

# 3. Material und Methoden

Die zur Isolierung eingesetzten *Eimeria tenella* Oozysten wurden von Herrn Doktor Thomas Pogonka vom Institut für Molekulare Parasitologie der Humboldt Universität zu Berlin zur Verfügung gestellt. Verwendet wurde der Houghton Stamm von *Eimeria tenella* mit einer Sporulation von 36 h. Die Oozysten wurden als Aliquots zu 1 ml mit einer Konzentration von  $7,6 \times 10^7$  bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 3.1. Isolierung der Gesamt-RNS aus sporulierten *Eimeria tenella* Oozysten

Die Glaswaren und Lösungen wurden mit 0,1 % DEPC<sup>1</sup> vorbehandelt. Das DEPC wurde nach einer Einwirkzeit von 12 Stunden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durch Autoklavieren<sup>2</sup> entfernt. Die Glasperlen (Durchmesser: 0,45 - 0,50 mm) wurden vor ihrem Einsatz mit 1 M HCl<sup>3</sup> benetzt und für 30 min bei RT stehen gelassen. Danach wurden sie mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und für 3 h bei  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert<sup>4</sup>.

Die Isolierung der Gesamt-RNS erfolgte unter Verwendung der Puffer und Säule aus dem Kit "Isolation of Total RNA and Genomic DNA from Yeast / Qiagen RNA & DNA Maxi Kit/ Qiagen-tip 500"<sup>5</sup> nach folgenden Protokoll:

- Es wurde ein Aliquot der gefrorenen *Eimeria tenella* Oozysten (siehe oben) mit 2,5 ml des Puffer QRL 1 vermischt.
- Nach dem Auftauen wurden 2,5 ml der vorbehandelten Glasperlen dazugegeben, und das Gemisch 2x für 1 min gevortext<sup>6</sup>.
- Das Gefäß wurde solange bei RT stehengelassen bis sich alle Glasperlen auf dem Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, erst dann wurde der Überstand entnommen.
- Die Glasperlen wurden mit 1,5 ml Puffer QRL 1 gespült, und der Überstand wurde mit dem vorigen zusammengeführt.

---

<sup>1</sup>Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art.Nr. D 5758

<sup>2</sup>Fedegari, I-Pavia, F.Nr. 1148F

<sup>3</sup>Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art.Nr. H 251-2

<sup>4</sup>Heraeus, D-63450 Hanau, Typ UT6760

<sup>5</sup>Qiagen, D-40724 Hilden, Art.Nr. 14162

<sup>6</sup>Bender & Hobein AG, Ch-Zuerich, Vortex Genie 2<sup>TM</sup>

- Die gemischten Überstände wurden in eine sterile Einmalspritze<sup>7</sup> überführt, und 5x durch eine sterile Kanüle<sup>8</sup> mit der Größe von 0,90 x 70 mm gezogen.
- Dieser Vorgang wurde 20x mit einer sterilen Kanüle der Größe 0,60 x 80 mm<sup>9</sup> wiederholt.
- Es folgte eine Ultraschallbehandlung<sup>10</sup> von 3 min bei 10 % Zyklus und MS 72.
- Die beschallte Probe wurde in einer Glasmühle behandelt.
- Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis, wurde die Probe für 10 min beschallt.
- Die anschließende Zentrifugation<sup>11</sup> wurde bei 4100 x g für 10 min bei 4 °C durchgeführt.
- Während der Zentrifugation wurde die Säule mit 10 ml Puffer QRE äquilibriert.
- Der Überstand wurde vom Pellet getrennt und auf die vorbereitete Säule geladen.
- Das Waschen der Säule erfolgte mit 28 ml Puffer QRW.
- Anschließend wurde mit 15 ml Puffer QRU eluiert und das Eluat in 5 ml Fraktionen gesammelt.
- Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 1 mit eisgekühltem Isopropanol<sup>12</sup> vermischt und für 130 min ins Eisbad gestellt.
- Nach einer Zentrifugation bei 15000 x g für 10 min wurde das Pellet mit 4 ml 70 % Ethanol<sup>13</sup> versetzt und für 15 min bei 15000 x g zentrifugiert.
- Nach einer Inkubation von 15 min bei RT erfolgte eine Resuspension mit 330 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O<sup>14</sup>, unterstützt durch eine 3 minütige Inkubation<sup>15</sup> bei 60 °C.
- Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

---

<sup>7</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 0057.1

<sup>8</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. C722.1

<sup>9</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. C629.1

<sup>10</sup>Gerhard Heinemann, D-73529 Schwäbisch Gmünd, Branson Sonifer 250

<sup>11</sup>Heraeus Sepatech, D-70734 Fellbach, Biofuge 15

<sup>12</sup>Merck, D-64271 Darmstadt, Art.Nr. 9634

<sup>13</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 900

<sup>14</sup>Qiagen, D-40724 Hilden, Art.Nr. 14162

<sup>15</sup>Biometra, D-37079 Göttingen, TB1 Thermoblock

### 3.1.1. Messung der Nukleinsäurelösungen

Die Proben aus Kapitel 3.1 wurden wie folgt für die photometrische Messung vorbereitet:

- Die aufgetaute Probe wurden für 3 min bei 60 °C inkubiert.
- Anschließend wurden 10 µl von der Probe abgenommen und mit RNase freiem H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1 : 10 verdünnt.
- Die restliche Probe verbleibt während der Messung im Eisbad.
- Als Standard wurde bei der Messung RNase freies H<sub>2</sub>O eingesetzt.

Die Messung<sup>16</sup> erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

## 3.2. Polymerase-Kettenreaktion

### 3.2.1. Reverse Transkription

In diesem Protokoll wurde der kommerziell erhältliche Kit "First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)"<sup>22</sup> eingesetzt. Der Reaktionsansatz umfaßte 20 µl:

- 4,0 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2,0 µl Reaktionspuffer
- 2,0 µl dNTP Mix
- 2,0 µl Randomprimer
- 1,0 µl RNase Inhibitor
- 0,8 µl AMV-Reverse-Transcriptase
- 2,46 pg RNA aus Kapitel 3.1
- steriles Wasser, um das Endvolumen auf 20 µl einzustellen

Die bei -20 °C gelagerte RNA wurde vor der Zugabe zum Reaktionsansatz 15 min bei 65 °C aufgetaut, und anschließend noch für 5 min ins Eisbad gestellt. Folgende Reaktionszeiten wurden in einem Thermocycler<sup>23</sup> durchgeführt:

---

<sup>16</sup>SLT-Labinstruments, A-Salzburg, Easy Reader EAR 400AT

<sup>17</sup>siehe GenBank<sup>TM</sup> unter Nr. U19268 (ET19268, 1811 bp), Nr. M73495 (Etmic.1.oligo, 2379 bp), Nr.M21004 (ETANTTA, 1248 bp) und Nr. X15898 (ETSPORAN, 957 bp)

<sup>18</sup>TIB MOLBIOL Syntheselabor, 10829 Berlin

<sup>19</sup>Die Basen, die vor dem \* Zeichen stehen, sind zusätzlich zur Originalsequenz

<sup>20</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe

<sup>21</sup>Life Technologies GmbH, D-76344 Eggenstein

<sup>22</sup>Boehringer Mannheim GmbH, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1483188

<sup>23</sup>MJ Research, USA-Massachusetts, Peltier Thermal Cycler, Model PTC-200

Tabelle 3.1.: Primer für PCR

Name	Sequenz	Primergröße	Bindungsstelle <sup>17</sup>	Annealing in °C
Ettub-f	5'-TCC CTG CCA CTT CTT TCT TT 3'	20-mer	120	58,8 <sup>18</sup>
Ettub-r	5'-CAA CAC AAT TTC GCT GAT GC 3'	20-mer	1622	58,8
Etmic-f	5'-GCG GAT CC* <sup>19</sup> A GCC TCT TGG ATG TCA T 3'	25-mer	139	62; 61,3
Etmic-r	5'-ACG CGT CGA C*GC GGC GAC GTT TCC ATT 3'	27-mer	2139	62; 65,7
Etmic-f2	5'-CAG CCA GGC GCA ACT ACC AG 3'	20-mer	94	60,1 <sup>20</sup>
Etmic-r2	5'-GGC GGC GAC GTT TCC ATT TA 3'	20-mer	2137	60,1
Etmic-f4	5'-GCG GAT CC*G TGC AGA AAT CGC CGT GCC 3'	27-mer	1093	65,7
Etmic-r4	5'-AGC GGT CG*A CTG GGC ACG GCG ATT TCT G 3'	28-mer	1096	61,3
TA4-f	5'-CAG GAT TAC CCA ACA GCA GT 3'	20-mer	6	56,1
TA4-r	5'-CTG TCC AAT GCT GGT GTG TC 3'	20-mer	718	56,1
TA4-f2	5'-GCG GAT CC*C AGG ATT ACC CAA CAG CAG T 3'	28-mer	6	59,6
TA4-r2	5'-ACG CGT CGA C*CT GTC CAA TGC TGG TGT GTC 3'	30-mer	718	59,6
SO7-F6	5'-CGG GAT CC*G CTG TTG CTG CAG CAG ATT T 3'	28-mer	107	67,8 <sup>21</sup>
SO7-R6	5'-ACG CGT CGA C*CT GCA GGG CTA CCA GAA GAA 3'	30-mer	704	67,8

10 min      25 °C  
60 min      42 °C  
5 min        99 °C  
5 min        4 °C

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.2.2. PCR mit Einzelstrang-DNA als Template

In den PCRs wurde das "Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System"<sup>24</sup> verwendet. Das Protokoll wurde nach den Angaben des Herstellers für 50 µl Ansätze durchgeführt. Die Primer (siehe Tabelle 3.1) wurden in einer Endkonzentration von 10 µM eingesetzt, und das DNA-Template in unterschiedlichen Konzentrationen. Abweichend von den Herstellerangaben wurde der Enzym Mix nur mit 1,3 U/Ansatz eingesetzt.

<sup>24</sup>Boehringer Mannheim GmbH, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1732641

Die Reaktionszyklen wurden im Thermocycler mit folgenden Reaktionszeiten durchgeführt:

- Denaturieren 1 min bei 94 °C
- Annealing 1 min bei 56 - 68 °C (Primer abhängig, siehe Tabelle 3.1)
- Synthese 2 min bei 68 (72) °C
- Zyklen 25 (30)

Für den ersten Zyklus wurde die Denaturierung für 7 min, im letzten Zyklus die abschließende Synthese für 7 min, durchgeführt.

### 3.2.3. PCR mit aufgereinigten PCR-Fragmenten als Template

Der Reaktionsansatz umfaßte 100 µl oder 50 µl:

- DNA-Template (variierende Konzentrationen)
- 10 µM Endkonzentration der spezifischen Primer (siehe Tabelle 3.1)
- 2,5 nmol jedes dNTP (Endkonzentration)
- 2,5 U/µl PWO<sup>25</sup>- oder PfU-DNA-Polymerase<sup>26</sup>
- 1x Reaktionspuffer (siehe Enzym)
- steriles Wasser, um das Endvolumen auf 50 bzw. 100 µl einzustellen

Die Reaktionszyklen im Thermocycler wurden wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben durchgeführt.

Da die PCR sehr sensitiv ist, ist sie anfällig für Kontaminationen. Alle PCR-Reagenzien wurden daher gesondert von den PCR-Produkten gelagert und die Reagenzien wurden nur mit gesonderten Pipetten pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden nur unter Laminar-Flow zusammengestellt. Außerdem ist bei allen Experimenten ein Kontrollansatz mit allen Reagenzien, aber ohne DNA, mitgeführt worden.

## 3.3. Analyse und enzymatische Veränderungen von Nukleinsäuren

### 3.3.1. Vektoren

Die verwendeten Vektoren sind in der Tabelle 3.2 und in der Grafik 3.1 auf S. 31 dargestellt.

---

<sup>25</sup>Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, D-69123 Heidelberg, Art.Nr. A00798S

<sup>26</sup>Stratagene GmbH, D-69044 Heidelberg, Art.Nr. 600135

Tabelle 3.2.: Vektorenliste

Name	Antibiotikaresistenz
pBluescript II SK (+/-) <sup>27</sup>	Ampicillin
pQE-30 <sup>28</sup>	Ampicillin
pMMB207.1 <sup>29</sup>	Chloramphenicol
pRK2013 <sup>30</sup>	Kanamycin

### 3.3.2. Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten (Ligation)

- Die Ligation von DNA-Fragmenten mit einem linearisierten Vektor (siehe Tabelle 3.2) erfolgte in 10 - 20  $\mu\text{l}$  Ansätzen in Ligationspuffer (siehe Enzym). Verwendet wurden 0,02 - 0,5 pmol linearisierter Vektor zusammen mit der zwölffach höheren molekularen Menge an Fragment-DNA. Die T4-DNA-Ligase<sup>31</sup> wurde mit 4 U pro 100 ng Gesamtmaterial eingesetzt. Der linearisierte Vektor und die DNA-Fragmente wurden zusammen mit dem T4-Ligase-Puffer für 10 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe der Ligase und 1 mM ATP erfolgte eine Inkubation ÜN bei RT.
- Ligation von *Escherichia coli*-Fragmenten: Zu 1  $\mu\text{l}$  Ligase<sup>32</sup> und 1  $\mu\text{l}$  Ligasepuffer (siehe Enzym) wurde die Insert-DNA im Überschuß gegenüber der Vektor-DNA (siehe Tabelle 3.2) hinzugefügt. Nach dem Auffüllen des Volumens mit sterilem Wasser auf 10  $\mu\text{l}$ , wurde der Ansatz ÜN im Wasserbad bei 12 °C inkubiert.

### 3.3.3. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden von DNA

Die Dephosphorylierung erfolgte durch Alkalische Phosphatase<sup>33</sup>. Der Inkubationsansatz (20  $\mu\text{l}$ ) bestand aus 1 U alkalischer Phosphatase, 2  $\mu\text{l}$  10x Puffer (siehe Enzym) und 500 ng DNA. Nach einer Inkubation für 60 min bei 37 °C erfolgte eine Inaktivierung der Phosphatase durch eine Inkubation bei 75 °C für 10 min.

<sup>27</sup>MBI Fermentas GmbH, D-68789 St.Leon-Rot

<sup>28</sup>Qiagen GmbH, D-40724 Hilden, Art.Nr. 33303

<sup>29</sup>zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Beyer, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, Stuttgart

<sup>30</sup>zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Beyer, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, Stuttgart

<sup>31</sup>New England Biolabs GmbH, D-65820 Schwalbach/Taunus, Art.Nr. 202S

<sup>32</sup>MBI Fermentas GmbH, D-68789 St.Leon-Rot, Art.Nr. EL 0015

<sup>33</sup>Boehringer Mannheim GmbH, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 713023

# Klonierungsstrategie

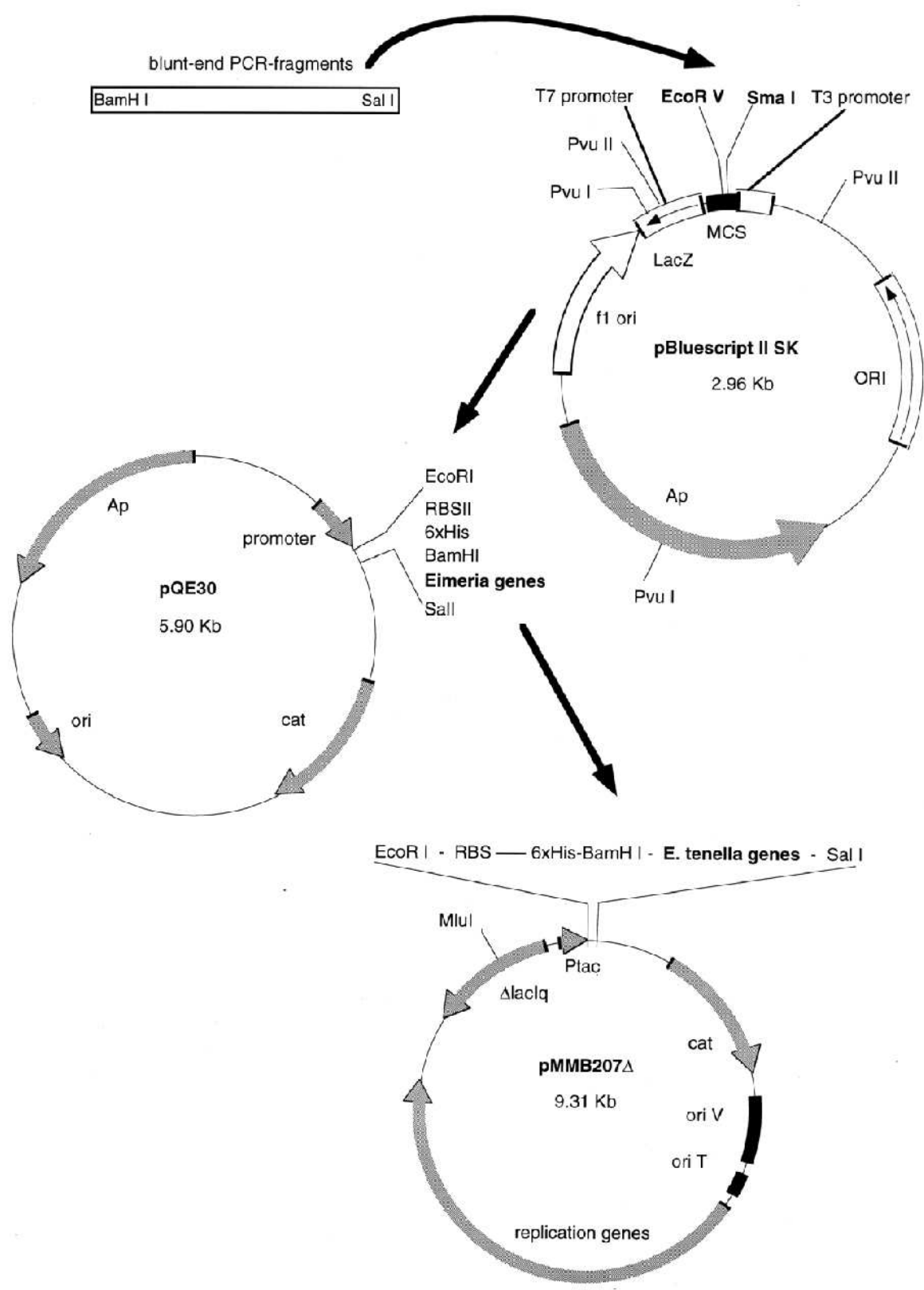


Abbildung 3.1.: Vektorenkarte

## 3.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren

### 3.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

1. Schnellisolierung von Plasmid-DNA mittels CTAB (Miniprep):

- ÜN-Kultur der gewünschten Bakterien in LB-Medium (siehe Anhang) mit Antibiotikum.<sup>34 35 36</sup>
- 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden in einem Eppendorf-Gefäß<sup>37</sup> pelletiert, der ÜS verworfen und das Pellet in 200  $\mu$ l STET (siehe Anhang) resuspendiert.
- Nach Zugabe von 4  $\mu$ l Lysozym<sup>38</sup> wurde 5 min bei RT inkubiert.
- Die Suspension wurde 45 sec aufgekocht und 10 min mit 1500 x g zentrifugiert.
- Das Pellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt und zu dem ÜS wurden 5  $\mu$ l RNase<sup>39</sup> gegeben.
- Inkubation für 10 min bei 65 °C.
- Zugabe von 10  $\mu$ l 10 % CTAB<sup>40</sup>-Lösung und Zentrifugation für 5 min bei 15000 x g.
- Das Präzipitat wurde in 300  $\mu$ l 1,2 M NaCl<sup>41</sup> gelöst und mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 20  $\mu$ l TE (siehe Anhang) resuspendiert.

2. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA:

Für alle präparativen Isolierungen wurden 5, 10 oder 50 ml Medium (+ Antibiotikum) mit einer Bakterienkolonie beimpft, und ÜN bei 37 °C unter Schütteln<sup>42</sup> inkubiert.

a) mittels "Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit 50"<sup>43</sup>

- Von einer ÜN-Kultur wurden bis zu 4,0 ml eingesetzt. Zuerst wurde die ÜN-Kultur mit 14000 x g; 5 min; RT zentrifugiert.
- Nach Pelletieren der Bakterien erfolgten die Lyse- und Reinigungsschritte nach Angaben des Herstellers.

---

<sup>34</sup>Chloramphenicol, Boehringer Ingelheim, D-55218 Ingelheim, Art.Nr. 16785

<sup>35</sup>Ampicillin, Boehringer Mannheim GmbH, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 835269

<sup>36</sup>Kanamycin, Boehringer Mannheim GmbH, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 106801

<sup>37</sup>Biozym, D-31833 Hess. Oldendorf, Art.Nr. 710160

<sup>38</sup>Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art.Nr. L6876

<sup>39</sup>Boehringer Mannheim GmbH, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 109126

<sup>40</sup>Serva, D-69115 Heidelberg, Art.Nr. 16530.04

<sup>41</sup>Merck KGaA, D-64271 Darmstadt, Art.Nr. 1.06400.1000

<sup>42</sup>Adolf Kühner AG, Feinmechanik und Apparatebau, CH-4052 Basel

<sup>43</sup>Genomed, D-32545 Bad Oeynhausen, Art.Nr. 40050



- Die Ethanol-gefällte DNA wurde in 20  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen.
- b) mittels "FlexiPrep Kit/Procedure B: Purification of Plasmid DNA from 50 ml Cultures of *Escherichia coli*" (Midiprep-Procedure)<sup>44</sup>
- 50 ml einer ÜN-Kultur wurden mit 7700 x g; 10 min; 4°C zentrifugiert<sup>45</sup> und anschließend nach Angaben des Protokolls B weiterbehandelt.
- c) mittels "FlexiPrep Kit/Procedure A: Purification of Plasmid DNA from 1,5 ml Cultures of *Escherichia coli*" (Miniprep-Procedure)<sup>46</sup>
- 1,5 ml einer ÜN-Kultur wurden mit 14000 x g; 1 min; RT zentrifugiert und dann nach dem Protokoll A weiterbehandelt.
  - Die DNA wurde entweder mit 30  $\mu\text{l}$  oder mit 50  $\mu\text{l}$  TE vom Sephaglas gelöst.

### 3.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarosegelen

Mit den unter UV-Licht manuell aus dem Agarosegel ausgeschnittenen DNA-Banden wurde die Isolierung entweder nach dem Protokoll "DNA-Extraktion aus Agarosegelen" Easy Pure<sup>47</sup> oder nach dem Protokoll "Jetsorb Gel Extraction Kit/150"<sup>48</sup>, durchgeführt

---

<sup>44</sup>Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 27-9281-01

<sup>45</sup>Heraeus Sepatech, D-70736 Fellbach, Suprafuge 22

<sup>46</sup>Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 27-9281-01

<sup>47</sup>Biozym, D-31833 Hess. Oldendorf, Art.Nr. 39.0001

<sup>48</sup>Genomed, D-32545 Bad Oeynhausen, Art.Nr. 110150

### 3.5. Bakterienstämme

Die in Tabelle 3.3 aufgeführten Bakterienstämme wurden bei den Arbeiten verwendet. Außer *Zoosaloral H* handelt es sich dabei um *Escherichia coli* Stämme.

Tabelle 3.3.: Bakterienstämme

Name	Antibiotikaresistenz
XL1-Blue <sup>49</sup>	Tetrazyklin
SCS 110 <sup>50</sup>	keine
Top 10F <sup>51</sup>	Tetrazyklin
JM 109 <sup>52</sup>	keine
HB101 <sup>53</sup>	keine
<i>Zoosaloral H</i> <sup>(R)</sup>	keine

### 3.6. Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

1. nach Inoue (Inoue et al., 1990):

- 125 ml Medium wurden mit einer Bakterienkolonie (siehe Tabelle 3.3) beimpft und bei 21 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 inkubiert.
- Vor dem Abzentrifugieren der Bakterien bei 2500 x g; 4 °C; 10 min wurden diese 10 min auf Eis inkubiert. Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem TB (siehe Anhang) aufgenommen, und erneut für 10 min auf Eis gestellt.
- Erneutes Abzentrifugieren und Resuspendieren des Pellets mit 10 ml eiskaltem TB. Unter leichtem Schwenken wurden bis 7 % DMSO<sup>54</sup> zugegeben.
- 1 ml Aliquots der Bakteriensuspension wurden in Einfrierröhrchen<sup>55</sup> in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2. nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) variiert:

- 1 ml einer ÜN-Kultur (siehe Tabelle 3.3) wurden in 50 ml Medium überimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,2 inkubiert.

<sup>49</sup>MBI Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot

<sup>50</sup>Stratagene, D-69044 Heidelberg, Art.Nr. 200275

<sup>51</sup>Invitrogen, Nd-9351 NV Leek, Art.Nr. C3030-03

<sup>52</sup>Stratagene, D-69044 Heidelberg, Art.Nr. 200271

<sup>53</sup>Invitrogen, Nd-9351 NV Leek, Art.Nr. C661-55

<sup>54</sup>Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art.Nr. D5879

<sup>55</sup>Nalge Nunc International, D-65203 Wiesbaden, Art.Nr. 5000-0012

- Nach dem Abzentrifugieren bei 1200 x g; 4°C; 10 min wurde das Pellet mit 25 ml eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung (siehe Anhang) resuspendiert, und für 30 min auf Eis belassen.
- Erneutes Abzentrifugieren und Resuspendieren des Pellets mit 200  $\mu$ l eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung.

### 3.7. Identifizierung rekombinanter Bakterienklone

Zur Identifizierung von rekombinanten Bakterienklonen wurde eine Restriktionsanalyse des isolierten Plasmides, oder eine "Blau-Weiß-Selektion", oder eine PCR durchgeführt. Nach einer DNA-Präparation nach dem Protokoll "Miniprep Procedure" von Pharmacia (siehe Kapitel 3.4.1 / Endvolumen: 50  $\mu$ l) wurde folgende PCR mit einem Volumen von 100  $\mu$ l angesetzt:

- 1,25  $\mu$ M dNTPs<sup>56</sup>
- 1x Puffer Polymerase (siehe Enzym)
- 1  $\mu$ M Endkonzentration der Lower und Upper Primer (siehe Tabelle 3.1)
- 2,5 U Polymerase<sup>57</sup>
- Das Endvolumen wurde auf 100  $\mu$ l mit sterilem Wasser aufgefüllt.

Nach der Zugabe von 60  $\mu$ l Paraffin<sup>58</sup> und 1, 5  $\mu$ l DNA (siehe oben) wurde kurz anzentrifugiert und eine "block control" mit folgenden Reaktionszeiten im Thermozykler<sup>59</sup> durchgeführt:

Start	94 °C	4,00 min
Denaturieren	94 °C	1,00 min
Annealing	68 °C	90 sec
Synthese	73 °C	90 sec
Ende	72 °C	9,00 min

Das Programm wird mit 25 Schleifen gefahren. Nach der letzten Schleife stellte sich die Temperatur im Thermozykler auf 8 °C ein. Es schloß sich eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte an.

<sup>56</sup>Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 272035-01

<sup>57</sup>Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 27-0799-01

<sup>58</sup>Merck, D-64271 Darmstadt, Art.Nr. 1.07160.1000

<sup>59</sup>Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Rudolf-Wissel Str. 30, D-37079 Göttingen

## 3.8. Langzeitlagerung von Bakterien-Zellen

### 3.8.1. Lagerung bei -80 °C

- Medium (+ Antibiotikum) mit Kolonie beimpft und ÜN bei 37 °C unter Schütteln wachsen lassen.
- In einem Einfrierröhrchen 100 µl Einfriermedium<sup>60</sup> vorgelegt und mit 900 µl der Bakteriensuspension aufgefüllt.
- Sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.8.2. Lagerung bei -70 °C

- Medium (+ Antibiotikum) mit Kolonie beimpft und ÜN bei 37 °C unter Schütteln wachsen lassen.
- In einem 1,5 ml Plastikröhrchen 300 µl Glycerin<sup>61</sup> und 700 µl der Bakteriensuspension miteinander vermischt, und bei -70 °C gelagert.

## 3.9. Konjugation von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*

Für die Konjugation wurde außer dem rekombinanten *Escherichia coli* Stamm und dem *Salmonella* Stamm noch ein weiterer Bakterienstamm, der *Escherichia coli* Stamm HB101 mit dem Plasmid pRK 2013, benötigt.

- ÜN-Kultur der oben angegebenen Bakterienstämme mit dem jeweiligen Antibiotikum.
- Zentrifugation für 1 min mit 1200 x g und bei RT.
- Das Pellet wurde mit Medium resuspendiert.
- Wiederholung der zwei letzten Schritte.
- Die drei Bakteriensuspensionen wurden im Verhältnis 1:1:1 zusammengeführt.
- Maximal 3 ml der gemischten Bakteriensuspension wurden auf eine Standard I-Agarplatte<sup>62</sup> gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt.
- Inkubation bei 37 °C ÜN.

---

<sup>60</sup>Hogness-Einfriermedium, siehe Anhang

<sup>61</sup>Merck KGaA, D-64271 Darmstadt, Art.Nr. 1.04092.1000

<sup>62</sup>Merck, D-64271 Darmstadt, Art.Nr. 7881

- Nach der ÜN-Inkubation wurde die auf dem Agar verbliebene Flüssigkeit abgenommen oder die inkubierte Bakteriensuspension wurde durch Spülen mit Minimal-Medium (siehe Anhang) aufgenommen und in ein Plastikröhrchen überführt.
- Zentrifugation mit 1200 x g für 1 min bei RT.
- Das Pellet wurde mit 1 ml Minimal-Medium resuspendiert.
- 100  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension wurden in 10 ml Minimal-Medium mit Antibiotikum überimpft, und Minimal-Medium Platten (siehe Anhang) mit Antibiotikum wurden mit 10  $\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension ausplattiert.
- Die Platten wurden bei 37 °C ÜN inkubiert. Das Medium wurde bei 37 °C und 220 U/min auf den Schüttler gestellt, und alle 12 h erfolgte eine Subkultivierung in Minimal-Medium.
- Die Kolonien von den inkubierten Minimal-Medium Platten bzw. die Bakteriensuspension aus dem inkubierten Minimal-Medium wurden auf XLD-Agarplatten<sup>63</sup> mit Antibiotikum ausgestrichen, und ÜN bei 37 °C inkubiert.
- Kolonien, welche durch ihre Einzelmorphologie für Salmonellen sprachen, wurden von der XLD-Agarplatte gepickt und in Standard I-Medium überimpft.
- Überprüfung durch Isolierung des Plasmides und anschließender Restriktionsanalyse.

Die Klassifizierung der rekombinanten Salmonellen wurde durch eine Objektträgeragglutination<sup>64 65</sup> der von Std.I-Agar gepickten Einzelkolonien überprüft. Desweiteren wurde die Einzelmorphologie, die H<sub>2</sub>S-Bildung und Laktoseverwertung der Kolonien auf XLD-Agar beurteilt. Ein weiteres Kriterium war die Lumineszens der rekombinanten Salmonellen. Unter anderem wurde auch die Reinheit der Probe beurteilt. Erst nach Abschluß dieser aufgeführten Untersuchungen wurde eine Probe zur Langzeitlagerung bei -70 °C hergestellt.

### 3.10. Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen in *Escherichia coli*

- ÜN-Kultur eines transformierten Bakterienklons in LB-Medium mit Antibiotikum.
- Die ÜN-Kultur wurde im Verhältnis 1:10 mit LB-Medium (+ Antibiotikum) gemischt und bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

---

<sup>63</sup>Difco Laboratories GmbH, D-86156 Augsburg, Art.Nr. 0788-01

<sup>64</sup>Salmonella-Testserum, polyvalent I; Gruppe A-E4, Behringwerke AG, D-35037 Marburg, Art.Nr. 229856

<sup>65</sup>Salmonella-Testserum-Anti O4 (B), Difco Laboratories GmbH, D-86156 Augsburg, Art.Nr. 2659-47

- Nach dem Erreichen einer  $OD_{600nm} = 0,6$  wurde IPTG<sup>66</sup> mit einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben, und für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert.
- Zentrifugation bei 4 °C und 4000 x g für 10 min.
- Das Pellet wurde mit Lysepuffer A (siehe Anhang) resuspendiert. Die Menge des Lysepuffers A entsprach dem Volumen der Bakteriensuspension (vor der Zentrifugation) multipliziert mit dem Faktor 0,05.
- Die Bakteriensuspension wurde in eine Becherglas überführt und mit einem Magnetrührer 1 h lang auf Eis inkubiert.
- Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g für 20 min.
- Die Ni-NTA-Matrix<sup>67</sup> wurde mit dem Lysepuffer A vorbereitet. Dafür wurde pro 1 ml Ni-NTA-Matrix 2 ml Lysepuffer A verwendet. Nach dem Mischen wurde kurz anzentrifugiert, und der Überstand entnommen. Die Resuspension erfolgte mit dem gleichem Volumen von Lysepuffer A.
- Der Überstand der Bakteriensuspension wurde mit der vorbereiteten Ni-NTA-Matrix gemischt. Pro 1 ml Überstand wurden 0,05 ml vorbereitete Ni-NTA-Matrix verwendet.
- Das Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler<sup>68</sup> inkubiert.
- Das Gemisch wurde in eine leere Säulenform<sup>69</sup> gegeben, und mit Puffer B (siehe Anhang) gewaschen. Das Volumen der Puffer B, C und E wurde über das eingesezte Volumen der vorbereiteten Ni-NTA-Matrix, multipliziert mit dem Faktor 8 berechnet.
- Der Waschschrift wurde mit Puffer C (siehe Anhang) wiederholt.
- Die Elution wurde mit dem Elutionspuffer E (siehe Anhang) durchgeführt.
- Die Elutionsfraktionen wurden in 1 ml Aliquots gesammelt.
- Die Fraktionen wurden durch ein SDS-PAGE analysiert und positive Aliquots wurden gepoolt.
- Eine Lagerung erfolgte bei -20 °C.
- Die gepoolten Elutionsfraktionen wurden gegen 7/6/5/4/3/2/1/0,5 M Harnstoff<sup>70</sup>, 50 mM Tris<sup>71</sup>, pH 7,4 dialysiert<sup>72</sup>.

---

<sup>66</sup>IPTG, Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 2316.3

<sup>67</sup>Qiagen, D-40724 Hilden, Art.Nr. 30410

<sup>68</sup>Heidolph-Elektro KG, D-8420 Kelheim, Heidolph Reax 2

<sup>69</sup>Qiagen, D-40724 Hilden, Art.Nr. 34964

<sup>70</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 3941.2

<sup>71</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 4855.2

<sup>72</sup>Serva GmbH, D-69115 Heidelberg, Art.Nr. 44110.01

- Nach der Gradientenstufe mit 0,5 M Harnstoff wurde 3x gegen PBS (siehe Anhang) dialysiert.
- Die Dialyse erfolgte bei allen Gradientenstufen für 30 Min. Einzige Ausnahme war die Stufe mit 0,5 M Harnstoff, diese wurde 90 min durchgeführt.

### 3.10.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung mittels BCA-Reagenzien

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde "BCA Protein Assay Reagent"<sup>73</sup> verwendet. Standardverdünnungen von BSA wurden nach den Vorschlägen des Herstellers angefertigt. Die BSA-Konzentrationen lagen zwischen 25 - 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

- Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in einer Mikrotiterplatte<sup>74</sup>.
- Die Proben wurden mit einer Titration in log<sub>2</sub>-Stufen einpipettiert.
- Für die Negativkontrolle wurde PBS verwendet.
- Standardverdünnung von BSA, Negativkontrolle und Proben titration wurden als Doppelbestimmungen mit einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$ /Kavität durchgeführt.
- In alle Vertiefungen wurden 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz pipettiert.
- Die abgedeckte Platte wurde bei 37 °C inkubiert.
- Messungen erfolgten mit Hilfe eines Microplate-Readers<sup>75</sup> bei 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm), nach 15, 30, 45 und 60 min Inkubationszeit.

### 3.10.2. Konzentrierung der Proteinlösungen

Zur Konzentrierung der dialysierten, rekombinanten Proteinlösungen wurden "Centriplus Concentrators"<sup>76</sup> mit einer Membrangröße von 10 kD verwendet.

- Nach dem Füllen der Probe in das Probengefäß wurde dieses zusammen mit dem Filtratgefäß in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gestellt.
- Zentrifugation<sup>77</sup> bei 1500 x g und 4 °C bis die Probe auf das gewünschte Volumen eingengt wurde.
- Der Probebehälter wurde 180 °C gedreht, und auf das Retentatgefäß gesteckt.

<sup>73</sup>KMF Laborchemie Handels GmbH, D-53757 St. Augustin, Art.Nr. 23225ZZ

<sup>74</sup>Nunc, D-65203 Wiesbaden, Art.Nr. 149026

<sup>75</sup>SLT-Labinstruments, A-Salzburg, EASY READER EAR 400 AT

<sup>76</sup>Millipore GmbH, D-65731 Eschborn, Art.Nr. 4411

<sup>77</sup>Heraeus Sepatech, D-70736 Fellbach, Varifuge 3.2 RS

- Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C für 4 min.
- Nach Überprüfen des Retentatsvolumens wurde die Probe erneut im BCA-Test gemessen.

## 3.11. Tierversuch Stuttgart

Der Tierversuch Stuttgart wurde mit weiblichen Eintagsküken<sup>78</sup> von weißen Legehennen durchgeführt, die zweimal gegen Marek geimpft wurden. Die Genehmigung des Tierversuches nach dem Tierschutzgesetz vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S.1105) wurde vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Bezeichnung "Versuchs-Nr. HOH 2/98" erteilt. Das Versuchsvorhaben verlief unter folgendem Titel: "Immunisierung von Hühnern mit einem rekombinanten Salmonellenimpfstamm gegen Eimeriosen des Huhnes".

### 3.11.1. Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in Edelstahl-Etagenkäfigen mit den Massen 38 x 44 x 50 cm (H x B x Tiefe) eingestallt<sup>79</sup>. Die Besatzdichte betrug 2 Tiere pro Käfig. In den ersten Lebenstagen wurde der Gitterboden abgedeckt. Die Käfige wurden im Stall Rückenwand zu Rückenwand aufgestellt, siehe Abbildung 3.2.

Die Umgebungstemperatur wurde entsprechend dem Wärmebedürfnis der Tiere eingestellt, d. h. in der ersten Lebenswoche auf 35 °C und dann erfolgte eine wöchentliche Absenkung um 3 °C, bis 25 °C erreicht wurden. Die Luftfeuchtigkeit betrug 60 - 70 %. Das Lichtprogramm wurde mit einer 4 stündigen Dunkelphase ab 0.00 Uhr gefahren. Während den ersten beiden Lebenstagen der Küken wurde keine Dunkelphase durchgeführt. Futter und Wasser wurden ad libitum angeboten. Das Trinkwasser wurde in Stulptränken angeboten. Den Tieren wurde ein Küken-Aufzucht-Alleinfutter (siehe Anhang) ohne Zugabe von Antikozidium gefüttert. Die Tiere wurden in der 5. Lebenswoche mit einem Kombinationsimpfstoff für Infektiöse Bronchitis und Newcastle Krankheit<sup>80</sup> behandelt. Die Verabreichung erfolgte nach den Empfehlungen des Impfstoffherstellers. Am nächsten Tag wurde eine Trinkwasser-Desinfektion<sup>81</sup> durchgeführt.

### 3.11.2. Versuchsplan

Die 110 Tiere wurden willkürlich aus einer Grundgesamtheit ausgewählt. Die Tiere wurden nach einem Zufallsverfahren einer der 11 Gruppen zugeteilt. Die Gruppengröße betrug 10 Tiere. Die Tiere wurden über ihre Gruppennummer und Tiernummer bezeichnet, z. B. 3/7 ist das siebte Tier aus Gruppe 3. Die Gruppe 11 diente als Stall- und

<sup>78</sup>LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetriebe GmbH, D-88471 Laupheim, Stauffenbergstr. 11

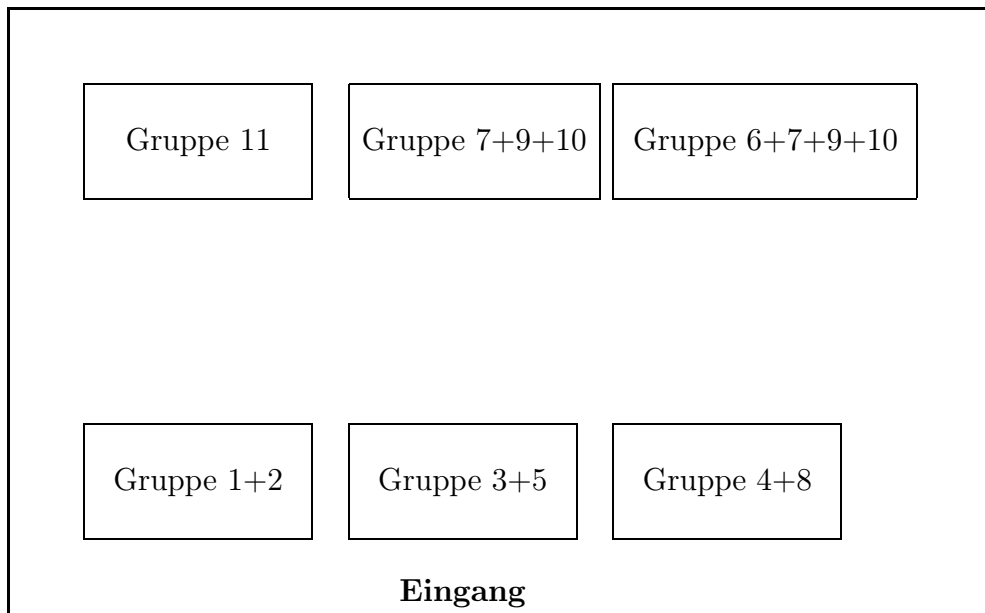
<sup>79</sup>Universität Hohenheim, Versuchsstation für Tierhaltung, Tierzüchtung und Kleintierzucht, D-72800 Eningen, Unterer Lindenhof

<sup>80</sup>Lohmann Animal Health GmbH & Co KG, D-27472 Cuxhaven, Art.Nr. 98032703

<sup>81</sup>Schülke & Mayr, D-22840 Norderstedt, Lysaton



Abbildung 3.2.: Schema zur Aufstellung der Etagenkäfige im Stall



Bestandskontrolle. Der Versuchsplan ist in der Tabelle 3.4 dargestellt. Bei den applizierten rekombinanten Salmonellenstämmen handelte es sich um Reisolat vom Huhn bzw. Maus. Der Gruppe 9 wurde nur ein PBS-CFA<sup>82</sup>-Gemisch (Placebo-Gruppe) verabreicht. Diese Gruppe diente als Negativkontrolle im ELISA.

Bei oraler Applikation wurde eine Dosis von  $10^{10}$  KBE des rekombinanten Salmonellenstammes verabreicht. Die Proteinmenge pro Injektion betrug  $50 \mu\text{g}$ . Vor der oralen Applikation wurde den Tieren 4 h lang das Futter entzogen, und nach der Verabreichung wieder angeboten.

### 3.11.3. Herstellung und Applikation der Versuchsdosen

#### 1. orale Applikation:

- Std.I-Medium mit Antibiotikum wurde mit den Langzeit gelagerten rekombinanten Salmonellenstämmen beimpft und ÜN bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt.
- Die ÜN-Kultur wurde im Verhältnis 1:10 mit Std.I-Medium vermischt und bei  $37^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler inkubiert.
- Nach dem Erreichen einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,2 erfolgte eine Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $1200 \times g$  für 10 min.
- Resuspension mit PBS und Wiederholung der Zentrifugation.

<sup>82</sup>Sigma Chemie GmbH, D-8024 Deisenhofen, Art.Nr. F-5881

Tabelle 3.4.: Versuchsplan

Lebenstag	Gruppennummer	Impfstoff-Kandidat	Applikationsform	Applikationsvolumen
1.	1	ZluxSO7	oral	0,2 ml
14.	1	ZluxSO7	oral	0,5 ml
	2	ZluxSO7	oral	0,5 ml
	3	ZluxTA4	oral	0,5 ml
	4	ZluxSO7	oral	0,5 ml
	5	ZluxTA4	oral	0,5 ml
	6	SO7	subcutan	1,0 ml
	7	TA4-2	subcutan	1,0 ml
	8	Zlux207.1	oral	0,5 ml
	9	CFA	subcutan	1,0 ml
	10	3Etmic	subcutan	1,0 ml
21.	1	ZluxSO7	oral	0,5 ml
35.	4	SO7	subcutan	1,0 ml
	5	TA4-2	subcutan	1,0 ml
	6	SO7	subcutan	1,0 ml
	7	TA4-2	subcutan	1,0 ml
	9	CFA	subcutan	1,0 ml
	10	3Etmic	subcutan	1,0 ml
60.	alle		Tötung	

- Resuspension mit PBS im Verhältnis 50:1 (bei Applikationsvolumen von 200  $\mu$ l) bzw. 20:1 (bei Applikationsvolumen von 500  $\mu$ l).
- Bis zur Applikation wurden die Proben auf Eis gelagert.
- Den Tieren wurde circa 4 h vor der Applikation das Futter entzogen.
- Vor der Applikation wurde die Probe durch Pipettieren durchmischt, und dann mit entsprechendem Applikationsvolumen in sterilen Plastikröhrchen vorgelegt.
- Die Dosis wurde über eine Knopfkanüle<sup>83</sup> in eine Einmalspritze<sup>84</sup> aufgezogen.
- Die Knopfkanülen wurden nach einem Applikationstag mit Desinfektionsmittel<sup>85</sup> desinfiziert und mit Wasser nachgespült. Anschließend wurden die

<sup>83</sup>Nordland Medizin-Logistik und -Service GmbH, D-22045 Hamburg, Art.Nr. 370.138

<sup>84</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. H999.1

<sup>85</sup>Schülke & Mayr, D-22840 Norderstedt, Lysovet PA

Knopfkanülen mit eingeschobenem Mandrin in Aluminium einzeln verpackt im Autoklaven sterilisiert.

Zur Überprüfung der Konzentration der Versuchsdosen wurden Verdünnungen mit 0,9 % NaCl-Lösungen hergestellt. Die Verdünnungsstufen wurden anschließend auf Std.I-Agar mit Antibiotikum ausgestrichen (pro Stufe zwei Platten), und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung der Kolonien. Zusätzlich wurden die Kolonien über eine Objektträgeragglutination auf ihre Spezies getestet. Desweiteren erfolgte ein Ausstreichen der Versuchsdosen auf XLD-Agar mit Antibiotikum. Nach einer ÜN-Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien bezüglich ihrer Einzelmorphologie, H<sub>2</sub>S-Bildung und Laktoseverwertung beurteilt, und auf ihre Leuchtfähigkeit im Dunklen überprüft

## 2. subcutane Applikation

- Die Proteinlösungen wurden bei RT aufgetaut.
- CFA wurde mit einem Endverhältnis von 1:1 im Gefäß vorgelegt.
- Unter Vortexen wurde die Proteinlösung zu dem CFA pipettiert.
- Das Gemisch wurde bis zur Applikation auf Eis gelagert.
- Vor der Applikation wurde das Gemisch durch mehrmaliges auf und ab Pipettieren homogenisiert.
- Die Dosis wurde über eine Einmalkanüle<sup>86</sup> in eine Einmalspritze aufgezogen.
- Die Injektion erfolgte in eine Hautfalte im Nackenbereich der Tiere.

### 3.11.4. Probenentnahme

- Circa 4 h vor der Tötung wurde den Tieren das Futter entzogen.
- Die Tötung erfolgte durch Kohlendioxid.
- Die Tierkörper wurde vollständig in Desinfektionsmittel eingetaucht.
- Nach Abtropfen des Desinfektionsmittels wurde die Brust- und Bauchhöhle mit sterilen Instrumenten eröffnet.
- Die Herzpunktion mit Blutentnahme bzw. die Gallenpunktion mit Entnahme der Gallenflüssigkeit erfolgte mit Einmalkanülen und Einmalspritzen.
- Die entnommenen Proben wurden in Plastikröhrchen (maximal 1 ml) überführt.
- Die Gallenflüssigkeitenproben wurden bei -70°C eingefroren.
- Die Blutproben wurden bis zu 2 h bei RT stehengelassen, und anschließend für 10 min bei RT und mit 3000 x g zentrifugiert.

---

<sup>86</sup>Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. C721

- Das Serum wurde abgenommen und in neue, sterile Plastikröhrchen (maximal 1 ml) überführt.
- Lagerung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Die 1 ml Proben wurden nach ihrem ersten Auftauprozess erneut in  $100\text{ }\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt, und wieder bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.
- Die Tierkörper wurden nach der Probenentnahme autoklaviert und durch eine Tierkörperbeseitigungsanlage entsorgt.

## 3.12. Tierversuch Budapest

Der Tierversuch wurde mit der Unterstützung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Budapest durchgeführt. Die weiblichen Eintagsküken von weißen Legehühnern stammen aus einer ungarischen Brüterei.

### 3.12.1. Haltung der Tiere

Die Haltungsbedingungen entsprachen denen des Tierversuches Stuttgart. Die sechs Versuchsgruppen wurden in einem "infizierten" und in einem "nicht infizierten" Raum aufgestellt, d. h. Gruppe 1, 2 und 6 waren räumlich von Gruppe 3, 4 und 5 getrennt. Die Besatzdichte betrug 10 bzw. 11 Tiere pro Käfig.

### 3.12.2. Versuchsplan

Die Auswahl der Tiere und die Zuteilung zu den einzelnen Versuchsgruppen siehe Tierversuch Stuttgart. Die Gruppengröße betrug bei den Versuchsgruppen 1, 2 und 6 jeweils 54 Tiere, bei den restlichen Gruppen 50 Tiere. Die Gruppe 3 diente als Stall- und Bestandskontrolle, und wurde somit nur aufgestellt. Die Gruppe 5 wurde wie die Gruppe 3 behandelt, außer das ihrem Futter nach den Empfehlungen des Herstellers Antikozidium<sup>87</sup> beigemischt wurde. Der Gruppe 4 (Placebo-Gruppe) wurde nur PBS verabreicht. Bei Gruppe 1 und 2 wurden die gleichen rekombinanten Salmonellenstämme wie im Tierversuch Stuttgart verwendet. Der Gruppeneinteilung und der Versuchsplan ist in der Tabelle 3.5 dargestellt.

Die Applikation aller Impfstoff-Kandidaten bzw. Kontrollen wurde oral durchgeführt. Am ersten Lebenstag der Tiere wurden  $200\text{ }\mu\text{l}$  pro Tier verabreicht. Die Dosis pro Tier betrug  $10^8$  KBE des rekombinanten Salmonellenstammes. Die Applikationen am 14. und 21. Lebenstag wurden mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  Volumen und Dosen von  $10^9$  bzw.  $10^{10}$  KBE des rekombinanten Salmonellenstammes durchgeführt.

Eine Belastungsinfektion mit *Eimeria tenella* Oozysten vom Houghton Stamm (siehe Kapitelanfang) erfolgte am 28. Lebenstag der Tiere. Den Tieren wurden  $3 - 5 \times 10^4$

---

<sup>87</sup>Clinacox, Jansen/Ungarn, Substanz: Diclazuril

Tabelle 3.5.: Gruppeneinteilung

Gruppennummer	Impfstoff-Kandidat	orale Applikation	Belastungsinfektion
1	ZluxTA4	1., 14. und 21. d	+
2	Zlux3Emic	1., 14. und 21. d	+
3	Stallkontrolle	-	-
4	PBS	1., 14. und 21. d	+
5	Antikokzidium	-	+
6	Zlux207.1	1., 14. und 21. d	+

sporulierte Oozysten oral unter Verwendung einer Knopfkanüle verabreicht. Alle Tiere wurden an ihrem 35. Lebenstag getötet.

### 3.12.3. Herstellung und Applikation der Versuchsdosen

Siehe Tierversuch Stuttgart, Kapitel 3.11.3.

### 3.12.4. Probenentnahme

- Futterentzug circa 7 Stunden vor der Tötung.
- Die Tiere wurden nach einer Betäubung mit elektrischen Strom durch Enthauptung getötet.
- Zur Serumgewinnung wurde das Blut direkt in ein Glasgefäß getropft.
- Weitere Schritte siehe Tierversuch Stuttgart.
- Die Gewinnung der Gallenflüssigkeit siehe Tierversuch Stuttgart.
- Alle Proben wurden auf 4 °C gekühlt transportiert.
- Serum- und Gallenflüssigkeitproben wurden dann bei -20 °C gelagert.

### 3.12.5. Reisolierung der rekombinanten *Salmonella* aus Kotproben

Nach jedem Impftermin wurden Kotproben der Versuchsgruppen 1, 2, 5 und 6 gesammelt. Die Kotproben wurden in Form einer Sammelprobe pro Käfig entnommen. Die Sammelproben von Versuchsgruppe 5 wurden zusammengeführt, da sie zur Kontrolle des nicht infektiösen Raumes dienen. Die Probenentnahme erfolgte nach jedem Impftermin sechs Tage lang.

- Es wurden 10 g Kot in 90 ml steriles, gepuffertes Peptonwasser<sup>88</sup> mit Antibiotikum-

<sup>88</sup>Oxoid GmbH, D-46467 Wesel, Art. Nr. B00208

Zusatz eingewogen.

- Inkubation über Nacht bei 37 °C und 90 U/min.
- 100 µl der ÜN-Kultur wurden in 9 ml steriles Rappaport-Vassiliadis-Medium<sup>89</sup> mit Antibiotikum-Zusatz überimpft.
- Inkubation über Nacht bei 43 °C und 220 U/min.
- Die ÜN-Kulturen wurden auf XLD-Agar mit Antibiotikum ausgestrichen.
- Inkubation bei 37 °C über Nacht.
- Auswertung siehe Kapitel 3.9 - Konjugation von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*.
- Zur Überprüfung der Expression der rekombinanten Salmonellen wurde eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt.

### 3.13. Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis von antigenspezifischen Antikörpern erfolgte mittels einem indirektem ELISA, der in einer 96-Kavitäten Mikrotiterplatte durchgeführt wurde. Die Versuchsproben wurden auf gegen LPS und gegen Eimerien-Antigene gerichtete Antikörper der Antikörperklasse A und G untersucht.

#### 3.13.1. Antigenherstellung und Beschichtung der Mikrotiterplatten

- Das Antigen LPS<sup>90</sup> wurde mit dem Beschichtungspuffer (siehe Anhang) auf eine Endkonzentration von 3 µg /ml eingestellt.
- Die Endkonzentration wurde bei den drei Eimerien-Antigenen (siehe Kapitel 3.10) auf 10 µg/ml eingestellt.
- Die Mikrotiterplatten<sup>91</sup> wurden mit 100 µl Antigenlösung pro Kavität gefüllt.
- Inkubation über Nacht bei 4 °C.
- Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit entfernt und die Mikrotiterplatten wurden bei 4 °C abgedeckt gelagert.

---

<sup>89</sup>Difco Laboratories GmbH, D-86156-Augsburg, Art.Nr. 218581

<sup>90</sup>Sigma-Aldrich GmbH, D-89552 Steinheim, Art.Nr. L-7261

<sup>91</sup>Nunc, D-65203 Wiesbaden, Art.Nr. 442404

### 3.13.2. Durchführung des ELISAs

Von den Versuchsproben aus den Kapiteln 3.11.4 und 3.12.4 wurde die Gallenflüssigkeit auf IgA untersucht. Die Seren wurden auf IgA und auf IgG getestet. Als Antigen diente bei beiden Immunglobulinen sowohl LPS von *Salmonella typhimurium* als auch die drei aufgereinigten Eimerien-Antigenen aus Kapitel 3.10. Zur Feststellung der optimalen Antikörperkonzentrationen wurde für die unterschiedlichen Protokolle eine "Schachbrett-Titration" durchgeführt<sup>92</sup>.

- Die beschichteten Mikrotiterplatten aus Kapitel 3.13.1 wurden auf Papiertücher ausgeklopft und zweimal mit PBS gewaschen (Waschvolumen pro Kavität 200  $\mu$ l).
- Das Blocken erfolgte mit 10 % Foetalem Kälberserum<sup>93</sup> in PBS (Volumen pro Kavität 200  $\mu$ l).
- Inkubation für 1 h bei 37 °C.
- Zweimaliges Waschen mit PBS + 0,05 % Tween 20.<sup>94</sup>
- Die Versuchsproben wurden mit 10 % Foetalem Kälberserum + 0,05 % Tween 20 in PBS verdünnt. Die Konzentrationen siehe Tabellen 3.6, 3.7 und 3.8.
- Die Proben wurden zuerst in eine unbeschichtete Mikrotiterplatte vorgelegt, und anschließend mit einer Mehrfachpipette<sup>95</sup> in die beschichtete Mikrotiterplatte überführt.
- Die Mikrotiterplatte wurde mit 100  $\mu$ l Volumen pro Kavität für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Danach wurden die Mikrotiterplatten auf Papiertücher ausgeklopft, und viermal mit 200  $\mu$ l/Kavität PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen.
- Der sekundäre Antikörper wurde mit 10 % Foetalem Kälberserum + 0,05 % Tween 20 in PBS verdünnt. Die verwendeten Konzentrationen und die Bezugsquelle der einzelnen Antikörper sind in den Tabellen 3.6, 3.7 und 3.8 aufgeführt.
- Pro Ansatz wurden 100  $\mu$ l sekundäre Antikörperverdünnung zugegeben, und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Viermaliges Waschen mit PBS + 0,05 % Tween 20.
- Bei einer Inkubation mit einem zweiten sekundären Antikörper wurde gleich verfahren wie bei einer Behandlung mit einem ersten sekundärem Antikörper. Die Konzentrationen und die Bezugsquellen siehe Tabelle 3.6, 3.7 und 3.8.

---

<sup>92</sup>Chicken Gamma Globulin, Dianova, D-20354 Hamburg, Art.Nr. 003-000-002

<sup>93</sup>Biochrom KG, D-12247 Berlin, Art.Nr. S0112

<sup>94</sup>Merck KGaA, D-64271 Darmstadt, Art.Nr. 822184

<sup>95</sup>Servichem GmbH, D-76476 Bischweier

Tabelle 3.6.: Untersuchung der Versuchsproben **Gallenflüssigkeit auf IgA** gerichtet gegen LPS bzw. Eimerien-Antigen mittels ELISA

Antikörpertyp	Antikörperkonzentration
primärer Antikörper	1:8
Ziege-Anti-Huhn-IgA <sup>100</sup>	1:500
AP konj. Esel-Anti-Ziege-IgG <sup>101</sup>	1:2500

- Bei einer Substratinkubation ist die Wahl des Substrates von der Konjugation des zuletzt eingesetzten sekundären Antikörpers abhängig. Bei einer Konjugation mit der Alkalischen Phosphatase wurde als Substrat p-Nitrophenylphosphat (pN-PP)<sup>96</sup> verwendet. Das pNPP wurde mit 1 mg/ml im Substratpuffer (siehe Anhang) gelöst. Handelte es sich bei der Konjugation um eine Peroxidase wurde als Substrat ABTS<sup>97</sup> eingesetzt. Die ABTS-Tabletten wurden nach Angaben des Herstellers in dem dazugehörigen Substratpuffer<sup>98</sup> gelöst.
- Pro Ansatz wurden 100  $\mu$ l Substratlösung zugegeben, und bei 37 °C inkubiert. Bei ABTS verlief die Inkubation im Dunklen.
- Die Inkubationszeit wurde der Farbentwicklung angepasst.
- Die Messung der Farbreaktion erfolgte in einem ELISA-Reader mit 405 nm (Referenzfilter 450 nm).
- Ein Abstoppen der Reaktion wurde bei der Alkalischen Phosphatase mit 2 M Natriumcarbonat<sup>99</sup> durchgeführt.

Die Untersuchung der Versuchsproben Serum auf IgG gerichtet gegen LPS wurden mit einem kommerziellen ELISA<sup>103</sup> durchgeführt. Die Proben wurden nach den Angaben des Herstellers untersucht.

### 3.13.3. Statistische Methoden

Für die Prüfstatistik von Tierversuch Stuttgart wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) und die Stichproben-Standardabweichung (s) von den Messwerten der Versuchsgruppen be-

<sup>96</sup>Sigma-Aldrich, D-89552 Steinheim, Art.Nr. N-9389

<sup>97</sup>Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1636111

<sup>98</sup>Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1636111

<sup>99</sup>Merck KGaA, D-64271 Darmstadt, Art.Nr. 5226638

<sup>100</sup>Tebu GmbH, D-60596 Frankfurt, Art.Nr. GACH/IgA (Fc) 7S

<sup>101</sup>Tebu GmbH, D-60596 Frankfurt, Art.Nr. 605-705-002

<sup>102</sup>ICN Biomedicals GmbH, D-37269 Eschwege, Art.Nr. 40230

<sup>103</sup>*Salmonella enteritidis/typhimurium* combination Antibody ELISA, BioChek C.V., Nd-2805 Gouda, Art.Nr. CK218



Tabelle 3.7.: Untersuchung der Versuchsproben **Serum auf IgA** gerichtet gegen LPS bzw. Eimerien-Antigen mittels ELISA

Antikörpertyp	Antikörperkonzentration
primärer Antikörper	1:5
Ziege-Anti-Huhn-IgA	1:1000
AP konj. Esel-Anti-Ziege-IgG	1:5000

Tabelle 3.8.: Untersuchung der Versuchsproben **Serum auf IgG** gerichtet gegen Eimerien-Antigen mittels ELISA

Antikörpertyp	Antikörperkonzentration
primärer Antikörper	1:12
Periodoxidase konj. Kaninchen-Anti-Huhn-IgG <sup>102</sup>	1:1200

rechnet. Zur Überprüfung ob ein als Ausreißer verdächtiger Extremwert einer anderen Grundgesamtheit zugehört als die übrigen Werte der Stichprobe wurde ein Testquotient eingesetzt. Der Vergleich der Stichprobenumfänge wurde als einseitige Fragestellung bzw. als einseitiger Test durchgeführt. Als Verfahren zur Bestimmung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde der U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  betrug 1 %. Die Normalverteilung wurde anhand dem Nullklassentest überprüft.

Alle folgend aufgelisteten Arbeiten wurden nach allgemein anerkannten Methoden<sup>104 105</sup> durchgeführt.

- Agarose-Gelelektrophorese<sup>106 107 108 109 110 111 112 113 114</sup>

<sup>104</sup>(Sambrook et al., 1989)

<sup>105</sup>A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Qiagen GmbH, D-40724 Hilden

<sup>106</sup>Agarose, Biozym, D-31833 Hess. Oldendorf, Art. DNA Agarose

<sup>107</sup>Ethidiumbromid, Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 11404

<sup>108</sup>Kammer, Biometra biomedizinische Analytik, E-37079 Göttingen, Aggagel Mini

<sup>109</sup>Elektrophoresepuffer, 1xTAE, siehe Anhang

<sup>110</sup>Starterpuffer, siehe Anhang

<sup>111</sup>Größenmarker, Lambda DNA-BstE II Digest, Biolabs, USA-Beverly, Art.Nr. 301-4

<sup>112</sup>Hind III-Größenmarker, Lambda DNA, Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 745782

<sup>113</sup>Power Supply, Biometra, D-37079 Göttingen

<sup>114</sup>Transilluminator, Bachofer Laboratoriumsgerätebau, D-72764 Reutlingen, Fluo Link

- Spaltung und Analyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen<sup>115 116</sup>
- Entfernen von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion
- Präzipitation von Nukleinsäurelösungen mit Ethanol<sup>117</sup> bzw. Isopropanol
- Transformation von *Escherichia coli*-Zellen
- $\alpha$ -Komplementation<sup>118 119</sup>
- SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese<sup>120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134</sup>
- Elektrotransfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Membranen<sup>135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148</sup>

<sup>115</sup>Pharmacia Biotech GmbH, D-79111 Freiburg

<sup>116</sup>MBI Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot

<sup>117</sup>Na-acetat, Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 6773.1

<sup>118</sup>X-gal, Serva, D-69115 Heidelberg, Art.Nr. 15243.02

<sup>119</sup>Dimethylformamide, Serva, D-69115 Heidelberg, Art.Nr. 20270.03

<sup>120</sup>Elektrophoresekammer, Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 80-6147-64

<sup>121</sup>Acrylamide PAGE, Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 17-1303-01

<sup>122</sup>Bisarylamide, Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 17-1306-01

<sup>123</sup>Gelpuffer B, siehe Anhang

<sup>124</sup>Gelpuffer C, siehe Anhang

<sup>125</sup>SDS, Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 2326.2

<sup>126</sup>TEMED, Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 17-1312-01

<sup>127</sup>Ammonium persulphate, Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 17-1311-01

<sup>128</sup>Butanol, Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 7724

<sup>129</sup>F-Probenpuffer, siehe Anhang

<sup>130</sup>LMW Marker Kit, Pharmacia Biotech GmbH, D-79111 Freiburg, Art.Nr. 17-0446-01

<sup>131</sup>Elektrophoresepuffer, siehe Anhang

<sup>132</sup>Fixierlösung, siehe Anhang

<sup>133</sup>Entfärberlösung, siehe Anhang

<sup>134</sup>Färbelösung, siehe Anhang

<sup>135</sup>Eichproteine, Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1624 229 bzw. 237

<sup>136</sup>Positive Membran, Oncor Appligene, D-69123 Heidelberg, Art.Nr. 130291

<sup>137</sup>Transfermembran aus Nitrocellulose, Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 401180

<sup>138</sup>Transferpuffer, siehe Anhang

<sup>139</sup>Blotkammer, Biometra biomedizinische Analytika GmbH, D-37079 Göttingen, Art.Nr. 014-800

<sup>140</sup>TBS-Puffer, siehe Anhang

<sup>141</sup>TBS-Tween-Puffer, siehe Anhang

<sup>142</sup>Blocking Reagent, Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1096176

<sup>143</sup>RGS-His-Antibody, Qiagen GmbH, D-40724 Hilden, Art.Nr. 34610

<sup>144</sup>Anti-Mouse IgG, Sigma-Aldrich GmbH, D-89552 Steinheim, Art.Nr. A-2304

<sup>145</sup>Streptavidin-AP-conjugate for nucleic acid detection, Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1093266

<sup>146</sup>NBT, Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1383213

<sup>147</sup>BCIP, Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art.Nr. 1383221

<sup>148</sup>Reaktionspuffer (ph 9,5), siehe Anhang

- Kinasierung von 5'-Enden von DNA <sup>149</sup> <sup>150</sup> <sup>151</sup> <sup>152</sup>

---

<sup>149</sup>Polynukleotide Kinase, Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, D-69123 Heidelberg, Art.Nr. A00810S

<sup>150</sup>ATP, Serva, D-69115 Heidelberg, Art.Nr. 10920.01

<sup>151</sup>Phenol, Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 0038.2

<sup>152</sup>Chloroform-Extraktion, Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe, Art.Nr. 3313.2