

3 Material und Methoden

3.1 Probengewinnung

3.1.1 Gewinnung einer Eispension

Die Eier von *A. perfoliata* und *P. mamillana* wurden aus reifen Endgliedern von adulten Bandwürmern gewonnen. Dieses geschah durch Ausstreichen der Bandwurmendglieder mit der Seitenfläche einer anatomischen Pinzette unter dem Stereomikroskop (Gerät siehe Anhang) bei 3,2-facher Vergrößerung. Die ausgetretenen Eier und die Gewebeflüssigkeit wurden mit einer Glaspipette aufgesaugt, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 5 Minuten bei 1800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette abgesaugt, der Bodensatz mit physiologischer Kochsalzlösung auf ca. 5 ml aufgefüllt und für weitere 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei beim letzten Zentrifugat der Überstand bis auf 1 ml abpipettiert wurde. Das Zentrifugat wurde zu einer Suspension aufgeschüttelt und zu je 100 µl in Schraubdeckelgefäße (Verbrauchsmaterial siehe Anhang) portioniert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank (Gerät siehe Anhang) bei einer Temperatur von 4 - 8 °C.

3.1.2 Aufbereitung der adulten Bandwürmer

Adulte Bandwürmer der Arten *A. perfoliata* und *P. mamillana* wurden im Rahmen einer Sektion von Pferden gewonnen und vom Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin zur Verfügung gestellt. Die Bandwürmer wurden mehrfach in einem Becherglas, das 200 ml Phosphatpuffer (Puffer und Lösungen siehe Anhang) enthielt, geschwenkt, um die größten Verunreinigungen zu entfernen. Fest anhaftende Nahrungsbreibbestandteile, die mit dem Phosphatpuffer nicht ablösbar waren, wurden mit einer Pinzette entfernt. Bandwürmer oder Teile von diesen, die von lebenden Pferden mit dem Kot ausgeschieden wurden, stellten die Klinik für Pferde der FU Berlin und private Pferdebesitzer zur Verfügung. Auch diese wurden wie oben beschrieben vorgereinigt, mit Skalpell und Pinzette in einzelne oder doppelte Proglottiden zerteilt und bei -80 °C eingefroren.

3.1.3 Aufbereitung der Pferdekotproben

3.1.3.1 Mit *A. perfoliata*-DNA gespikte Kotproben

Mit der kombinierten Sedimentations-/ Flotationsmethode wurde eine größere Kotmenge (30 g), für die spätere Extraktion der Bandwurm-DNA aus dem Kot aufkonzentriert. Dazu wurde Kot von Fohlen (Alter < 3 Monate) verwendet, um sicher zu stellen, dass dieser noch nicht mit Pferdebandwürmern infiziert ist. 30 g Pferdekot der mit 1 - 3 Bandwurmprogliottiden (*A. perfoliata*) gespikt war, wurde in 400 ml Leitungswasser eingeweicht, mit einem Holzspatel homogenisiert und 12 h stehen gelassen. Das Homogenisat wurde durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 250 µm in ein 500 ml Becherglas gegeben. Nach 2 h des Sedimentierens wurde der Überstand abgegossen und das Sediment in 1 - 2 Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte für 5 Minuten bei 800 g die Zentrifugation. Der Überstand wurde abgesaugt und das so erzeugte Sediment zu je 200 mg oder 300 mg Portionen in Schraubdeckelgefäße überführt und bei 4 °C im Kühlschrank für die PCR-Untersuchung eingelagert.

3.1.3.2 Mit *A. perfoliata*-DNA infizierte Kotproben

Der Kot von Pferden mit einem Alter von über 3 Monaten wurde nach der Sedimentations-/ Flotationsmethode auf Bandwurmeier untersucht, um natürlich infizierte Kotproben zu identifizieren. Dazu wurde 30 g Pferdekot, der vorher zerkleinert wurde, mit 400 ml Leitungswasser vermischt und für mindestens 12 h bei RT stehen gelassen. Das Gemisch wurde durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 250 µm in ein 500 ml Becherglas gegeben. Nach dreistündiger Sedimentation wurde der Überstand abgegossen und der Bodensatz in 1 - 2 Zentrifugenröhrchen mit flachem Boden überführt. Die nun folgende Zentrifugation erfolgte für 2 Minuten bei 800 g. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Sediment in gesättigter NaCl-Lösung (Zusammensetzung siehe Anhang) suspendiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 2 Minuten bei 800 g. Das so in den Zentrifugenröhrchen entstandene Oberflächenmaterial wurde mit einer Impföse abgenommen und unter dem Mikroskop (Gerät siehe Anhang) bei 40-facher Vergrößerung auf Bandwurmeier durchmustert. Die als infiziert erkannten Proben wurden analog zu Punkt 3.1.3.1 für die PCR-Untersuchung aufbereitet.

3.1.4 DNA-Extraktion

3.1.4.1 Extraktion der DNA von Bandwurmeiern mit QIAamp[®] Blood Kit

Vor der eigentlichen DNA-Extraktion wurde die Eisuspension (100 µl) aufgetaut, dann bei 14000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 200 µl Phosphatpuffer in das 1,5 ml Schraubdeckelgefäß zu dem Zentrifugat gegeben und gemischt. Nach diesem Waschvorgang wurde die in der Eisuspension enthaltene DNA mit dem QIAamp[®] Blood Kit (Kit siehe Anhang) extrahiert. Hierbei werden die in Bandwurmeiern enthaltenen Proteine unter Zusatz eines Lysispuffers und Proteinase K (20 mg/ml) bei 70 °C im Wasserbad lysiert. Das nun entstandene Lysat wurde im nachfolgenden Schritt in ein mit dem Extraktionskit mitgeliefertes QIAamp spin column[®] gegeben. Die im Lysat enthaltene DNA bindet sich an die Silika-Gel Membran des QIAamp spin column[®]. Daraufhin erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit dem im Kit enthaltenem Waschpuffer bei 14000 g. Abschließend erfolgte die Elution der DNA nach Zugabe des Elutionspuffers. Um die Ausbeute an DNA pro µl zu erhöhen, wurde dieser Schritt so modifiziert, dass anstelle von 100 µl nur 50 µl Elutionspuffer je Probe zugegeben wurde. Die extrahierte DNA wurde dann bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.1.4.2 Extraktion der DNA von Bandwurmproglottiden mit DNeasy[®] Tissue Kit

Die Proglottiden wurden aufgetaut und danach mehrfach in Phosphatpuffer geschwenkt. Die Probe wurde mit einer Pipettenspitze in ein 1,5 ml Schraubdeckelgefäß überführt. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion mit dem DNeasy[®] Tissue Kit (Kit siehe Anhang). Im Unterschied zum QIAamp[®] Blood Kit wurden hier die in der Proglottide enthaltenen Proteine zunächst unter Zusatz eines Lysispuffers und Proteinase K (20 mg/ml) bei 55 °C im Wasserbad gelöst. Anschließend wurde unter Zugabe eines zweiten Lysispuffers bei einer auf 70 °C erhöhten Temperatur die Proglottide vollständig aufgelöst. Die nachfolgenden Schritte erfolgten analog des Ablaufes wie beim QIAamp[®] Blood Kit beschrieben. Nur der letzte Schritt wurde wiederholt, so dass je Probe 2x 50 µl extrahierte DNA entstanden, welche dann ebenfalls bei 4 °C im Kühlschrank gelagert wurden.

3.1.4.3 Extraktion der Bandwurm-DNA aus Pferdekot mit QIAamp® DNA Stool Mini Kit

Zur Extraktion von Bandwurm-DNA aus Kotproben ist es notwendig, spezielle Extraktions-Kits für Stuhlproben zu verwenden, da Kot immer Inhibitoren enthält, die sich negativ auf den Ablauf der PCR auswirken können.

Der schon während der Aufbereitung der Pferdekotproben portionierte Kot wurde in zerstoßenes Eis verbracht. Nach Entnahme aus dem Eis erfolgte ein Durchmischen der Proben, um die Bandwurm-DNA gleichmäßig zu verteilen. Die Proben wurden mit einem Lysis-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 90 °C im Wasserbad belassen. Durch Zugabe jeweils einer Inhibit Ex®-Tablette zu jedem Lysat ließen sich die im Kot enthaltenen Inhibitoren binden. Nach Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 g wurde der Überstand abgenommen und das Sediment, welches die Inhibitoren enthielt, verworfen. Die anschließende Proteinverdauung unter Zusatz von Proteinase K (20 mg/ml) und Lysispuffer erfolgte für 10 Minuten im Wasserbad bei 70 °C. Im nächsten Schritt bindet sich die im Lysat enthaltene DNA an die Silika-Gel Membran des QIAamp spin column®. Es folgten die zweimalige Waschung mit Waschpuffern und die abschließende Elution der DNA mit dem Elutionspuffer. Der letzte Schritt wurde so modifiziert, dass nur 100 µl Elutionspuffer je Probe zugegeben wurde. Die anschließende Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

3.1.4.4 Inhibitorenbindung mit Chelex® 100 Resin während der Extraktion der DNA mittels QIAamp® DNA Stool Mini Kit

Um die im Pferdekot enthaltenen Inhibitoren der PCR noch während der Extraktion zu binden, wurde Chelex® 100 Resin eingesetzt. Chelex® 100 Resin ist eine Chelatkomplexe bildende chemische Substanz, welche polyvalente Kationen mit hoher Selektivität bindet. Es wird benötigt, um Metallionen aus Proben und Puffern zu entfernen.

Nach der Verdauung mit Proteinase K (20 mg/ml) bei 70 °C im Wasserbad erfolgte die Zentrifugation der Proben für 1 Minute bei 13000 g. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. In jedes Schraubdeckelgefäß (Verbrauchsmaterial siehe Anhang) wurde 50 µl Chelex® 20 % pipettiert, für 30 Minuten bei RT geschüttelt und anschließend für 1 Minute bei 13000 g zentrifugiert. Der so entstandene Überstand ist gemäß 3.1.4.3 weiter bearbeitet worden.

3.1.4.5 Bestimmung von Menge und Reinheit der mittels QIAamp® Blood Kit und DNeasy® Tissue Kit extrahierten DNA-Proben

Mit einem Spektralphotometer (Gerät siehe Anhang) wurden die Menge und Reinheit der extrahierten DNA bei einer Absorption von 260 nm und 280 nm bestimmt. Vor der Konzentrationsbestimmung der DNA-Extrakte mit dem Spektralphotometer wurde die Küvette zur Aufnahme der Probe mehrfach wie folgt gespült:

1. mit 1 ml einer 0,1 M NaOH-Lösung
2. mit 1 ml einer 0,1 M HCl-Lösung
3. 3 mal mit 1 ml DNA- und RNA-freiem destilliertem Wasser

Diese Lösungen wurden nacheinander in die Küvette pipettiert, geschwenkt und nach jedem Schritt mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Zur Einstellung des Nullwertes wurde 70 µl Elutionspuffer als Referenzlösung in die Küvette pipettiert. Nach Absaugen dieser wurden 70 µl der zu messenden DNA-Probe in die Küvette überführt. Für die verschiedenen Proben ergaben sich die in Tabelle 2 aufgeführten Werte.

Tabelle 2: DNA-Konzentration und Reinheitsgrad der DNA-Extrakte aus Aufbreitungen von Zestoden (*Moniezia expansa*, *Anoplocephala perfoliata* und *Paranoplocephala mamillana*), Trematoden (*Fasciola hepatica*) und Nematoden (kleine Strongyliden, Oxyuren und *Parascaris equorum*), bestimmt im Spektralphotometer

Probe	WL [nm]	Absorptionswert	Ratio	Reinheit [%]	DNA-Menge [µg/ml]																																																												
<i>P. equorum</i> -Segment	260	0,110	1,77	98	2,6																																																												
	280	0,088				<i>A. perfoliata</i> -Eier	260	0,215	1,726	95	6,5	280	0,161	<i>M. expansa</i> -Proglottide	260	0,655	1,738	96	16,3	280	0,517	Kleine Strongyliden-Segmente	260	0,141	1,728	95	2,8	280	0,117	Oxyuren-Eier	260	0,141	1,807	100	7,7	280	0,117	<i>P. mamillana</i> -Eier	260	0,077	1,943	100	2,6	280	0,052	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide	260	0,173	1,768	98	7,9	280	0,101	<i>P. mamillana</i> -Proglottide	260	0,543	1,788	98	21,0	280	0,429	<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796
<i>A. perfoliata</i> -Eier	260	0,215	1,726	95	6,5																																																												
	280	0,161				<i>M. expansa</i> -Proglottide	260	0,655	1,738	96	16,3	280	0,517	Kleine Strongyliden-Segmente	260	0,141	1,728	95	2,8	280	0,117	Oxyuren-Eier	260	0,141	1,807	100	7,7	280	0,117	<i>P. mamillana</i> -Eier	260	0,077	1,943	100	2,6	280	0,052	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide	260	0,173	1,768	98	7,9	280	0,101	<i>P. mamillana</i> -Proglottide	260	0,543	1,788	98	21,0	280	0,429	<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796	99	18,8	280	0,309				
<i>M. expansa</i> -Proglottide	260	0,655	1,738	96	16,3																																																												
	280	0,517				Kleine Strongyliden-Segmente	260	0,141	1,728	95	2,8	280	0,117	Oxyuren-Eier	260	0,141	1,807	100	7,7	280	0,117	<i>P. mamillana</i> -Eier	260	0,077	1,943	100	2,6	280	0,052	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide	260	0,173	1,768	98	7,9	280	0,101	<i>P. mamillana</i> -Proglottide	260	0,543	1,788	98	21,0	280	0,429	<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796	99	18,8	280	0,309												
Kleine Strongyliden-Segmente	260	0,141	1,728	95	2,8																																																												
	280	0,117				Oxyuren-Eier	260	0,141	1,807	100	7,7	280	0,117	<i>P. mamillana</i> -Eier	260	0,077	1,943	100	2,6	280	0,052	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide	260	0,173	1,768	98	7,9	280	0,101	<i>P. mamillana</i> -Proglottide	260	0,543	1,788	98	21,0	280	0,429	<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796	99	18,8	280	0,309																				
Oxyuren-Eier	260	0,141	1,807	100	7,7																																																												
	280	0,117				<i>P. mamillana</i> -Eier	260	0,077	1,943	100	2,6	280	0,052	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide	260	0,173	1,768	98	7,9	280	0,101	<i>P. mamillana</i> -Proglottide	260	0,543	1,788	98	21,0	280	0,429	<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796	99	18,8	280	0,309																												
<i>P. mamillana</i> -Eier	260	0,077	1,943	100	2,6																																																												
	280	0,052				<i>A. perfoliata</i> -Proglottide	260	0,173	1,768	98	7,9	280	0,101	<i>P. mamillana</i> -Proglottide	260	0,543	1,788	98	21,0	280	0,429	<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796	99	18,8	280	0,309																																				
<i>A. perfoliata</i> -Proglottide	260	0,173	1,768	98	7,9																																																												
	280	0,101				<i>P. mamillana</i> -Proglottide	260	0,543	1,788	98	21,0	280	0,429	<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796	99	18,8	280	0,309																																												
<i>P. mamillana</i> -Proglottide	260	0,543	1,788	98	21,0																																																												
	280	0,429				<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796	99	18,8	280	0,309																																																				
<i>F. hepatica</i> -Segment	260	0,476	1,796	99	18,8																																																												
	280	0,309																																																															

WL=Wellenlänge; Ratio=Verhältnis von A260/A280; Reinheit=Reinheit der Nukleinsäuren

Die Reinheit der DNA-Proben lag bei allen Extrakten ≥ 95 %. Die Menge der Proteinverunreinigung lag bei allen Extrakten unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Spektralphotometers. Solche Verunreinigungen können sich negativ auf die Messgenauigkeit des Photometers auswirken, da sich die Proteinabsorption, deren Maximum bei 280 nm liegt, teilweise auch zur DNA-Absorption, deren Maximum bei 260 nm liegt, addiert.

3.1.4.6 Primer

Zunächst wurden Primer ausgewählt, mit deren Hilfe sich mitochondriale DNA von Plathelminthen amplifizieren lässt; schon 1994 entdeckten BOWLES und McMANUS nach der Amplifikation von Plathelminthen-DNA mittels COI-1 und COI-2 Primern mitochondriale Cytochrom-C-Oxidase 1-Gensequenzen von ca. 450 bp. Dieses Gen wurde bei verschiedenen Zestodenspezies nachgewiesen. Die Untereinheit dieses Gens besteht aus einer variablen Region, die von zwei konservativen Regionen eingerahmt wird. Im Bereich der konservativen Abschnitte befinden sich die Bindungsstellen der Primer, die sich folgendermaßen darstellen:

COI-1: 5' - TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT - 3'

COI-2: 5' - TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG - 3'

Die COI-Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Mitochondriale DNA von *A. perfoliata*, *M. expansa* und *P. mamillana* wurde mit Hilfe dieser Primer amplifiziert (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9) und die Produkte zur Sequenzanalyse an Dr. Hotzel (BFAV in Jena, Deutschland) übersandt.

Die Amplifikation mitochondrialer DNA mit COI-Primern ergab für *A. perfoliata*, *M. expansa* und *P. mamillana* ein PCR-Produkt von ca. 440 bp. Allerdings amplifizierte der COI-Primer auch für kleine Strongyliden ein Produkt von ca. 440 bp. Die aus dem Vollblut eines Pferdes gewonnene Wirts-DNA wurde ebenfalls mit COI-Primern auf Kreuzreaktion getestet.

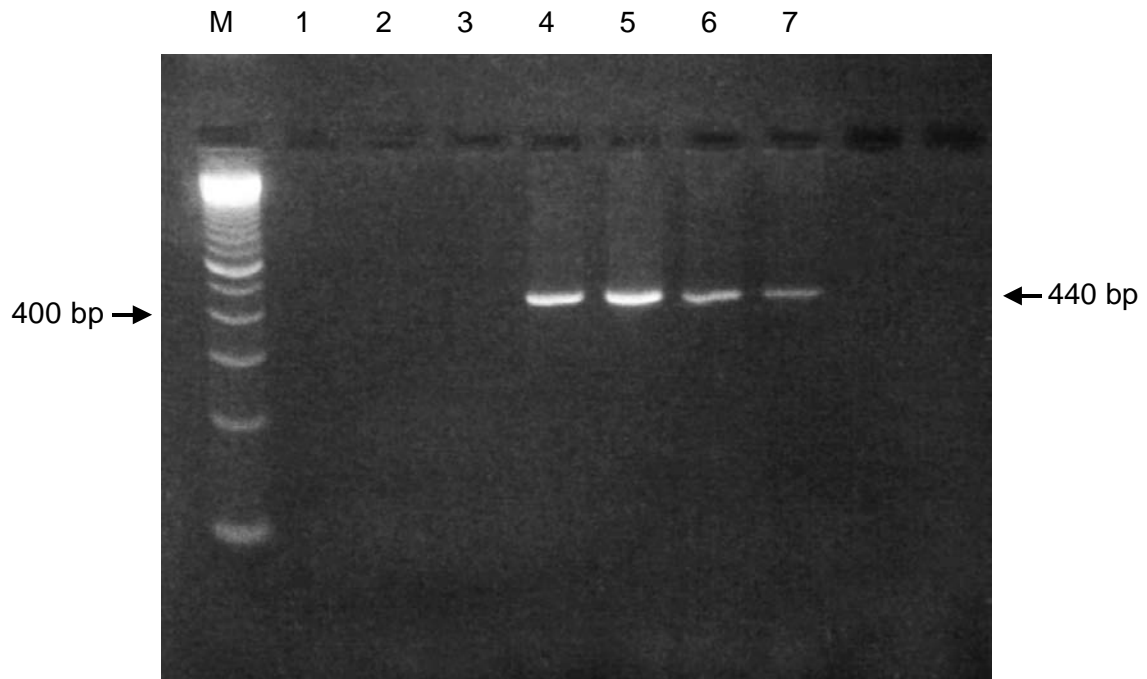


Abbildung 8: COI-Amplifikate von *A. perfoliata*- und *P. mamillana*-Proglottiden und Eiern sowie vom Vollblut eines Pferdes

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H ₂ O
2	Vollblut von 7 Monate altem Fohlen
3	Vollblut von 7 Monate altem Fohlen
4	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide
5	<i>P. mamillana</i> -Proglottide
6	<i>A. perfoliata</i> -Eier
7	<i>P. mamillana</i> -Eier

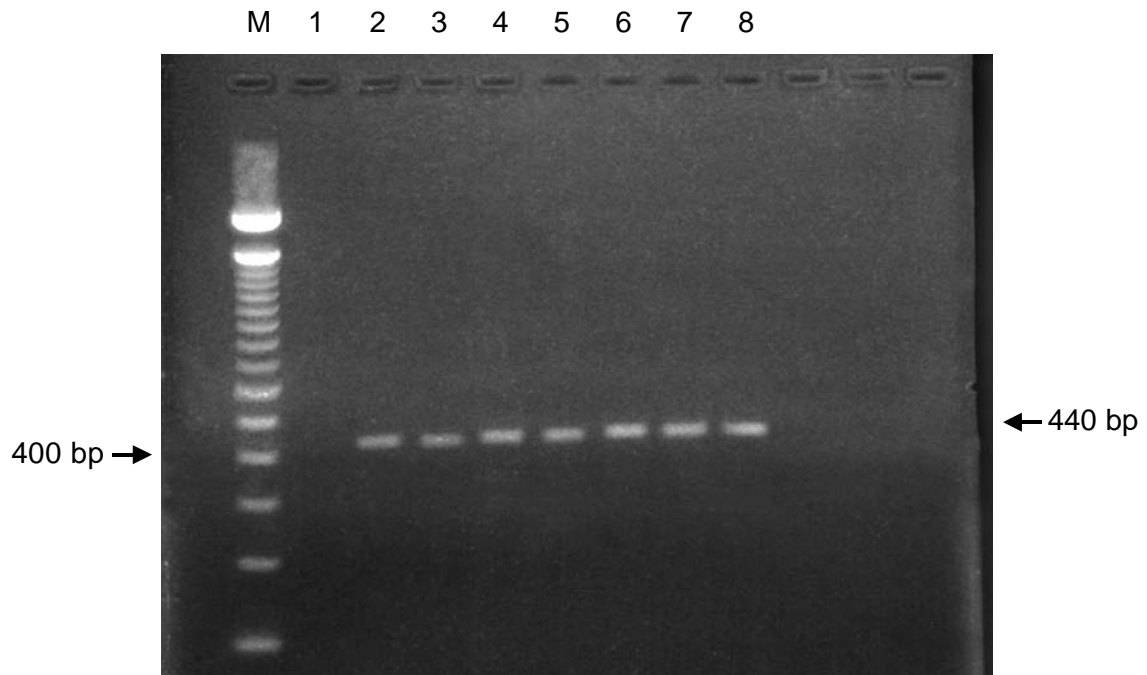


Abbildung 9: COI-Amplifikate von *A. perfoliata* und *M. expansa*-Proglottiden und kleinen Strongyliden

Lauf	Probe
M	100 bp Marker
1	H ₂ O
2	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide
3	<i>A. perfoliata</i> -Proglottide
4	Kleine Strongyliden
5	Kleine Strongyliden
6	<i>M. expansa</i> -Proglottide (Schaf)
7	<i>M. expansa</i> -Proglottide (Schaf)
8	<i>M. expansa</i> -Proglottide (Schaf)

3.1.5 DNA-Amplifikation

Nach Reinigung der Arbeitsfläche mit H_2SO_4 (0,2 %ig) wurden alle Reagenzien bis auf die Taq-Polymerase aufgetaut, gemischt und auf Eis gestellt. Unmittelbar vor dem PCR-Start wurde die Taq-Polymerase aufgetaut und in den sogenannten „Mix“ gegeben. Die PCR-Reaktionsansätze sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der 50 μl - PCR-Ansätze für die spezifischen Primer

Reagenzien*	Anfangsmolarität / Konzentration	Volumen [μl]	Endmolarität / Konzentration
PCR-Puffer	10x	5,0	1x
Primer 1	44,5 nmol/ml	1,0	44,5 pmol
Primer 2	44,5 nmol/ml	1,0	44,5 pmol
dNTPs	100 mM	0,5	1 mM (250 μM pro Nukleotid)
DNAase- und RNAase freies Aqua dest.		32,3	variabel
MgCl_2	25 mM	5,0	2,5 mM
Taq-Polymerase	5000 U/ml	0,2	1 U
DNA-Template		5,0	variabel

*) Zusammensetzung siehe Anhang

Die Reaktionsansätze wurden geschüttelt und vorsichtig mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um in der nachfolgenden Amplifikation Mengenverluste durch Verdunstung zu verhindern. Pro PCR-Lauf wurde mindestens eine negative Kontrollprobe, die 5,0 μl RNA/DNA freies Wasser als Template enthielt, mitgeführt, um eine eventuelle Kontamination anzuzeigen. Eine Positivkontrolle diente zur Überprüfung der Funktion der PCR. Als Positivkontrolle wurde 5,0 μl DNA-Extrakt verwendet, welches in vorherigen Versuchen erfolgreich nach gleichem PCR-Protokoll amplifiziert wurde. Zur Amplifikation wurden die Reaktionsgefäße in einen Thermocycler (Gerät siehe Anhang) überführt. Im ersten Schritt erfolgte die Aktivierung der Taq-Polymerase und Denaturierung der DNA bei 95 °C für 15 Minuten, gefolgt von dem Anlagern der Primer („annealing“) bei 54 °C für 30 Sekunden und einem Schritt zur Verlängerung der DNA-Einzelstränge („extension“) bei 72 °C für 2 Minuten. Im Anschluss erfolgten 39 Zyklen mit der Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, der Anlagerung der Primer bei 50 °C für 30 Sekunden und die Verlängerung der Einzelstränge bei 72 °C für 2 Minuten. Vor der Abkühlung des Reaktionsgemisches

auf 4 °C erfolgte eine letzte Verlängerung der DNA-Einzelstränge bei 72 °C über 10 Minuten. Die so erzeugten Amplifikate wurden bis zur weiteren Untersuchung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.1.6 Gelelektrophorese

Zum Nachweis der PCR-Amplifikate erfolgte eine Gelelektrophorese in einem 2 %igen Agarose-Gel. Um dieses Gel herzustellen, wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x Elektrophoresepuffer (Zusammensetzung siehe Anhang) durch mehrmaliges, kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. 25 ml des Gels wurden in ein Glasgefäß überführt, mit 2,5 µl 1 %iger Ethidiumbromidlösung (Zusammensetzung siehe Anhang) versetzt und stehen gelassen, bis es eine Temperatur von ca. 60 °C besaß. Danach wurde das Gelgemisch auf ein kleines Geltablett der Agargelminikammer (Gerät siehe Anhang) gegossen. Die Herstellung der 13 Probestaschen (Slots) erfolgte durch den Einsatz eines Kammes in das noch flüssige Gel. Zur schnelleren Verfestigung des Gels wurde dieses in den Kühlschrank bei 4 °C verbracht. Nach Befüllen der Agargelminikammer mit 250 µl 1x Elektrophoresepuffer wurde das feste Gel in diese überführt.

Vor der Elektrophorese wurden nur die Amplifikate, die aus einer Eisuspension (Bandwurm) entstanden waren, von anhaftendem Mineralöl durch Abziehen auf einem Parafilm®-Streifen gereinigt. Anschließend wurde das Amplifikat vollständig (ca. 40 - 50 µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Dieses wurde mit offenem Deckel in einen Vakuumkonzentrator (Gerät siehe Anhang) gestellt und ca. 30 Minuten bei 60 °C aufkonzentriert. Die so eingeengte DNA wurde mit 8 µl RNAase/DNAase freiem Wasser wieder resuspendiert und mit 2 µl Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Anhang) vermischt. Von allen anderen Amplifikaten wurden 8 µl entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2 µl Probenpuffer vermischt. Von diesem Gemisch wurden 8 µl entnommen und in je eine Probestasche des Gels gegeben. In jeweils eine Probestasche pro Gel wurden 8 µl eines 100 bp DNA-Markers pipettiert (Rezeptur siehe Anhang), um die Größe (bp) des hergestellten Amplifikates zu bestimmen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 66 V für eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurde das Gel der Kammer entnommen, unter den UV-Transilluminator (Gerät siehe Anlage) gelegt und begutachtet. Die Dokumentation der Amplifikationsprodukte erfolgte mit einer Sofortbildkamera (Gerät siehe Anhang).