

## 8. Anhang

### Material

ad Kap. 3.1.3 Nährmedien und Reagenzien

#### Blutagar

Standard 1 Nähragar (Merck 7881)

mit 5% defibriniertem Schafblut

#### TSB (Difco 0370-17-3)

Zusammensetzung

|       |                   |
|-------|-------------------|
| 17 g  | Trypton           |
| 3 g   | Sojamehlpepton    |
| 2,5 g | D-Glucose         |
| 5 g   | Natriumchlorid    |
| 2,5 g | di-Kaliumphosphat |

ph 7,3, ad 1000 ml

ad 3.1.3.3 *Staphylococcus aureus*

#### phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Zusammensetzung

|        |                                                                     |
|--------|---------------------------------------------------------------------|
| 0,55 g | Natriumdihydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O (Merck 6346.1000)      |
| 2,85 g | Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O (Merck 1.06580.1000) |
| 8,7 g  | Natriumchlorid (NaCl)                                               |

pH 7,4, ad 1000 ml A. dest.

#### PBS/Tween

1000 ml PBS + 0,1 % Tween (Merck 822184)

ad 3.1.3.6 *Escherichia coli*

### VT-EIA

#### modifizierte TSB

##### Zusammensetzung

30 g TSB (Difco)  
1,5 g Gallesalze Nr. 3 (Oxoid L 56)  
1,5 g Dikaliumhydrogenphosphat (Merck)  
pH 7,3 +/- 0,2, ad 1000 ml

### IMMUNOBLLOT

#### Verdünnungspuffer für Probenvorbereitung:

##### Zusammensetzung

0,5 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), (Merck 1.04873)  
1,14 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ )  
(Merck 1.06579)  
8,5 g NaCl  
pH 7,5 +/- 0,3, ad 1000 ml Wasser

#### Syncase-Agar mit Mitomycin C-Zusatz:

##### - Grundnährboden:

##### Zusammensetzung

10,0 g Caseinhydrolysat, säurehydrolysiert (Difco 0230-17-3)  
1,17 g Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (Merck 1.01145.1000)  
5 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck 104873)  
12,61 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ) (Merck)  
1 ml Salzlösung:  
Magnesiumsulfat;  $\omega^1 = 5$  (Merck 5886),  
Manganchlorid;  $\omega^1 = 0,5$  (Merck 5934),  
in Schwefelsäure;  $c^1 = 0,5 \text{ mol/l}$  (Merck 1.09074.1000)  
15 g Noble Agar (Difco 0142-17-0)  
pH 8,0 +/- 0,1, ad 1000 ml A. dest.

##### - Supplemente:

---

<sup>1</sup>  $\omega$  = Massenanteil, c = Stoffmengenkonzentration

a. L-Tryptophan/Nikotinsäure-Lösung:

0,4 g            L-Tryptophan (Merck 8374)  
0,2 g            Nikotinsäure (Merck 1.06817.0100)  
100 ml          Wasser

Herstellung:

Die Bestandteile werden in der angegebenen Wassermenge gelöst und sterilfiltriert (0,22 µm). Die Lösung kann bei 4°C luftdicht verschlossen 4 Wochen aufbewahrt werden.

b. Glucose-Lösung:

50 g            Glucose (Walter)  
100 ml          Wasser

Herstellung:

Die Glucose wird in Wasser gelöst und 15 min bei 121°C sterilisiert. Die Lösung kann luftdicht verschlossen bei 4°C 6 Monate aufbewahrt werden.

c. Mitomycin C-Lösung:

Mitomycin C-Lösung,  $\rho = 0,02 \text{ mg/ml}$

Herstellung:

Mitomycin C wird in der angegebenen Konzentration in Wasser gelöst. Die Lösung wird sterilfiltriert (0,22 µm) und kann luftdicht verschlossen bei 4°C mindestens 6 Monate gelagert werden.

Vollständiger Nährboden:

Dem auf 50°C temperierten Grundnährboden werden pro l unmittelbar vor Herstellung 10 ml L-Tryptophan/Nikotinsäure-Lösung, 4 ml Glukose-Lösung und 1,25 ml Mitomycin C-Lösung zugesetzt.

Immunoblotreagenzien:

PBS

Zusammensetzung

5 g            NaCl  
1,011 g       Dinatriumhydrogenphosphat  
0,136 g       Natriumdihydrogenphosphat  
ad 1000 ml Wasser

PBS/Tween

### Zusammensetzung

0,5 ml Tween 20  
1000 ml PBS

### Blocklösung

#### Zusammensetzung

0,6 g Magermilchpulver (Oxoid L 31)  
100 ml PBS/Tween

### alk. Phosphatase-Puffer

#### Zusammensetzung

5,844 g Natriumchlorid  
1,016 g Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ) (Merck 5833)  
12,11 g TRIS (Merck 1.08382)  
ad 1000 ml Wasser, pH 9,5 +/- 0,2

### Farbreagens

#### Zusammensetzung

1,65 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) (Roth A155.2)  
3,30 mg 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) (Roth 4421.2)  
10 ml alk. Phosphatase-Puffer

### Stopplösung

#### Zusammensetzung

7,44 g EDTA- $\text{Na}_2$  (Titriplex III Merck 8418)  
1000 ml Wasser

### LT/ST

#### Caye 2-Bouillon

2 % Casamino Acids (Difco)  
0,5 % Hefe-Extrakt (Difco)  
0,871 % Dikaliumhydrogenphosphat  
0,25 % Natriumchlorid

0,1 % Salzlösung, bestehend aus:

5 % MgSO<sub>4</sub>

0,5 % MnCl<sub>2</sub>

0,5 % FeCl<sub>3</sub>

pH 8,5 mit 1 N NaOH und 1 N HCL einstellen

Nach dem Autoklavieren steriles Zugeben von 0,25 % Glukose und  
20 µg /ml Lincomycin.

## Methoden

ad Kap. 3.2.3.2

TNase-Nachweis von isolierten Stämmen

- Anzüchtung der fraglichen Kolonien in 5 ml BHI
- Inkubation 24 h/37 °C
- Erhitzung von 1 ml Kultur 15 min/100 °C
- Einfüllen von 7 µl erhitzter Kulturflüssigkeit in vorgestanzte Löcher des Toluidinblau O-DNA Agars
- Inkubation: 4 h/37 °C; feuchte Kammer
- Auswertung: positive Reaktion = rosafarbene Zone um Applikationsloch

Koagulase-Nachweis von isolierten Stämmen

- Zugabe von 0,1 ml bebrüteter BHI-Bouillon (siehe TNase-Nachweis) zu 0,3 ml Kaninchenplasma
- Inkubation bis zu 24 h/37 °C
- Auswertung: positive Reaktion = Koagulation des Röhrcheninhalts zu mehr als Dreiviertel nach 1/2/4-6 h und ggf. 24 h.

ad Kap. 3.2.8.2. Na-Hippurattest

- Herstellung einer 1%-igen wässrigen Na-Hippuratlösung
- Suspendieren einer Öse Koloniematerial in 0,5 ml Na-Hippuratlösung (Hippursäure-Na-salz (Merck 820648))
- Inkubation: 2 h/37°C im Wasserbad
- Überschichten mit 0,2 ml einer 3,5% Ninhydrinlösung (Aceton/n-Butanol 1:1) (Ninhydrin (Merck 106762))
- Inkubation: 10 min/ 37°C im Wasserbad
- Auswertung positive Reaktion = dunkelblaue/violette Verfärbung  
negative Reaktion = keine/hellblaue Verfärbung

