

Elektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren

Die Überprüfung der Amplifikation erfolgte in einer horizontalen Gelkammer mit einer Probe von 5 µl, in einem 1,0 %igen (wt/vol) Agarosegel (DNA typing Grade, (LifeTechnologies, Gibco Industries, Inc., LA, Cal., USA)) mit 1xTBE (Trisborat-EDTA) als Laufpuffer über 45 min bei 100 Volt (Hybaid-AGS, Heidelberg, Deutschland, mittlere Kammer) und einer Ethidiumbromidfärbung (4 µl/100 ml Puffer im Gel).

Die Restriktionsfragmente wurden in einem 1,0 %igen (wt/vol) Agarosegel bei 100 Volt über 120 min separiert.

Hybridisierung

Die Hybridisierungsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) mit dem Kit *DIG Labeling and Detection Kit* auf einer positiv geladenen Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierungsreaktionen wurden im Auftrag (AGOWA GmbH, Berlin, Deutschland) nach Aufreinigung der PCR-Ansätze (HighPure, Boehringer Mannheim, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Eine Qualitäts-Kontrolle der Sequenzierungsdaten des kurzen Amplifikates von *trpC* führte Frau Lautenschläger (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität, Gießen) durch. Die *trpC*-Sequenzierungen (unter 600 bp) hierfür erfolgten mittels Primer-Sequenzierungsreaktion (nach Hersteller Angaben, PerkinElmer, Inc., MA, USA) und Didesoxynukleotiden für den Kettenabbruch im Thermocycler-Modell *TouchDown* mit den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (Tabelle 3). Abschließend folgte eine Ethanol/NaOAc-Fällung (2,0 µl 3M Natriumacetat pH 4,8 eingestellt mit Essigsäure; 50 µl 95 %iges Ethanol) der Sequenzierungsansätze. Das durch Zentrifugation gewonnene Pellet wurde anschließend mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und gut getrocknet. Das Pellet wurde sowohl nach Gießen als auch an die AGOWA GmbH versandt.