilem Wasser gelöst und in ein steriles 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt.

In der THOMA-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Suspensionen auf einen Zellgehalt von $2 \cdot 10^9$ Zellen \cdot ml⁻¹ eingestellt. Wie bei den Proben wurde ein Mikroliter des nach Hitzedenaturierung und Zentrifugation erhaltenden Überstandes als Kontrolle in die PCR eingesetzt

3.1.5 Primerselektion und Multiplex PCR

Alle Primer (Tabelle 4) sind in der Literatur beschrieben (Bosworth und Casey, 1997), und deren Sequenzen wurden mit einer PC-Software zur Sequenzanalyse (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool) auf eventuelle Homologie zu anderen Spezies überprüft. Die Produktlängen differieren, um den Nachweis mittels der Agargelelektrophorese zu ermöglichen. Die Synthese wurde von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland durchgeführt.

Tabelle 4: Primersequenzen

Gene für Virulenzfaktoren	Primer	Sequenz (5'-3')	Produktgröße [bp]
<i>est-Ib</i>	StaP-1	CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT	158
	StaP-2	TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG	
<i>est-II</i>	STb-1	TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT	113
	STb-2	CTC CAG CAG TAC CAT CTC	
<i>fan</i>	F5-1	AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA	230
	F5-2	AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT	
<i>elt-Ia</i>	LTI-1	GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT	272
	LTI-2	TGG TCT CGG TCA GAT ATG T	
<i>fedA</i>	F18ab-1	TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA	313
	F18ab-2	ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG	
<i>fas</i>	F6-1	AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC	409
	F6-2	GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC	
<i>fae</i>	F4-1	GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG	499
	F4-2	GAA TCT GTC CGA GAA TAT CA	
<i>fimf41a</i>	F41-1	AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG	612
	F41-2	CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC	
<i>stx2e</i>	STX2e-1	AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT	733
	STX2e-2	TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC	

Die PCR wurde in 24 µl Reaktionsansätzen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt: 12,5 µl Hot Star Taq Master Mix (Quiagen, Hilden, Deutschland), 1,5 µl von jeder 10 µM Primerlösung und 8,5 µl steriles Wasser. Ein µl Template-DNA wurde zugegeben und die folgende ‚Touchdown‘-PCR wurde in einem Personal Cycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt: 15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,4 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 1 sec/Zyklus); 25 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 1 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.

Die PCR-Produkte wurden als 10 µl-Aliquots mit 3 µl Ladepuffer gemischt, auf ein 2%iges Agarosegel, das mit SybrGreen® (Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) in einem Verhältnis 1:10⁴ versetzt wurde, gegeben und bei 3 V cm⁻¹ der Elektrophorese unterzogen.

3.1.6 Digoxigenin-markierte Oligonukleotidsonden

Die Sonden wurden in Hinblick auf die Sequenzen der PCR-Amplifikate, der Länge, des GC-Gehaltes, der T_m-Werte mittels einer PC-Software zur Sequenzanalyse (primer3, Rozen und Skaletsky, 1998) auf der Basis veröffentlichter Gensequenzen (BLAST, Altschul *et al.*, 1990) in dieser Arbeit entworfen. Die 3`-Digoxigenin-markierten Sonden wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

Tabelle 5: Sequenzen der DIG-markierten Oligonukleotidsonden

Spezifität	Basen	T _m (°C)	Sondensequenz (5´-3´)	T _{HYB} (°C)
<i>est-Ib</i>	23	57,1	TGC TGT GAA CTT TGT TGT AAT CC	35
<i>est-II</i>	22	56,5	GAC AAA TAG CCA AGG AAA GTT	40
<i>fan</i>	21	54,0	GTC ACT AGT TTA TTG CGT AAG	35
<i>elt-Ia</i>	21	57,9	GTT CGG AAT ATC GCA ACA CAC	40
<i>fedA</i>	20	57,3	CCT TTT GCA CTG AAG GCT TC	40
<i>fas</i>	20	57,3	AAG CAT ACA TCG GAA CCA CC	40
<i>fae</i>	20	55,3	GCG CAC AAA GTT GTT TGG AA	40
<i>fimf41a</i>	20	51,2	AGG TGA CAT TAT TAT TGG TG	35
<i>stx2e</i>	25	61,3	GGA GTT CAG TGG TAA TAC AAT GAC C	40

3.1.7 Hybridisierungsbedingungen

Zum Auftragen der PCR-Produkte wurde eine Dot Blot Apparatur (DB 96, Whatman, Biometra, Göttingen, Deutschland) mit sterilem Wasser gespült, die Nylon-Membranen mit sterilem Wasser angefeuchtet, unter Vakuum mit je 200 μl 2 x SSC äquilibriert und 25 μl PCR Produkt in 150 μl sterilem Wasser gelöst. Fünfzig μl dieser Verdünnung wurden auf die Membran verbracht. Daraufhin wurde mit 200 μl sterilem Wasser nachgespült, die Membran für 30 min zum Backen bei 120 °C in den Trockenschrank verbracht, zugeschnitten und in mit sterilem Wasser gespülte und getrocknete Hybridisierungsflaschen überführt.

Die aufgeblotteten Verdünnungen der PCR-Produkte wurden mit den Digoxigenin-markierten Sonden (siehe Tabelle 5) hybridisiert, wobei Konzentrationen von 10 pM Sonde/100 mm^2 Membran ausreichend waren. Die Temperatur betrug bei allen Sonden 40°C bei einer Hybridisierungszeit von 2 Stunden. Als Hybridisierungspuffer wurde hier DigEasyHyb (Roche, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Jede Membran wurde gegen drei unterschiedliche Sonden hybridisiert, nachdem die zuvor gebundene Sonde entfernt worden war. Dazu wurde die Membran zweimal bei 37 °C mit 0,1n NaOH inkubiert und zweimal für 5 min in 2 x SSC, 0.1 % SDS gewaschen.

3.1.8 Detektion und Auswertung der Chemilumineszenzsignale

Die Basis der Waschlösungen bildete 20 x SSC. Die Membranen wurden nach der Hybridisierung 2 x 5 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und 2 x 15 min in sterilem 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei Hybridisierungstemperatur gewaschen, 5 min mit sterilem Waschpuffer gespült und 30 min mit Puffer 2 bei Raumtemperatur äquilibriert. Pro Membran wurden 2 μl Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche, Mannheim, Deutschland), die als Fab Fragmente eines Anti-Digoxigenin-Antikörpers vom Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase mit gebundenem Digoxigenin reagieren, auf 20 ml Puffer 2 gegeben und die Membran damit 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde 2 x 15 min mit Waschpuffer gespült, die Membran 5 min. in Detektionspuffer äquilibriert und auf Klarsichtfolie ausgelegt. In 2 ml Detektionspuffer wurden 20 μl CDP Star (Roche, Mannheim, Deutschland), ein ultra-sensitives Chlor-

substituiertes 1,2-Dioxethan Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase, gegeben und auf der Membran verteilt. Die Membran inkubierte unter Luftabschluß für 5 min, wurde luftdicht in Klarsichtfolie verpackt und 15 min bei 40 °C getrocknet. Die Aufnahme der Chemilumineszenz erfolgte im Dunkelzelt mit einer digitalen CCD-Kamera (Raytest, Straubenhardt, Deutschland).

Die Ermittlung der optischen Dichte (OD) der Chemilumineszenzsignale wurde mittels einer Software durchgeführt, die rechnerisch die optische Dichte verschiedener Signalintensitäten abzüglich der vorkommenden Hintergrundschwankungen bezüglich einer festgelegten Fläche ($[od - Bkg] \cdot mm^{-2}$) erfaßt (PCBAS, Version 2.09e, Raytest, Straubenhardt).

3.2 Versuch 2: Untersuchung der Verteilung pathogener *E. coli* in den institutseigenen Stallanlagen

Im Versuch 2 kam eine reduzierte Form der Multiplex PCR zum Einsatz. In diesem Fall wurde aufgrund des Alters der Tiere (Absetzer) auf den Nachweis von zwei der neun Pathogenitätsfaktoren (*fan*, *fas*) verzichtet. Des Weiteren wurde wegen des geringen Vorkommens von *fimf41a* tragenden *E. coli* in den anderen Versuchen, hier auf den Nachweis dieses Faktors verzichtet. Um einen schnellen Überblick über die Verteilung von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren in den Stallanlagen selbst zu erhalten, wurden Kotproben von Sauen und Absetzferkeln aus Gruppenhaltung genommen und die Ergebnisse in Bezug zur entsprechenden Lage der Boxen im Stall gesetzt.

3.2.1 Tierbestand und Fütterung

Die Sauenhaltung fand in Boxen von drei bis fünf Tieren pro Box statt. Der Stall wurde zweimal täglich mittels einer seilgeführten Oberflächentmistung und anschließend mit einem Wasserstrahl unter Druck gereinigt. Die Fütterung der Sauen ist der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Ferkel dieser Sauen wurden im Alter von vier Wochen abgesetzt, waren zum Versuchszeitpunkt sechs Wochen alt und befanden sich zu je ein bis drei Tieren in Flatdecks mit schmalen Kunststoffspaltenböden. Diese wurden zweimal täglich mit einem Wasserstrahl unter Druck gereinigt. Die Fütterung der Ferkel entsprach dem des zur Fallstudie eingesetzten Hybridferkels.

3.2.2 Probengewinnung

Die Entnahme frischer Kotproben aus den Boxen wurde unmittelbar nach der täglichen Reinigung der Stallanlagen durchgeführt. Die Probenahme aus dem Sauenstall erfolgte in dreifacher Ausführung für 32 Tiere. Aus jedem der 23 mit insgesamt 48 Tieren besetzten Flatdecks im Ferkelstall wurde je eine Probe entnommen.

Ein Gramm jeder Probe wurde in 9 ml steriler 0,85 % NaCl homogenisiert und zu je 1 ml aliquotiert. In einem weiteren Schritt wurden in log₁₀-Verdünnungen hergestellt und mittels steriler Glass Beads (2 mm Durchmesser) auf Mc Conkey Agar Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 20 Stunden.

3.2.3 DNA-Präparation

Laktose positive Kolonien mit Metallglanz wurden in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen, 15 min., unterbrochen durch mehrmaliges Mischen mit einem Vortexgerät, bei 96 °C im Heizblock inkubiert und 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:10 in sterilem Wasser verdünnt in die Multiplex PCR eingesetzt. Aus den Kotproben der Sauen wurden auf diese Weise 121 Kolonieüberstände, aus denen der Ferkel insgesamt 210 Kolonieüberstände gewonnen und tiefgefroren.

3.2.4 Bakterienstämme

Die *E. coli*-Stämme und deren Aufbereitung für die PCR entsprachen dem Versuch 1.

3.2.5 Primerselektion und Multiplex PCR

Die PCR wurde in 24 µl Reaktionsansätzen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt: 12,5 µl Hot Star Taq Master Mix (Quiagen, Hilden, Deutschland), 1,25 µl von jeder Primerlösung und 9 µl steriles Wasser. Die Primerlösungen enthielten jeweils die upstream, bzw. downstream Primer für die Pathogenitätsfaktoren StaP, F4, Stb, LT1, Stx2e und F18 in einer Konzentration von 10 µM. Die Endkonzentration pro Primer im Reaktionsansatz betrug also 0,5 µM. Als Template wurde ein Mikroliter 1:10 verdünnter Kolonieüberstand zugegeben und die folgende ‚Touchup‘ PCR in einem T1-Thermocycler (Whatman, Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt: 15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C (+0,4 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C. Pro PCR konnten 84 Proben gleichzeitig bearbeitet werden.

3.2.6 Hybridisierungsbedingungen und Detektion

In diesem Versuch wurden die Proben auf sechs Pathogenitätsfaktoren untersucht. Nach der Hybridisierung gegen das erste Set von Sonden (*stx2e*, *fae* und *fas*) erfolgte das Entfernen der Sonden durch 0,1n NaOH bei 37°C und die Rehybridisierung gegen das zweite Set von Sonden (*est-1b*, *elt-1a*, *fedA*). Die Hybridisierungsbedingungen und die Detektion entsprachen denen des Versuch 1.

3.3 Versuch 3: Wirkung eines Probiotikums auf adhäsive *E. coli*

Der Versuch 3 diente der Ausweitung der PCR-Methodik auf komplexe Proben und sollte zusätzlich einen Überblick über die Verteilung der Pathogenitätsfaktoren insbesondere adhäsiver *E. coli* entlang des Darmtraktes von Ferkeln verschiedener Lebensalter und der wechselnden Fütterung ermöglichen. Der Einfluß eines Probiotikums sollte untersucht werden.

3.3.1 Tierbestand und Fütterung

In dem Fütterungsversuch wurden 24 Hybridferkel eingesetzt, deren Muttersauen 14 Tage vor dem Geburtstermin in zwei Fütterungsgruppen eingeteilt wurden. Die Diät der Versuchsgruppe wurde mit 10^9 Sporen *Bacillus cereus* var. *toyoi* pro kg Futter supplementiert, entsprach aber sonst der in Tabelle 2 angegebenen Zusammensetzung. Die Ferkel der entsprechenden Gruppen erhielten im Alter von 14 Tagen ein Ergänzungsfutter für Saugferkel und ab dem 28. Tag ein Aufzuchtfutter mit je 10^9 Sporen *Bacillus cereus* var. *toyoi* pro kg Futter.

Die Kontrollgruppe blieb ohne Probiotikum-Zulage. Die Ferkel wurden bis zum Absetzen am 28. Lebenstag im klimatisierten Abferkelstall und danach in Flatdecks untergebracht.

3.3.2 Diagnostische Schlachtungen und Probengewinnung

Drei Ferkel jeder Gruppe wurden zu vier verschiedenen Versuchszeitpunkten nach Sedation mit Stresnil (Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) durch eine intrakardiale Injektion mit T61 (Hoechst-Roussel Vet., Frankfurt, Deutschland) getötet: Am 13. Lebenstag, also einen Tag vor der Beifuttergabe; am 21. Lebenstag, also eine Woche nach der erstmaligen Darreichung des Ergänzungsfutters; am 28. Lebenstag, also zum Zeitpunkt des Absetzens und am 32. Lebenstag, also vier Tage nach dem Absetzen. Aus dem Duodenum, Jejunum (in drei gleichlange Abschnitte geteilt), Ileum (in zwei gleichlange Abschnitte geteilt), Caecum und Colon wurden Gewebeproben entnommen und bei 4 °C für 30 min in einem Minimalmedium (siehe Anhang) durch Schütteln in

fünfmütigen Intervallen gewaschen. Das Abschaben der oberflächlichen Schleimhautschichten, die im Folgenden kurz als ‚Mucosa‘ bezeichnet werden, erfolgte mit sterilen Skalpellen.

3.3.3 DNA-Präparation

Pro Probe kamen 0,5 g Mucosa zur Einwaage, wurden sofort mit 3 ml Lysepuffer versetzt und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Gemisch inkubierte nach dem Auftauen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min unter leichtem Schütteln in einem Wasserbad. Nach dem Lysozym-Verdau wurden die Proben auf Eis mit 2 g Glass Beads, 11 ml GITC-Lösung und 1 ml 10% SDS versetzt. Zur Herstellung der GITC-Lösung wurden 33 ml CSB-Puffer im Wasserbad bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und mit 25 g Guanidinthiocyanat gemischt. Der mechanische Zellaufschluß wurde durch 2 maliges Mischen mit einem Vortexgerät von je 30 Sekunden Dauer, sowie durch anschließendes zehnmaliges Puls-Durchmischen im 1 Sekunden-Takt erreicht. Zwischen den einzelnen Disruptionsschritten wurden die Proben aufgrund der damit verbundenen Wärmebildung auf Eis gelagert. Dem Ansatz wurde 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, 15 Sekunden mit dem Vortexgerät gemischt und 10 min bei $10\ 000\ \times\ g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Kühlzentrifuge (Sorvall[®] RC 5B Plus) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann steril in ein neues Oakridge-Zentrifugenröhren überführt und mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) von Phenolresten gereinigt. Nach nochmaligem Zentrifugieren bei $10\ 000\ \times\ g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min wurde der Überstand mit 1 Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt. Das Gemisch inkubierte über Nacht bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und wurde danach bei $10\ 000\ g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit 40 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol versetzt und der Ansatz ein weiteres Mal bei $10\ 000\ \times\ g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min zentrifugiert. Das nach dem Abgießen des Alkohols zurückgebliebene Nukleinsäurezentrifugat wurde einer Säulenreinigung unterzogen. In dieser Arbeit sollen von den gewonnenen Mucosaproben sowohl die DNA mittels der PCR Methodik untersucht als auch die RNA für eine Hybridisierung isoliert werden. Eine Trennung wäre für eine reine 16S rRNA Hybridisierungstechnik nicht unbedingt notwendig gewesen, da ein DNase-Verdau möglich ist, um Nukleinsäuregemische von DNA zu befreien. Da hier aber obendrein aufgrund des Einsatzes der DNA in der PCR ein sehr hoher Reinheitsgrad verlangt wurde, mußte ein System gefunden werden, das selektiv RNA und DNA voneinander trennt und

einen guten Reinigungseffekt für Nukleinsäuren aufweist. Die Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland bietet neben anderen Herstellern ein Verfahren zur Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren an, das auf der Basis eines Anionen-Austauschers funktioniert. In diesem Fall handelt es sich um ein Harz, bestehend aus Silica-Perlen (Partikelgröße 100 μm) mit einer großen Porengröße und einer großen, hydrophilen Oberfläche. Es soll zu einer stabilen Bindung zwischen den negativ geladenen Phosphationen des Nukleinsäure-Rückgrates und der positiv geladenen Matrix kommen, die dann durch Lösungen mit einem hohen Salzgehalt bei Temperaturerhöhung selektiv getrennt werden kann. Für RNA und DNA sind hochkonzentrierte Salzlösungen (bis 1,6 M) mit unterschiedlichen Molaritäten und pH-Werten zur Elution vonnöten, so daß auf diesem Wege eine Trennung möglich ist. Verunreinigungen, wie Proteine, Polysaccharide und andere, werden mit mittelkonzentrierten Salzlösungen ausgewaschen, während die Nukleinsäure an der Säulenmatrix haften bleibt.

Zur Trennung der Nukleinsäuren wurde das RNA/DNA Midi Kit der Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die gewonnene DNA wurde während der Elution in 20 ml Isopropanol (Raumtemperatur) aufgenommen und über Nacht bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Der Ansatz wurde dann bei $10\ 000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zentrifugat mit 40 ml eiskaltem 70 % igem Ethanol versetzt. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt bei $10\ 000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min wurde das Zentrifugat im Trockenschrank bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min getrocknet, daraufhin in 200 μl sterilem, RNase-freiem Wasser gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Die Konzentration der extrahierten Nukleinsäuren in den Probenlösungen wurde mittels eines Spektrophotometers (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) gemessen. Die Stammlösungen wurden je nach erwartetem Nukleinsäuregehalt in sterilen Eppendorf-Gefäßen 1:10 oder 1:100 mit sterilem Wasser vorverdünnt. 60 μl dieser Lösungen wurden in einer Küvette aus Quarzglas Suprasil® (Hellma) mit 540 μl Wasser ein weiteres Mal um den Faktor 10 verdünnt. Die Bestimmung der Optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) zur Nukleinsäuremessung bzw. bei 280 nm (OD_{280}) zur Messung des Proteingehaltes wurde unter Einsatz einer Deuteriumlampe gegen steriles Wasser durchgeführt. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde der Quotient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ errechnet. Grundsätzlich wurden nur Verdünnungen, deren Absorption sich bei 260 nm zwischen 0,1

und 1 befand bei der Messung berücksichtigt. Die Konzentration der DNA in den Lösungen ergab sich rechnerisch aus der Multiplikation des OD_{260} mit dem Faktor 50.

3.3.4 Bakterienstämme

Wie bei den vorherigen Versuchen wurden die Reinkulturen der *E. coli* Referenzstämme je in 40 ml LB-Flüssigmedium bei 37 °C für 20 Stunden bebrütet. Nach der Inkubation wurde die Boullion bei 4000 x g, 4 °C für 15 min abzentrifugiert, das Pellet mit 1 ml sterilem Wasser versetzt und in ein steriles 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. In der THOMA-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Suspensionen auf einen Zellgehalt von $2 \cdot 10^9$ Zellen * ml⁻¹ eingestellt.

Die Extraktion der DNA aus diesen Suspensionen wurde mittels eines handelsüblichen DNA-Isolationskits (Dneasy Tissue Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.5 Primerselektion und Multiplex PCR

Die Primer entsprachen denen der Versuche 1 und 2 (Tabelle 4). Die Multiplex PCR wurde zunächst in einem T Personal Cycler und später in einem T1 Thermocycler (beide Whatman, Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Da die Multiplex PCR zum Nachweis von neun *E. coli* Pathogenitätsfaktoren eingesetzt wurde, mußte darauf geachtet werden, die Reaktionsbedingungen an die Ansprüche jeder der neun Primerpaare anzupassen.

Die optimale DNA-Menge wurde sowohl anhand von aus *E. coli* Stämmen extrahierter DNA als auch anhand der mucosalen DNA-Extrakte ermittelt. Für jeden Pathogenitätsfaktor wurde mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle eingesetzt, häufig aber mehrere. Ein Reaktionsansatz mit sterilem Wasser anstelle von Probe wurde als Kontaminationskontrolle immer mitgeführt. Zunächst wurden mit sterilem Wasser log₁₀-Verdünnungsreihen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) der DNA-Stammlösungen hergestellt, um den Bereich der günstigsten Konzentration einzugrenzen.

Im Falle der *E. coli* Stämme konzentrierte sich die Optimierung der DNA-Menge auf den Bereich zwischen 1 ng DNA (100 pg, 10 pg, 1 pg) und 100 fg DNA. Bei den DNA-Extrakten der mucosalen Proben kamen 100 ng DNA, 50 ng DNA und 10 ng DNA zum Einsatz.

Die Ermittlung der optimalen Primerkonzentration wurde in einem Bereich von 0,2 μM (0,4 μM , 0,5 μM , 0,6 μM) bis 0,8 μM je Primer durchgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung mit 10 μM eines jeden upstream bzw. downstream Primers in sterilem Wasser hergestellt. Alle Schritte, die DNA- und die Primerkonzentration betreffend, wurden in einem 24 μl Reaktionsansatz durchgeführt. Für die Optimierung der Primerkonzentration ergab sich folgende Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (Tabelle 6).

Tabelle 6: MPCR-Reaktionsansätze für unterschiedliche Primerkonzentrationen

	0,2 μM P1/P2	0,4 μM P1/P2	0,5 μM P1/P2	0,6 μM P1/P2	0,8 μM P1/P2
HotStarTaq Master Mix	12,5 μl				
P1 10 μM	0,5 μl	1 μl	1,25 μl	1,5 μl	2 μl
P2 10 μM	0,5 μl	1 μl	1,25 μl	1,5 μl	2 μl
H₂O	10,5 μl	9,5 μl	9 μl	8,5 μl	7,5 μl

P1: Primermix 1; P2: Primermix 2

Ein μl Probenlösung wurde in je 24 μl dieses Reaktionsgemisches gegeben. Das Thermocyclerprogramm wurde folgendermaßen eingestellt: 15 min 95 °C; 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C. Die Optimierung der Annealingtemperatur wurde mit oben genanntem Programm und den bei 54 °C optimierten DNA-Konzentrationen durchgeführt. Das Cyclerprogramm wurde jeweils so abgeändert, daß pro Optimierungsschritt zunächst 53 °C, 54 °C und 55 °C erreicht wurden.

Da es sich bei aus Mucosa extrahierter DNA um eine sehr komplexe Probenart mit einem geringem Anteil Ziel-DNA und einem hohen Anteil Fremd-DNA handelte und so ein System gefunden werden mußte, das die Bildung unspezifischer Produkte vermeidet und

gleichzeitig über eine möglichst niedrige Nachweisgrenze verfügt, wurden auch Touchup, bzw. Touchdown-Systeme getestet. Tabelle 7 zeigt eine große Auswahl verschiedener Thermocycler-Programme, von denen nicht alle Ergebnisse gezeigt werden können. Dabei wurden sowohl bei den Touchup- als auch bei den Touchdown-Systemen unterschiedliche Temperaturgradienten bis zum Erreichen der jeweiligen Annaelngtemperatur eingesetzt. Die Zyklenanzahl variierte von 15, 20, 25, 30 bis 35 Zyklen.

Tabelle 7: Thermocycler-Bedingungen zur Optimierung der Multiplex PCR

PCR-System	Thermocycler-Programm
Standard 53 °C	15 min 95 °C; 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 53 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C
Standard 54 °C	15 min 95 °C; 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C
Standard 55°C	15 min 95 °C; 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 55 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C
Touchup 50 °C -> 55 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C (+0,5 °C/Zyklus), 120 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 15 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 55 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchup 50 °C -> 55 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C (+0,5 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 15 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 55 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchup 50 °C -> 55 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C (+0,5 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 25 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 55 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchup 48 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 48 °C (+0,6 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 25 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchup 50 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C (+0,4 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchup 50 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C (+0,4 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchdown 60 °C -> 55 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,5 °C/Zyklus), 120 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 20 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 55 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchdown 60 °C -> 55 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,5 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 20 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 55 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchdown 60 °C -> 55 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,5 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 25 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 55 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchdown 60 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,6 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 20 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchdown 60 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,6 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 25 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchdown 60 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,6 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchdown 60 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,6 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.

Für die Ausführung der Multiplex PCR zur Amplifizierung von neun *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren hat sich für die Untersuchung von mucosalen DNA-Extrakten eine Touchup-PCR, 15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 50 °C (+0,4 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 35 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C als Standardreaktion als optimal erwiesen. Als Reaktionsansatz dienten 49 µl, bestehend aus: 25 µl Hot Star Taq Master Mix, je 2,5 µl 10 µM Primermix 1 und 2, sowie 19 µl sterilem Wasser und 1 µl Probe.

Zur Darstellung der in der PCR gebildeten Amplifikate wurden die PCR-Produkte in eine Agargelelektrophorese (AGE) eingesetzt. Dazu wurde Agarose (MetaPhor Agarose, Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 0,5 x TBE Puffer 2 % ig angesetzt und durch zweimaliges kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Sechzig ml des Gemisches wurden 6 µl SYBR® Green (Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) zugegeben (Verdünnung 1:10000 fach) und in einem Geltray ausgegossen.

Nach dem Erkalten wurde das Agarosegel in eine horizontale 2,5 l Elektrophorese-Kammer (Agagel Maxi, Biometra®) gelegt und mit 0,5 x TBE überschichtet.

Die PCR-Produkte der eingesetzten *E. coli*-Stämme wurden in Mikrotiterplatten mit sterilem Wasser 1:10 vorverdünnt. Ein µl dieser Verdünnung wurde mit 5 µl Wasser und 2 µl Ladepuffer gemischt. Fünf µl PCR-Produkt der mucosalen DNA-Extrakte wurden mit 1 µl Wasser und 2 µl Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden gemeinsam mit einem DNA-Standard bei $3V \cdot cm^{-1}$ der Elektrophorese unterzogen.

Die Aufnahme der Gele erfolgte unter UV-Licht mit einer digitalen CCD-Kamera (charge coupled density camera, Raytest, Straubenhardt, Deutschland). Die Molekulargewichte der PCR-Produkte wurden mittels einer densitometrischen Evaluationssoftware (Phoretix, Newcastle, GB) bestimmt.

3.3.5.1 Versuch 3.1: PCR zum Nachweis von *fae*

Zur Untersuchung der mucosalen DNA-Extrakte wurde zur Erhöhung der Sensitivität zusätzlich ein PCR-System zum alleinigen Nachweis des F4-Fimbriungens entworfen. Dazu diente das in Tabelle 4 angegebene Primerpaar F4-1/ F4-2.

Die PCR zum Nachweis von *fae* wurde in einem T1-Thermocycler (Whatman, Biometra®, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Zur Optimierung der PCR wurden der Kulturüberstand eines positiven *E. coli* Stammes in 1:10 und 1:100 Verdünnungen, 100 ng DNA von mit *fae* positiven *E. coli* Zellen inokulierter Mucosa und DNA-Extrakte von mucosalen Proben in Konzentrationen von 50 ng DNA/ μ l und 100 ng DNA/ μ l eingesetzt. Das 24 μ l PCR-Reaktionsgemisch bestand während der Optimierung der Primerkonzentration aus folgenden Komponenten (Tabelle 8).

Tabelle 8: *fae* -PCR-Reaktionsansätze für unterschiedliche Primerkonzentrationen

	0,3 μM F4-1/F4-2	0,4 μM F4-1/F4-2	0,5 μM F4-1/F4-2	0,6 μM F4-1/F4-2
HotStarTaq Master Mix	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l
F4-1 10 μM	0,75 μ l	1 μ l	1,25 μ l	1,5 μ l
F4-2 10 μM	0,75 μ l	1 μ l	1,25 μ l	1,5 μ l
H₂O	10,0 μ l	9,5 μ l	9 μ l	8,5 μ l

Jeder Reaktionsansatz wurde mit 1 μ l Probe versetzt. Die Optimierung der Primerkonzentration im Reaktionsansatz erfolgte mithilfe eines Standard-PCR-Programms: 15 min 95 °C; 35 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C. Die Optimierung der Annealingtemperatur wurde mit je 0,5 μ M F4-1 und F4-2 mit Hilfe oben genannten Standard-PCR-Programms durchgeführt. Aus Gründen der Sensitivität und Spezifität wurde auch je ein Touchup- und Touchdown-System getestet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Thermocycler-Bedingungen für die PCR zum Nachweis von *fae*

PCR-System	Thermocycler-Programm
Standard 48 °C	15 min 95 °C; 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 48 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C
Standard 50 °C	15 min 95 °C; 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C
Standard 52 °C	15 min 95 °C; 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 52 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C
Standard 54 °C	15 min 95 °C; 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C
Touchup 50 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C (+0,4 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.
Touchdown 60 °C -> 54 °C	15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,6 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.

Mucosale DNA-Extrakte wurden mittels eines Reaktionsansatzes mit je 0,5 µM F4-1 /F4-2 Primer und einer Touchup-PCR mit folgendem Thermocycler-Programm auf das Vorhandensein von *fae* untersucht: 15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 50 °C (+0,4 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 35 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C.

Zur Darstellung der Amplifikate wurden mit 0,5 x TBE-Puffer 2 %ig angesetzte, mit SybrGreen® 1:10⁴ versehene Agarosegele hergestellt. Fünf µl PCR-Produkt wurde mit 5 µl sterilem Wasser und 3 µl Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 3 V · cm⁻¹ durchgeführt.

3.3.6 Hybridisierungsbedingungen für die Multiplex PCR

Zum Auftragen der PCR-Produkte wurde eine Dot-Blot-Apparatur (DB 96, Whatman, Biometra, Göttingen, Deutschland) mit sterilem Wasser gespült, die Nylon-Membranen mit sterilem Wasser angefeuchtet und unter Vakuum mit je 200 µl 2 x SSC äquilibriert. Dann wurden 100 µl jeder mucosalen Probe als 1:10-Verdünnung in Wasser aufgetragen. Anschließend wurde mit 200 µl sterilem Wasser nachgespült, die Membran für 30 min zum Backen bei 120 °C in den Trockenschrank verbracht, zugeschnitten und in mit sterilem Wasser gespülte und getrocknete Hybridisierungsflaschen überführt.

Zur Optimierung der Hybridisierungsbedingungen, wie Sondenkonzentration, Hybridisierungsdauer, Puffer und Temperatur wurden *E. coli* Referenzstämme und

mucosale DNA-Extrakte in unterschiedlichen Konzentrationen einer Touchup-PCR unterzogen (siehe 3.3.5). Zum Einsatz kamen in log₁₀-Verdünnungen von 10 ng bis 1 fg *E. coli*-DNA, 100 ng mucosaler DNA-Extrakt und Kombinationen von 100 ng aus Mucosa extrahierter DNA und *E. coli*-DNA in Konzentrationen von 1 ng bis 1 fg. Für jede der neun Sonden wurde so die Sensitivitätsgrenze bestimmt. Es wurden zwei unterschiedliche Hybridisierungspuffer getestet. Einerseits ein formamidfreier SSC-SDS-Hybridisierungspuffer, der insbesondere für Oligosonden geeignet ist, und andererseits ein handelsüblicher Hybridisierungspuffer (DigEasyHyb). DigEasyHyb von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) ist ebenfalls formamidfrei; die Berechnung der optimalen Hybridisierungstemperatur erfolgt jedoch analog zu formamidhaltigen Puffern mit 50 % Formamid. Für beide Puffer wurden Sondenkonzentrationen von 10 pM, 20 pM, 40 pM und 50 pM und Temperaturen von 35 °C, 40 °C, sowie 45 °C eingesetzt. Der Einfluß der Hybridisierungsdauer wurde anhand einer Sonde (*fimf41*) exemplarisch bestimmt. Bei optimierter Temperatur wurden Hybridisierungszeiten von 2, 4, 6, 16 und 18 Stunden getestet.

Nach der Optimierung wurden alle mucosalen DNA-Extrakte einer Touchup-PCR unterzogen, die Produkte 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt und je 100 µl der Verdünnung aufgeblottet.

Als Hybridisierungspuffer wurde im Versuch 3 der formamidfreie SSC-SDS-Hybridisierungspuffer für Oligosonden verwendet. Die internen Oligosonden wurden in einer Konzentration von 20 pM/ 100 cm² Nylon-Membran bei T_{HYB} eingesetzt (siehe Tabelle 10). Alle Membranen hybridisierten für 16 Stunden über Nacht.

3.3.7 Statistik

Die Mediane der ermittelten DNA Konzentrationen der mucosalen Proben wurden mittels BIAS, Version 6.0 (Hanns Ackermann, Epsilon Verlag Hochheim Darmstadt) dem Mann-Whitney-Test unterzogen.