

8 ANHANG

8.1 VERWENDETES ARBEITSMATERIAL

8.1.1 Primer

Als Zielsequenz für die verwendeten Oligonukleotid-Primer dienen multipel repetitive Sequenzen der nukleären Trypanosomen-DNA (MOSER *et al.*, 1989; MASIGA *et al.*, 1992; MASAKE *et al.*, 1997). Die Primer wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg synthetisiert. Die nachfolgenden Tabellen geben über die Bezeichnung, die Sequenz, den GC-Gehalt, die Schmelztemperatur, und die Länge der Primer bzw. ihrer spezifischen Amplifikationsprodukte Auskunft. Für *T. brucei* und *T. congolense* savannah wurden jeweils zwei Tabellen angegeben. Die ersten Tabellen beschreiben die „Originalprimer“, während in den nachfolgenden Tabellen die in dieser Arbeit verwendeten verlängerten Primer (beide *T. brucei*-Primer sowie TCN 2.38) aufgeführt sind. Die Verlängerung der Primer wurde durchgeführt, um für die Untersuchungen mit der Multiplex-PCR eine Angleichung ihrer Schmelztemperaturen (T_m) zu erreichen. Bei der Multiplex-PCR sollen die Primer zur Gewährleistung möglichst optimaler Ergebnisse eine ähnliche Hybridisierungskinetik haben (EDWARDS *et al.*, 1994). Nachdem die verlängerten Primer im Vergleich zu den Originalprimern keinen Sensitivitätsunterschied aufwiesen, wurden sie auch für alle Untersuchungen mit der Simplex-PCR verwendet. Durch die Wahl derselben Reaktionsbedingungen wurde somit eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Simplex- und Multiplex-PCR gewährleistet.

Die modifizierten Primer wurden mit einem Primer-Calculator aus dem Internet (www.williamstone.com/primers/calculator) auf das Vorhandensein von „Hairpin“-Formationen und Interaktionen zwischen den Primern überprüft.

Tab. 3.13: Sequenzdaten und Schmelztemperaturen der spezifischen Primerpaare für *T. vivax* nach CLAUSEN *et al.* (1998)

Bezeichnung	Primerlänge in bp	Amplifikations- produkt in bp	GC-%	Tm°C	Referenz
TV80.24	24	266	66,7	80,7	MASAKE <i>et al.</i> , 1997
TV322.24	24		66,7	78,9	CLAUSEN <i>et al.</i> , 1998
Primersequenz (5' – 3')	CAGTGCTCCCGCTCGTACACGGAC GCACGCCACATAGCCGGGGAACAG				

Tab. 3.10: Sequenzdaten und Schmelztemperaturen der spezifischen Primerpaare für *T. brucei* (MOSER *et al.*, 1989)

Bezeichnung	Primerlänge in bp	Amplifikations- Produkt in bp	GC-%	Tm°C	Referenz
TBR 1	26	173	30,7	67	MOSER <i>et al.</i> , 1989
TBR 2	24		33,3	61	
Primersequenz (5' – 3')	CGAATGAATATTAACAATGCGCAGT AGAACCATTTATTAGCTTTGTTGC				

Tab. 3.11: Sequenzdaten und Schmelztemperaturen der spezifischen Primerpaare für *T. brucei* modifiziert nach MOSER *et al.* (1989); die vorgenommenen Sequenzverlängerungen sind fettgedruckt und unterstrichen

Bezeichnung	Primerlänge in bp	Amplifikations- Produkt in bp	GC-%	Tm°C	Referenz
TBR 1.45	45	173	30,7	76,8	Nach MOSER <i>et al.</i> , 1989
TBR 2.47	47		33,3	76,8	
Primersequenz (5' – 3')	CGAATGAATATTAACAATGCGCAGT <u>TAACGCTATTATACACAAT</u> AGAACCATTTATTAGCTTTGTTGC <u>ACACATTAACACTAAGAACAG</u>				

Tab. 3.15: Sequenzdaten und Schmelztemperaturen der spezifischen Primerpaare für *T. congolense savannah* (MOSER *et al.*, 1989)

Bezeichnung	Primerlänge in bp	Amplifikations- Produkt in bp	GC-%	Tm°C	Referenz
TCN 1	25	326	60	80,7	MOSER <i>et al.</i> , 1989
TCN 2	25		44	71,3	
Primersequenz (5' – 3')		TCGAGCGAGAACGGGCACTTTGCGA ATTAGGGACAAACAAATCCCGCACA			

Tab. 3.14: Sequenzdaten und Schmelztemperaturen der spezifischen Primerpaare für *T. congolense savannah* (MOSER *et al.*, 1989); TCN 2.38 wurde modifiziert nach MOSER *et al.* (1989); die vorgenommene Sequenzverlängerung ist fettgedruckt und unterstrichen

Bezeichnung	Primerlänge in bp	Amplifikations- Produkt in bp	GC-%	Tm°C	Referenz
TCN 1	25	339	60	80,7	MOSER <i>et al.</i> , 1989
TCN 2.38	38		40	79,6	
Primersequenz (5' – 3')		TCGAGCGAGAACGGGCACTTTGCGA <u>GTTTTCGATGAAA</u> ATTAGGGACAAACAAATCCCGCACA			

Tab. 3.16: Sequenzdaten und Schmelztemperaturen der spezifischen Primerpaare für *T. congolense forest* (MASIGA *et al.*, 1998)

Bezeichnung	Primerlänge in bp	Amplifikations- Produkt in bp	GC-%	Tm°C	Referenz
TCF1	20	350	55	63,0	MASIGA <i>et al.</i> , 1992
TCF2	20		50	64,4	
Primersequenz (5' – 3')		GGACACGCCAGAAGGTACTT GTTCTCGCACCAAATCCAAC			

8.1.2 Kommerziell erhältliche Test-„Kits“

ECL [®] Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
QIAamp [®] DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

8.1.3 Chemikalien, Reagentien und Enzyme

Agarose	Oncor Appligene, Heidelberg
Borsäure	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
DE-52-Cellulose Microgranular	Whatman, Springfield, UK
DNA Marker 100bp	Gibco, Life Technologies , Karlsruhe
D- und RNase freies H ₂ O	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EDTA Na ₂	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Entwickler	Kodak, Rochester, USA
Ethidiumbromid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ficoll-400	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Fixierer	Kodak, Rochester, USA
Glucose	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Glycerol 99%	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin-Na	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Immersionsöl	Roth GmbH, Karlsruhe
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
MgCl ₂	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

MgCl ₂ x 6H ₂ O	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Na-Citrat	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
NaCl	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Phenolrot	Merck KGaA, Darmstadt
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt
SDS	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt
Taq Gold [®] Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
Tris	Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

8.1.4 Rezepte der Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden durch Auflösung der Substanzen nacheinander unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer im entsprechenden Lösungsmittel hergestellt. Die Kontrolle des pH-Wertes der Puffer erfolgte mithilfe eines pH-Meters. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde gegebenenfalls HCl bzw. NaOH zugesetzt.

8.1.4.1 DNA-Extraktion nach Higuchi

Lysis-Puffer nach Higuchi (pH:7,5)

0,32 M Sucrose (Saccharose)	10,9 g
0,01 M TRIS	0,121 g
0,005 M MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g
1% Triton X-100	1 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Proteinase K:

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden 10 mg Proteinase K in 1 ml DNase- und RNase freiem H₂O gelöst, aliquotiert und bei 4°C aufbewahrt.

8.1.4.2 PCR10 x PCR-Puffer (pH: 8,3)

100 mM Tris	1,211 g
500 mM KCl	3,728 g
1% Triton X-100	1 ml
DNase und RNase freies Aqua dest.	ad 100 ml

Die Stammlösung wurde aliquotiert bei –20°C aufbewahrt.

50 mM-MgCl₂

MgCl ₂	0,476 g
DNase und RNase freies Aqua dest.	ad 100 ml

Die MgCl₂-Stammlösung wurde aliquotiert bei –20°C aufbewahrt.

8.1.4.3 Elektrophorese10 x TBE-Puffer (pH: 8,1)

1 M TRIS	121,1 g
1 M Borsäure	61,8 g
20 mM EDTA	7,44 g
50 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O	10,16 g
oder 50 mM MgCl ₂	4,76 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Probenpuffer

4 x TBE-Puffer	10 ml
10 % Ficoll-400	1g
0,4 % SDS	0,04 g
Bromphenolblau	8 mg

Ethidiumbromid:

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 10 mg Ethidiumbromidpulver in 1ml D- und RNase freiem H₂O gelöst.

Zu 50 ml Agarosegel wurden je 5 µl dieser Stammlösung hinzugefügt (0,01%).

DNA-Marker:

DNA Marker 100 bp	50 µl
Probenpuffer	300 µl
DNase und RNase freies Aqua dest.	650 µl

8.1.4.4 Blotting20 x SSC-Puffer (pH: 7.0)

Na ₂ Cl	175,3 g
Na-Citrat	88,2 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Die Substanzen wurden nacheinander in 800 ml Aqua dest. gelöst. Nach Einstellung des pH-Wert wurde das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt. Die autoklavierte Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

Denaturierungspuffer (pH: 13)

1,5 M NaCl	87,6 g
0,5 M NaOH	20,00 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Neutralisierungspuffer (pH: 7,5)

1,5 M NaCl	87,66 g
0,5 M Tris	60,55 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

8.1.4.5 Prähybridisierung und HybridisierungHybridisierungspuffer

Goldpuffer	50 ml
0,5 M NaCl	1,461 g
5 % (W/V) Blocking Agent	2,5 g

Die Reagentien wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur im Goldpuffer auf dem Magnetrührer gelöst und im Anschluss eine weitere Stunde lang bei 42°C gerührt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Waschpuffer (pH: 9)

6 M Harnstoff	60 g/l
0,4 % SDS	4 g
0,5 x SSC	5 ml 20 x SSC
Aqua dest.	ad 1000 ml

8.1.4.6 Trypanosomenanzucht und -isolierung aus MäuseblutWalker-Lösung

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	9,0 g
Tris	0,1 g
Glycerin	9,0 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Nach Lösung der Substanzen wurde Phenolrot bis zur leichten Rosaverfärbung zugegeben, die Lösung steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

PBS-Puffer nach Coons (0,1M, pH 7,2-7,6)

Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,78 g
KH ₂ PO ₄	0,136 g
NaCl	8,77 g
Aqua dest.	ad 100 ml

PS-Lösung

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	16,9 g
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	0,78 g
NaCl	4,25 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Nach Lösung der Substanzen wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

PSG-Lösung

PS-Puffer	400 ml
25%ige Glukoselösung	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Die Pufferlösung wurde steril filtriert bei Raumtemperatur aufbewahrt.

PSG-Zellulose-Suspension

In 200 ml PS-Pufferlösung wurden 30 g DE-52-Pre-swollen Microgranular 45 min. gequollen. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde erneut mit PS-Puffer aufgefüllt und der pH-Wert der Suspension auf 7,3 eingestellt. Im Anschluß an einen wiederholten Quellvorgang und Pufferaustausch wurde die Suspension autoklaviert. Der Überstand wurde nach dem Abkühlen ein letztes Mal abgegossen und durch PSG-Puffer ersetzt. Die Suspension wurde im Kühlschrank (4°C) gelagert.

8.1.5 Geräte

Autoklav	Fedegari, Albuzzono, Italien
Eismaschine UBE 50-35	Ziegra-Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Gefrierschrank	Bosch Haushaltsgeräte GmbH
Gene Quant Calculator	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hämatokritzentrifuge	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Heizplatte/Agitator IKA-Combimag RTC 92455	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Kassette Kodak X-Omatic Super (24 x 30 cm)	Kodak, Rochester, USA
Kühlschrank	Bosch Haushaltsgeräte GmbH
Mikroskop Standard 20	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Sanyo Electric Co., Ltd., Singapur
Mini Oven MK II	Hybaid Limited, Teddington, UK
Mini Power Pack P20	Biometra, Göttingen
Minizentrifuge DW-41	Roth, Karlsruhe
Neubauer Zählkammer	Zeiss, Jena
Objektiv F 40/0,65	Zeiss, Jena
Okular 10x	Zeiss, Jena
Personal Cycler mit Heizdeckel	Biometra, Göttingen
pH-Meter Calimatic, Modell 761	Knick, Berlin

Pipetten (10, 100, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Polaroid GelCam mit Lichtblendenzubehör	Polaroid GmbH, Offenbach
Präzisionswaage L 610D-*F2	Sartorius GmbH, Göttingen
Slot-Blot-Apparatur SRC 60	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Spitzobjektiv Ph 3, 40/0,85 Öl	Zeiss, Jena
Transilluminator TI 1	Biometra, Göttingen
Undulator Merlin gerin ESV 13	Merlin gerin
Vortex IKA	Works, Inc., Wilmington, NC
Wasserbad julabo 20 B	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zeitschaltuhr	Roth GmbH, Karlsruhe
Zentrifuge Sigma 201 m	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

8.1.6 Laborkleinmaterial und Verbrauchsmaterial

Bechergläser	Schott
Deckgläser Superior (18 x 18)	Menzel-Gläser, Merck KGaA, Darmstadt
EDTA-Blutentnahmeröhrchen	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
Einmalhandschuhe ohne Puder	Roth, Karlsruhe
Einmalkanülen (20G, 23G)	Braun, Melsungen
Einmalkanülen (1,5 x 1000mm)	TSK-Supra, Geislingen
Einmalspritzen (2, 5, 10ml)	Braun, Melsungen
Einmalzellstofftücher, Kimwipes	Kimberly-Clark
Erlenmeyerkolben	Schott
Hämatokritkapillaren (75mm/60µl)	Brand, Wertheim
Hybond® Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kryoröhrchen (1ml) Nalgene	Nalge Company, Rochester, USA
Meßzylinder (25, 50, 100, 500, 1000ml)	Schott

Objektträger Superior (76 x 26mm)	Menzel-Gläser, Merck KGaA, Darmstadt
Pasteurpipetten	Merck KGaA, Darmstadt
Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl) mit Aerosol-sperre	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
Pur-Zellin-Zellstoff	Hartmann AG, Heidenheim
Reaktionsgefäße 0,5ml mit Gummidichtung	Biometra, Göttingen
Reaktionsgefäße 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rundfilterpapier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Spritzenvorsatzfilter	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Venoject® 20G x 1 ¹ / ₂	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
Versiegelungskitt	Hirschmann Laborgeräte
Whatman Filterpapier No. 4	Whatman, Maidstone, UK
Zentrifugenröhrchen (10, 50 ml) Falcon®	Becton Dickinson, Heidelberg