

8. Anhang

8.1. Rezepturen

Standardisiertes Schneckenwasser (nach HAMBAL 1998)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,1 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 mM
K ₂ CO ₃	0,09 mM
NaHCO ₃	0,1 mM

Folgende Stammlösungen werden in je 1 l Aqua dem. angesetzt:

Stammlösung 1: 55,0 g CaCl₂ x 2 H₂O
 35,0 g MgCl₂ x 6 H₂O

Stammlösung 2: 3,0 g K₂CO₃
 23,0 g NaHCO₃

150,0 ml Stammlösung 1 und 50,0 ml Stammlösung 2 werden 100,0 l Aqua dem. zugesetzt. Außerdem werden der Mischung 100,0 ml Hogland`sche Nährlösung zugefügt.

Hogland`sche Nährlösung:

2,570 g Borsäure
1,750 g Manganchlorid
0,250 g Zinksulfat
0,125 g Lithiumchlorid
0,125 g Kaliumbromid
0,125 g Kaliumjodid
0,250 g Nickelsulfat
0,250 g Kobaltnitrat
0,125 g Zinkchlorid
0,250 g Titandioxid
3,300 g Eisen-II-Chlorid in 4,5 l Aqua dem. lösen.

Nach gründlicher Durchmischung aller Reagenzien wird das Schneckenwasser mit 1N HCl oder 1N NaOH auf pH 7,3 eingestellt.

Lösung zur peptischen Verdauung (nach HIEPE & BUCHWALDER 1992)

Pepsin (Firma Merck)	9,0 g
HCl 32%-ig (Firma Merck)	7,0 ml
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Die Lösung sollte vor Verwendung bei 38 °C im Brutschrank inkubiert werden.

Coon`s-Puffer (0,1 M, pH 7,2-7,6) zum Waschen

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	3,58 g
KH ₂ PO ₄	0,136 g
NaCl	8,77 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

10x Elektrophorese-Puffer (pH 8,0)

Tris	43,6 g
NaH ₂ PO ₄	41,4 g
EDTA	3,72 g
Aqua dem.	ad 1000 ml

Zur Herstellung von 1x Elektrophorese-Puffer wurden 50,0 ml 10x Elektrophorese-Puffer mit 450,0 ml Aqua dem. gemischt. Der Puffer sollte bei 4 °C aufbewahrt werden.

Probenpuffer für die Gel-Elektrophorese

4x TBE-Puffer	10,0 ml
FICOLL-400	10% (w/v)
SDS	0,4% (w/v)
Bromphenolblau	8,0 mg

10x TBE-Puffer (pH 8,1) zur Herstellung von Probenpuffer

Tris	121,1 g
Borsäure	61,8 g
EDTA	7,44 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,165 g
Aqua dem.	ad 1000 ml

50 bp DNA-Leiter

50 bp Leiter (1,0 µg/µl)	50,0 µl
1x Elektrophorese-Puffer	400,0 µl
Probenpuffer	50,0 µl

8.2. Partielle COI-Sequenzen der untersuchten opisthorchiiden Trematodenarten

Opisthorchis felineus

```
1  TTTTTTGGGC  ATCCTGAGGT  TTATGTGTTA  ATATTGCCGG  GGT TTGGAAT
51 GATTAGTCAT  GTTTGTACGA  CTCTAACAGG  GAAAGATTCC  CTATTTGGTT
101 ATGGTGGTTT  GGTGTTAGCC  ATGTTTGCTA  TAGTTTGTTT  GGGTAGTGTG
151 GTTTGAG|CTC  ATCATATGTT  TACTGTAGGA  TTAGATTTAG  GGACTGCTAT
201 TTTTTTTAGT  TCGGTTACTA  TGATCATTGG  TGTACCTACA  GGGATAAAGG
251 TTTTTTCTTG  ATTATACATG  CTTGCCGGTA  CTCGAGATCG  TCTTTGGGAT
301 CCGATTATGT  GGTGGATAAT  CGGATTTATA  GTGCTTTTTA  CTATAGGTGG
351 GGTTACTGGG  ATAGTTCTTT  CTGCCTCTGT  GATTGATGCT  CTTTTTCATG
401 ATACATGATT  CGTTATTGCC  CATT TTCATT  ATGTTCTTTC  TTTA
```

Länge der Sequenz: 444 bp

Fettgedruckt:

Primer OF-1: 5' CCTATTTGGTTATGGTGGTTTGG 3' (Länge = 23 bp)

Primer OF-2: 5' CGATCTCGAGTACCGGCAAG 3' (Länge = 20 bp)

Unterstrichen:

Basenfolge AGCT wird von Endonuklease *Alu* I erkannt und zwischen G und C geschnitten

Opisthorchis viverrini

```
1  TTTTTTGGGC  ATCCTGAGGT  TTATCTATAC  CGACTTGGCT  CACTGTTCCA
51 GGACCTGTTT  TACTGAAGAG  ATTTGACCGT  GCCTCAAAGT  ATGAGCCCGT
101 CGTTGAGGAA  GTCCAACTAA  TAAATAGCAA  TCCACATTAC  GCCCGTGTTC
151 GTTTTCCCGG  CGGGAAAGAA  AGCACTGTAT  CCGTCCGCCA  TCTCGCTCCT
201 TGTGGTGATC  GCACACATGT  CAACGATCTC  ACGCGTACCT  CACCCAATGA
251 AGACAATGGT  GTTCATGCAC  CCCCTCTATC  TGACTTGCAC  ACGCCTTCGC
301 TCAATAACAT  TGGAGATGAT  ATCGATCATA  CTTCAGTCTC  ACCCCCGTGC
351 CCGGGCAATG  CACCTGCATC  TCCAGATACA  TATGACCCTA  GCATCTCTGA
401 TTTAGCCAGG  CTCCAGCAGC  GTACACGGCC  CTACGTTTTA  AGAAATCGAG
451 AAGCCTAACC  AACTCATTAA  TTA CTCTATA  GATTTTTACA  ATCATTATC
501 CAATACCTGT  ACCCAATTAA  TCCCTCTACA  CACAATCCAA  CGGCCAGGGT
551 GAATGTCATG  AATATTCTTT  GTGCTCACAT  TATCGTGTTG  TATTAACCAC
601 GCTTTTGCTT  TCATTTTCAT  TATGTTCTTT  CTTTTA
```

Länge der Sequenz: 636 bp

Clonorchis sinensis

```
1  TTTTTTGGGC ATCCTGAGGT TTATGTGTTA ATATTGCCGG GGTTTGGTAT
51  GATTAGTCAC ATTTGTACTA CTTAACAGG TAAAGATTCT TTGTTTGGTT
101 ATGGGGGTTT GGTGTTGGCT ATGTTTGCTA TAGTTTGTCT GGGTAGGGTG
151 GTTTGAG|CTC ATCATATGTT TACTGTTGGG CTGGATTTGG GGACTGCTGT
201 TTTTTTTAG|C TCGGTTACTA TGATTATAGG TGTGCCTACG GGGATCAAGG
251 TTTTTTCATG ATTATATATG CTTGCTGGAA CTCGGGAGCG TCTATGAGAT
301 CCAATCATGT GGTGGATAAT CGGGTTTGTG GTGCTTTTCA CTATAGGCGG
351 GGTTACTGGG ATAGTTCTTT CTGCTTCTGT AATTGATGCC TTGTTTCATG
401 AACTTGGTT TGCTATTGCT CATTTCATT ATGTTCTTTC TTTA
```

Länge der Sequenz: 444 bp

Unterstrichen:

Basenfolge AGCT wird von Endonuklease *Alu* I erkannt und zwischen G und C geschnitten

Pseudamphistomum truncatum

```
1  TTTTTTGGGC ATCCTGAGGT TTATGTGCTG TAACTGCCCG GGTTTGGTGT
51  AATTAGTCAT ATTTGCACTA CTTAACTGG GAAAGATTCT TTATTTCGGT
101 ATGGTGGTTT AGTGTTGGCT ATGCTCGCTA TAGTTTGTCT GGGTAGTGTG
151 GTTTGGGCTC ATCATATGTT TACTGTTGGG CTGGATCTTA GTACTACTGT
201 CTTTTTTAGG TCTGTTACTA TGGTTATTGG GGTTCCACT GGGATAAAGG
251 TCTTTTCTTG ATTGTATATG CTTGCTGGAA CTCGTGATCG TCTTTGGGAT
301 CCTATAATGT GGTGAATAAT TGGGTTTGTG GTGCTTTTTA CTATAGGTGG
351 GGTTACTGGA ATAGTTCTCT CTGCTTCTGT AATTGATGCC TTATTTTCATG
401 AACTTGGTT TGTTATTGCT CATTTCATT ATGTTCTTTC TTTA
```

Länge der Sequenz: 444 bp

Metorchis xanthosomus

```
1  TTTTTTGGGC ATCCTGAGGT TTATATATTA ATTGTTCTCTG GCTTTGGTAT
51  TATAAGTCAT GTCATTGTTA AATATTCATC TAAAAAATCT ATTTTTGGTT
101 ATCTTGGTAT GGTGTATGCG ATGGTATCGA TAGGAATCTT AGGGTCTATA
151 GTGTGGGCAC ATCATAACGTA TACTGTTGGT ATGGATATTG ATACACGTGC
201 TTTACTTTACT GCTGCAACTA TGATTATTGC AGTACCAACA GGTATTAATA
251 TATTTAGTTG GTTAGCAACA ATGTGGCGTG GTATTTTAGT TTATACTACT
301 CCAATGTTAT TTGCTATTGG TTTTATTTTC TTATTCACTA TGGGTGGATT
351 AACTGGTGTG GTATTATCTA ATGCTGCTTT AGATGTAGCT TTACATGACA
401 CTTATTATGT AGTTGGTCAT TTTCATTATG TTCTTTCTTT A
```

Länge der Sequenz: 441 bp

Metorchis bilis

```
1  TTTTTTGGGC  ATCCTGAGGT  TTATGTATTG  ATATTGCCGG  GGTTTGGAGT
51  TATTAGTCAT  ATTTGTACTA  CTCTAACTGG  GAAAGATTCT  TTATTCGGTT
101 ATGGGGGTTT  GGTGTTAG|CT  GTTTGCTATA  GTTTGTTTGG  GTAGCGTGGT
151 TTGGGCG|CAC  CACATGTTTA  CTGTTGGGCT  GGATTTGGGC  ACTGCTGTTT
201 TTTTLAGTTC  TGTA ACTATG  ATGTTATAGG  TGTTCCCTACT  GGTATAAAGG
251 TTTTTTCTTG  GTTGTATATG  CTTGCTGGTA  CTCGTGATCG  TTTTGGAGAC
301 CCGATTATGT  GGTGGATAAT  AGGGTTTGTA  GTGCTTTTTA  CTATAGGGGG
351 GGTACTGGT  ATAGTTTTAT  CTGCTTCTGT  GATTGATGCT  TTGTTTCATG
401 AACTTGGTT  TGTTATTGCT  CATTTTCATT  ATGTTCTTTC  TTTA
```

Länge der Sequenz: 444 bp

Fettgedruckt:

Primer MB-1: 5'GGGCTGGATTTGGGCACTGC 3' (Länge = 20 bp)

Primer MB-2: 5'ACGATCACGAGTACCAGCAAGC 3' (Länge = 22 bp)

Unterstrichen:

Basenfolge AGCT wird von Endonuklease *Alu* I erkannt und zwischen G und C geschnitten

Basenfolge GCGC wird von Endonuklease *Hha* I erkannt und zwischen dem zweiten G und C geschnitten