G. Anhang

G.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Brutschränke	Heraeus, Typ B6060
Elektrophoresekammern	AGS; Hybaid; MWG
Film (inkl. Negativ)	Polaroid Polapan 665PN ISO 80/20°
Filmkassetten	Kodak BioMax Cassette
Fluorometer	Hoefer DyNA Quant™ 200
Hybridisierungsofen	Hybaid Shake´n`Stack
Heizgerät und Magnetrührer	IKA Labortechnik
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30
Mikrotiterplatte	Sarstedt 96 Well Mikrotestplatte
Multi-Platten (PCR)	Sarstedt Multiply-PCR-Ketten
pH-Meter	Knick 766 Calimatic
Photo-Kamera	Polaroid MP4+ Instant Camera System
Photospektrometer	Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec® 3000 pro
Pipetten	Eppendorf Research
PFGE-Kammer	BioRad Chef-DR® III System; Electrophoresis Cell; BioRad-Cooling Module
Röntgenfilme	Kodak X-OMAT AR
Schüttler	IKA Labortechnik KS 250 basic
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, C 24 Incubator Shaker
Spannungsgerät	Hybaid PS 250
Konzentrator	Savant Speed Vac
Sterilwerkbank	Steag Laminarflow-Prozeßtechnik
Thermocycler	Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400
Thermoblock	Eppendorf Thermomixer 5436
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D
Transilluminator	Herolab; E.A.S.Y. 429K; ICU-1; Video-Graphik Printer UP 890 CE
UV-Tisch	Biometra TI 1
Vortexer	IKA MS2 Minishaker
Waage	Sartorius LA 230S und BP 2100
Wasserbäder	Julabo; Th. Karow GmbH

G.2 Chemikalien, Nährmedien und Lösungen

G.2.1 Chemikalien

In der Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit	Epicentre, Biozym, Hessisch Oldendorf
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Agarose Gel DNA Extraction Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dig Chem-Link Labeling and Detection Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Topo™TA Cloning® Kit with One Shot Top10 Cells	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG Luminescent Detetion Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QIAwell 8 Ultra Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden

Die Enzyme und Primer wurden von den Firmen New England Biolabs® GmbH, Schwalbach/Taunus, Invitrogen Corporation, Karlsruhe und MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

Bezugsfirmen für weitere in dieser Arbeit verwendete organische und anorganische Reagenzien waren Acila GMNmbH, Walldorf; BioRad, München; Invitrogen Corp., Karlsruhe; Merck AG, Darmstadt; New England Biolabs® GmbH, Schwalbach/Taunus; Oxoid Unipath GmbH, Wesel; Promega GmbH, Mannheim, Roth® GmbH & Co., Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma®, Deisenhofen.

G.2.2 Nährmedien

Müller-Hinton-Blutagar	Caseinhydrolysat		17,50 g/l
	Fleischextrakt		2,00 g/l
	Stärke		1,50 g/l
	Agar, pH 7,4 ± 0,2		12,00 g/l
			autoklaviert bei 121°C, 15 min abkühlen auf 45-50°C anschließend Zugabe von 5% defibriniertem Schafblut
- LB-Agar (Luria Bertani)	NaCl		5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)		10,00 g/l
	Hefeextrakt		5,00 g/l
	1 *N* NaOH		1,00 ml
	Agar		15,00 g/l
			pH 7,0±0,2
			autoklaviert bei 121°C, 15 min
- LB-Medium (Luria Broth)	NaCl		5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)		10,00 g/l
	Hefeextrakt		5,00 g/l
			pH 7,0±0,2
			autoklaviert bei 121°C, 15 min

G.2.3 Lösungen

G.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese (DNS)

- TBE-Puffer Stamm-Lösung, 10 x konz.	Tris	890 mM	107,82 g
	Borsäure	890 mM	55,03 g
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	18,62 g
			auf 100 ml
			davon 40 ml
			auf 1000 ml
			A. bidest.
- Stop-Lösung	Formamid		9,50 ml
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	0,40 ml
	Bromphenolblau		5,00 mg
	Xylencyanol FF		5,00 mg
	A. bidest.		0,100 ml

- Agarose	Agarose	0,8 – 1,20 g auf 100 ml 1 x TBE
- Ethidiumbromidlösung 1%		

G.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

- 10 x PCR buffer[1]	Tris-HCl, pH 8,4 KCl	200 mM 500 mM
- *Taq* DNA Polymerase[1]		5 U/µl
- Magnesium Chlorid Solution[1]		50 mM
- dNTP[2]	PCR Nucleotide Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	each dNTP 10 mM

[1] **Invitrogen Corporation**
[2] **Promega Corporation**

G.2.3.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

- ESP-Puffer	EDTA Sarcosyl pH 9,5 Proteinase K	500 mM 3,4 mM	18,62 g 1,00 g auf 100 ml A. bidest. 1,80 mg/ml
- TE Puffer	Tris EDTA pH 7,5	10 mM 10 mM	1,21 g 3,72 g auf 1000 ml A. bidest.
- TBE-Puffer 10 x konz.	Tris Borsäure EDTA-Lsg., pH 8,0	890 mM 890 mM 500 mM	107,82 g 55,03 g 18,61 g auf 100 ml davon 40 ml auf 1000 ml A. bidest.
- Depurinisierungs-lösung	HCl (38%ig)	250 mM	10,8 ml auf 489,2 ml A. bidest.

- Denaturierungs-lösung	NaCl	1,5 M	87,66 g
	NaOH	500 mM	20,00 g
			auf 1000 ml
			A. bidest.
- Neutralisierungs-lösung	Tris-HCl, pH 8	500 mM	60,57 g
	NaCl	3 M	175,32 g
			auf 1000 ml
			A. bidest.

G.2.3.4 DNS-DNS-Hybridisierung

Zusammensetzung der Lösungen unter Verwendung des DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim):

- Na-Chlorid/Na-Citrat-Puffer (SSC), 20 x konz.	NaCl	3 M	175,23 g
	Na-Citrat	300 mM	88,23 g
	pH 7,0		auf 1000 ml
			A. bidest.
- Puffer 1	Maleinsäure	1 M	11,60 g
	NaCl	1 M	8,70 g
	pH 7,5		auf 1000 ml
			A. bidest.
- Blocking Reagenz Stock Solution (BRSS), 10 x konz.	Blocking Reagenz	10%	10,00 g
			auf 100 ml
			Puffer 1
		erhitzen bis 65° C, autoklavieren	
			Lagerung bei 4°C
- SDS (10%ig)	SDS	10%	20,00 g
			auf 200 ml
			A. bidest.
- Prähybridisierungs-lösung	Formamid		12,50 ml
	SSC	20x	12,50 ml
	BRSS (1%)	10x	1,00 ml
	N-Lauroylsarcosine	35%	0,10 ml
	SDS	10%	2 µl
			auf 50 ml
			A. bidest.

- Hybridisierungswasch-puffer B	SSC	20x	50,00 ml
	SDS	10%	5,00 ml
			auf 500 ml A. bidest.
- Hybridisierungswasch-puffer C	SSC	20 x	2,50 ml
	SDS	10 %	5,00 ml
			auf 500 ml A. bidest.
- Waschpuffer	Puffer 1		500 ml
	Tween® 20		1,00 ml
- Puffer 2	Puffer 1		108,00 ml
	BRSS	10%	12,00 ml
- Puffer 3	Tris, pH 9,5	1 M	5,00 ml
	NaCl	5 M	1,00 ml
			auf 50 ml A. bidest.
- Anti-Dig-AP Lösung	Anti-Dig AP-Konjugat		2 µl
	Puffer 2		20,00 ml
- CSPD-Lösung	CSPD-Lösung		20 µl
	Puffer 3		10 ml
		kann 5x verwendet werden	
- Strippingpuffer	NaOH	200 mM	4 g
	SDS	10 %	5,00 ml
			auf 500 ml A. bidest.

G.2.3.5 Subtraktive Hybridisierung

(es werden nur diejenigen Lösungen und Chemikalien aufgeführt, die an vorheriger Stelle noch nicht erwähnt wurden)

- Dithiothreitol (DTT)	10x
- Isopropyl-beta-D-thiogalactosid (IPTG)	100 mM
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolylgalactosid (X-gal)	40 mg/ml

- Adenosin-Triphosphat (ATP)		10 µM
- DNS-Ligase		400 U/µl
- Carlos Puffer	Tris, pH8	330 mM
	K^+-Azetat	660 mM
	Mg^{2+}-Azetat	100 mM
	Spermidin	30 mM
	BSA	1 mg/ml

G.3 Verwendete Oligonukleotid-Primer/PCR-Bedingungen

Sämtliche Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Für alle PCR-Reaktionen wurde ein initialer Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 min sowie ein terminaler Elongationsschritt bei 72°C für 7 min durchgeführt. Abweichend hiervon wurde für die Inverse PCR (Tab. 12a und Tab. 12b) und die PCR zur Generierung „Tester"-spezifischer Amplifikate (Tab. 14a und Tab. 14b) ein 10 minütiger Elongationsschritt gewählt.

Tab. 10a) Verwendete Oligonukleotid-Primer zum Nachweis der virulenzassoziierten Gene *cad*F, *cdt*B, *che*Y, *fla*A, *fur* und *por*A

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Gen	Amplifikat-größe [in bp]	Referenz
cadF forw.	TTGAAGGTAATTTAGATATG	*cadF*	396	Konkel et al., 1999
cadF rev.	CTAATACC(CT)AAAGTTGAAAC			
cdtB forw.	GTTGGCACTTGGAATTTGCAAGG	*cdtB*	475	Pickett et al., 1996
cdtB rev.	GTTAAAATCCCCTGCTATCATCC			
cheY forw.	GGATTATTAAAAATACCCTAAC	*cheY*	305	Yao et al., 1994
cheY rev.	CTCAGCTGCACCTTCTCCACTTC			
A4-E3 forw.	TACAGATACGATACAGGTAAT	*porA*	1032	Moser et al., 2001
A4-E3 rev.	AGTACTATGATCAGCACTTTC			
flaA forw.	CGTATTAACACAAATGTTGCAGCATTG	*flaA*	960	Wassenaar et al., 1994
flaA rev.	ACCAACACCTATATCTCC			
fur forw.	CTGATAGAAAATGTGGAATAT	*fur*	441	Wooldridge et al., 1994
fur rev.	TACCTTTGCTTTTTGATTGTT			

Tab. 10b) PCR-Bedingungen für die Generierung der virulenzassoziierten Gene *cad*F, *cdt*B, *che*Y, *fla*A, *fur* und *por*A

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen			Zyklen-zahl
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
*cad*F	cadF forw/rev	94°C, 60''	49°C, 60''	72°C, 60''	30
*cdt*B	cdtB forw/rev	94°C, 60''	59°C, 60''	72°C, 60''	30
*che*Y	cheY forw/rev	94°C, 60''	55°C, 60''	72°C, 60''	30
*por*A	A4-E3 forw/rev	94°C, 60''	53°C, 60''	72°C, 120''	35
*fla*A	flaA forw/rev	94°C, 60''	55°C, 60''	72°C, 120''	35
fur	fur forw/rev	94°C, 60''	47°C, 60''	72°C, 60''	30

Tab. 11a) Oligonukleotid-Primer für die Flagellin PCR-RFLP Typisierung

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Gen	Amplifikat-größe [in bp]	Referenz
P1	AAAGGATCCGCGTATTAACACAAATGTTGCAGC	*flaA*/*flaB* (3'-Ende)	1490/3394	Ayling et al., 1996
P2	AAAGGATCCGAGGATAAACACCAACATCGG	*flaA*/*flaB* (5'-Ende)		
P3	GATTTGTTATAGCAGTTTCTGCTATATCC	*flaA*/*flaB* (5'-Ende)		

Tab.11b) PCR-Bedingungen für die Flagellin PCR-RFLP Typisierung

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen			Zyklen-zahl
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
*fla*A/*fla*B	P1/P2/P3	94°C, 60''	54°C, 60''	72°C, 180''	35

Tab. 12a) Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Inverse PCR

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Gen	Amplifikat-größe [in bp]	Referenz
11828-G8 forw.	GTTGTGTGGAATTGTGAGCGG	RDAFragment 11828-G8	-	diese Arbeit
11828-G8 rev.	GGAGAGGCGGTTTGCGTATT			
11828-D7 forw.	CTTTGATCTCGGTGAGAGGC	RDA-Fragment 11828-D7	-	diese Arbeit
11828-D7 rev.	GTTGCAAGCCCTGATGAAATGT			
11828-E7 forw.	GCGGGTAGGAGGAATTTTCA	RDA-Fragment 11828-E7	-	diese Arbeit
11828-E7 rev.	GGTTGGAAATCGTTCGTAGAG			
1187-I-A6 forw.	GAAAAGCAACGGAACAAGCAT	RDA-Fragment 1187-I-A6	-	diese Arbeit
1187-I-A6 rev.	GGGCGGCGATTATCAAGTCT			
K14-B12 forw.	GCTCCACGATTGACTAGA	RDA-Fragment K14-B12	-	diese Arbeit
K14-B12 rev.	CTTGCTTGATCCTCGGT			

Tab. 12b) Bedingungen für die Inverse PCR

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen			Zyklen-zahl
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
RDA-Fragment 11828-G8	11828-G8 forw/rev	94°C, 30''	60°C, 30''	72°C, 2,5' (-5')	30-40
RDA-Fragment 11828-D7	11828-D7 forw/rev	94°C, 30''	60°C, 30''	72°C, 2,5' (-5')	30-40
RDA-Fragment 11828-E7	11828-E7 forw/rev	94°C, 30''	58°C, 30''	72°C, 2,5' (-5')	30-40
RDA-Fragment 1187-I-A6	1187-I-A6 forw/rev	94°C, 30''	57,5°C, 30''	72°C, 2,5' (-5')	30-40
RDA-Fragment K14-B12	K14-B12 forw/rev	94°C, 30''	53°C, 30''	72°C, 2,5' (-5')	30-40

Tab. 13a) Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Generierung von DNS-Sonden aus RDA-Fragmenten

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Gen	Amplifikat-größe [in bp]	Referenz
11828-G8 forw.	TTGTTATCCGCTCACAATTCC	RDA-Fragment 11828-G8	271	diese Arbeit
11828-G8 rev.	CTTTGAGTGAGCTGATACCGC			
1187-I-A6 forw.	GGCTAATCGCACGGTGAC	RDA-Fragment 1187-I-A6	258	diese Arbeit
1187-I-A6 rev.	GTGAGAGGCTGGAGAGTGCT			
11828-D7 forw.	GCGAAGCTATGACTATGAGCG	RDA-Fragment 11828-D7	166	diese Arbeit
11828-D7 rev.	CCATAGCTTTTTAATTCAACGC			
K14-B12 forw.	CCTTGTATTTATCAAAACGCCC	RDA-Fragment K14-B12	158	diese Arbeit
K14-B12 rev.	TTTTGCATAACCCAAGAATGC			
1187-I-E2 forw.	GCGAAGCTATGACTATGAGCG	RDA-Fragment 1187-I-E2	111	diese Arbeit
1187-I-E2 rev.	GAGCAACTTTTAAATGGTTGGG			

Tab. 13b) PCR-Bedingungen für die Generierung von DNS-Sonden aus RDA-Fragmenten

Gen	Primer	Reaktionsbedingungen			Zyklen-zahl
		Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
RDA-Fragment 11828-G8	11828-G8 forw/rev	94°C, 60´´	60°C, 60´´	72°C, 60´´	30
RDA-Fragment 1187-I-A6	1187-I-A6 forw/rev	94°C, 60´´	59°C, 60´´	72°C, 60´´	30
RDA-Fragment 11828-D7	11828-D7 forw/rev	94°C, 60´´	59°C, 60´´	72°C, 60´´	30
RDA-Fragment K14-B12	K14-B12 forw/rev	94°C, 60´´	60°C, 60´´	72°C, 60´´	30
RDA-Fragment 11828-E7	11828-E7 forw/rev	94°C, 30´´	58°C, 30´´	72°C, 60´´	35
RDA-Fragment 1187-I-E2	1187-I-E2 forw/rev	94°C, 60´´	60°C, 60´´	72°C, 60´´	30

Tab. 14a) Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Amplifikation „Tester“-spezifischer DNS-Fragmente

Primer	Primersequenz (5’ – 3’)	Referenz
Rbam 24	5’-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG-3’	Lisitsyn, 1993

Tab. 14b) PCR-Bedingungen für die Amplifikation „Tester“-spezifischer DNS-Fragmente

Primer	Reaktionsbedingungen			Zyklen-zahl
	Denaturierung	Anlagerung	Amplifizierung	
Rbam 24	94°C, 60´´	58°C, 60´´	72°C, 3’	35