

III. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Zellen

1. 1. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Bakterienstämme

Stammbezeichnung	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia I, RIGP	Reisolat von <i>L. pneumophila</i> Phil I (ATCC 33152) nach Passage im Meerschweinchen	Bender et al., 1990 Marre, unveröffentl.
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia I JR 32	restriktionsdefizientes Derivat von <i>L. pneumophila</i> Phil I (Sm ^r)	Marra und Shuman, 1989
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia I JR 32-1	Lly-negative Mutante von <i>L. pneumophila</i> JR 32 (Sm ^r , Km ^r)	Wintermeyer et al., 1994
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia I JR 32-1 (pEWB 34-114)	<i>L. pneumophila</i> Phil I JR 32-1 komplementiert mit pEWB 34-114: Lly+ (Sm ^r , Km ^r , Cm ^r)	Wintermeyer et al., 1994
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia I JR 32-2	Mip-negative Mutante von <i>L. pneumophila</i> JR 32 (Sm ^r , Km ^r)	Wintermeyer et al., 1994
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia I JR 32-2.1	<i>L. pneumophila</i> Phil I JR 32-2 komplementiert mit pEWMS 102 (Mip WT), (Sm ^r , Km ^r , Cm ^r)	Wintermeyer et al., 1994
<i>Legionella pneumophila</i> Corby	virulentes Patientenisolat, Serogruppe 1	Jepras et al., 1985
<i>Legionella pneumophila</i> Corby KH I	Fla-negative Mutante von <i>L. pneumophila</i> Corby	Heuner , 1994

Stammbezeichnung	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>Escherichia coli</i> K 12 DH5 α	F, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (r_k^- , m_k^-) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , δ (<i>argF-lac</i>)U169, λ^- , ϕ 80d/ <i>lacZ</i> δ M15	Bethesda Research Laboratories, 1986
<i>Escherichia coli</i> AAEC 160	Δ <i>fimB</i> -A ersetzt durch <i>sacB</i> -Neo ^r	Blomfield et al., 1991
<i>Escherichia coli</i> AAEC 160-1	Derivat von <i>E. c.</i> AAEC 160 chromosomale Integration von <i>mip</i> , (Δ <i>sacB</i> -Neo ^r)	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> WM 2269	<i>E. c.</i> DH5 α mit pLDR 8	Diederich et al., 1992
<i>Escherichia coli</i> WM 2269-1	chromosomale Integration von <i>lly</i> in λ -att-site, (Ap ^r)	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 Stamm 933	Wildtyp-EHEC, Stx1- und Stx2-konvertierende Phagen 933J und 933W	Strockbine et al., 1986
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 Stamm 86-24	Wildtyp-EHEC, Stx2- konvertierender Phage 86-24	P. Tarr, Seattle

1. 2. Zellen

Die verwendeten Zellen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Zellen

Zellbezeichnung	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	frei lebende Amoebe; bildet Trophozoiten und Cysten	ATCC 33152 ("American Type Culture Collection")
<i>Fischerella</i> sp.	frei lebende, fädig wachsende Cyanobakterien mit Heterocysten	ATCC 33256

2. Plasmide

Die verwendeten Vektoren und Plasmide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Vektoren und Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
pUC 18	-	oriColE1, Ap ^r , lacZ α	Yanisch-Perron et al., 1985
pEWL 1	pUC 18	7,8 kb <i>Pst</i> I - Fragment mit <i>lly</i> aus <i>L. p. Phil</i> I	Wintermeyer et al., 1991
pEWL 2	pUC 18	7 kb <i>Pst</i> I/ <i>Sma</i> I - Fragment mit <i>lly</i> aus <i>L. p. Phil</i> I	Wintermeyer et al., 1991
pEWL 113	pUC 18	2,6 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Sma</i> I-Fragment mit <i>lly</i> aus <i>L. p. Phil</i> I	Wintermeyer et al., 1991
pMFL 3	pUC 18	4,4 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I-Fragment aus pEWL1	diese Arbeit
pMFL 33	pUC 18	2,3 kb <i>Sac</i> I/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus pEWL 1	diese Arbeit
pMFL 34	pUC 18	1,26 kb <i>Hind</i> III/ <i>Sph</i> I-Fragment aus pEWL 1	diese Arbeit
pMFL 35	pUC 18	1,08 kb <i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment aus pEWL 1	diese Arbeit
pBLL 100	pBlueskriptII KS	<i>mip</i> auf 1 kb <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI-Fragment, Ap ^r	Wintermeyer et al., 1995
pLDR 8	pOU71	ori pSC101(Ts), Km ^r , λ int+ cI857	Diederich et al., 1992
pLDR 11	pT7-7	ori colE1 rop, Ap ^r , Tc ^r , λ attP+	Diederich et al., 1992
pLDR 11-1	pLDR 11	3,4 kb <i>Eco</i> RI - <i>Pst</i> I- Fragment aus pEWL 1 mit <i>lly</i> -Determinante in pLDR 11 kloniert	diese Arbeit
pPILVV ₃	pIB 310	Cm ^r , Temp ^s , <i>Cl</i> aI-Site	V. Vetter, Würzburg
pPILMF ₁	pPILVV ₃	1310 bp PCR-Fragment mit <i>mip</i> -Gen in <i>Cl</i> aI-Site von pPILVV ₃ kloniert	diese Arbeit

3. Geräte

Es wurden nachfolgend aufgelistete Geräte für die Experimente eingesetzt:

Autoklav	Webeco
Analysenwaage	Chyo JL 180
Bakterienschüttler	Innova TM 4300
Brutschränke	Heraeus
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektrophoresekammern	Biorad, Werkstatt des Instituts
Filterhalter	Nalgene
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss-Axiolab
Geltrockner	Biorad 1125
Graphit-Blotkammer	Werkstatt des Instituts
Grobwaage	Chyo MP 3000
Inkubator	Infors
Kamera	Nikon F301
Kritisch-Punkt-Trockner	Balzers
Kühlzentrifuge	Beckman J2-HS
Mikropipetten	Gilson
Netzgeräte	Consort E 455, Desaga, LKB Power Supply 2103
PCR-Thermocycler	Bio-med. Thermocycler, Braun
pH-Meter	Metrohm-Herisau E512
Photometer	Klett-Summerson 900-3, Unicam 8625
Rasterelektronenmikroskop	DSM 962
Schüttler	IKA-Labortechnik KS 501
Speedvac	Univapo 150H Uniequip
Sterilwerkbank	Nunc Microflow 50726
Tischinkubatoren	Eppendorf 5320, Liebisch
Tischzentrifuge	Eppendorf 5412
UV-Lampe	Desaga UV 15 245 / 366
UV-Transilluminator	UVP inc.
Vakuufofen	Heraeus
Videoprintanlage	Mitsubishi, Hitachi, Cybertech Cb 1
Vortexer	Vortex Genie 2
Wasserschüttler	GFL 1083, Köttermann

4. DNA-Größenmarker

Spp 1:		1-Kb-Leiter (MBI Fermentas):	
Fragment	Größe in kb	Fragment	Größe in kb
1	7,85	1	10
2	6,97	2	8
3	5,86	3	6
4	4,70	4	5
5	3,38	5	4
6	2,68	6	3,5
7	1,89	7	3
8	1,80	8	2,5
9	1,45	9	2
10	1,33	10	1,5
11	1,09	11	1
12	0,88	12	0,75
13	0,67	13	0,5
14	0,48	14	0,25
15	0,38		

5. Chemikalien

Es wurden nachfolgende Chemikalien für die Experimente verwendet:

Chemikalien: Bayer, Difco, Mast, Merck, Oxoid, Roth, Serva, Sigma

Enzyme: Biolabs, Boehringer, Gibco BRL, Pharmacia

Antikörper: mAk α -Mip: Dr. B. Bubert, Würzburg

Diagnose-Kit Lebendzählung: Molecular Probes

Radio-Nucleotide: Amersham-Buchler

6. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden vom Institut für Physiologische Chemie der Universität Würzburg und den Firmen Roth (Karlsruhe), MWG-Biotech (Ebersberg) und TIB Molbiol (Berlin) bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge	Sequenz 5'@3'	Verwendung
Uni	17mer	GTAAAACGACGGCCAGT	universal
Reverse	16mer	AACAGCTATGACCATG	universal
M820	19mer	CGTCAAACCTCCACTTCATC	pEWL 1 - Sequenz
M821	18mer	CCGCCAATTTTCCTGCTG	pEWL 1 - Sequenz
MF1	20mer	GCGTATTCGAGGAAATCTTC	pEWL 1 - Sequenz
MF2	18mer	GGCCAAACGTTTACGGTT	pEWL 1 - Sequenz
MF3	18mer	CAATCAGTGCGTGAGTTT	pEWL 1 - Sequenz
MF4	18mer	GCGGGATGTTGACTTGAT	pEWL 1 - Sequenz
MF5	20mer	CTGCTGTGGTGTCTTCTAGC	pEWL 1 - Sequenz
MF6	18mer	CAGTAGTTTGCTCAACCG	pEWL 1 - Sequenz
MF7	18mer	GGGGAGTGGCATTGTTGGT	pEWL 1 - Sequenz
MF8	19mer	GGTTCACCATCAAGACTGC	pEWL 1 - Sequenz
M313	18mer	AATCAACTCGTTCCCGGG	pEWL 1 - Sequenz
17396	18mer	CCATGTCTGAATTGGTTTCG	pEWL 1 - Sequenz
MIPMF 1	20mer	GTGTGTGAGATCGATGGCCC	pPILMF ₁ - Sequenz
MIPMF 5	18mer	GGCAGAATTACTGGGCGA	pPILMF ₁ - Sequenz
1416	25mer	GTATGAGCTCTTAAGTGTAAGACTA	pPILMF ₁ - Sequenz
MIPMF 6	19mer	GGCATAGATGTTAATCCGG	pPILMF ₁ - Sequenz
233	20mer	GATGGCTAAGCGTACTGCTG	pPILMF ₁ - Sequenz
1171	21mer	GTCGAATTCCTGGTCTGCTG	pPILMF ₁ - Sequenz
MIPMF 4	22mer	CCATTTAAAATCGATTTATCAG	<i>mip</i> -Anreicherung
MIPMF 2	23mer	AAATGAAATCGATAAACAGGCGC	<i>mip</i> -Anreicherung

7. Medien und Nährböden

7. 1. Medium für die Flüssiganzucht von Legionellen

GC-FC-Medium:	Proteosepepton Nr. 3	7,5 g
	K ₂ HPO ₄	2,0 g
	KH ₂ PO ₄	0,5 g
	Hefe-Extrakt	5,0 g
	H ₂ O bidest.	ad 450 ml
nach dem Autoklavieren:	Wachstumssupplement SR 110	50 ml
Wachstumssupplement SR 110: (Oxoid)	ACES-Puffer	1,0 g / 100 ml
	Eisenpyrophosphat	0,025 g / 100 ml
	L-Cystein-Hydrochlorid	0,04 g / 100 ml
	α-Ketoglutarat	0,1 g / 100 ml

7. 2. Nährboden für die Anzucht von Legionellen

ABCYE-Platten:	ACES	10 g
pH 6,9 (10 N KOH)	Hefe-Extrakt	10 g
	Aktivkohle	2 g
	Agar	15 g
nach dem Autoklavieren:	L-Cystein	0,4 g / 10 ml H ₂ O
	FeNO ₃	0,25 g / 10 ml H ₂ O
	H ₂ O bidest.	ad 1,0 l

7. 3. Nährlösung für die Anzucht von *E. coli*

YT-Medium:	Bacto Pepton	8,0 g
	Hefe-Extrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	H ₂ O bidest.	ad 1,0 l

7. 4. Nährlösung für die Anzucht von *Acanthamoeba castellanii* (ATCC Suppl., 1985)

PYG 712:	Proteosepepton No. 3	20,0 g
	Hefe-Extrakt	1,0 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10,0 ml 0,4M
	CaCl ₂	8,0 ml 0,05M
	Na-Citrat · 2H ₂ O	1,0 g
	Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	14,0 mg 0,005M
	Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	10,0 ml 0,25M
	KH ₂ PO ₄	10,0 ml 0,25M
	H ₂ O bidest.	900 ml
	(autoklavieren: 25 min, 120 °C)	
	Glucose	50,0 ml 2M
	(getrennt autoklavieren 25 min, 120 °C)	

Amoeben-Puffer: PYG 712 ohne Proteosepepton, Hefe-Extrakt, Na-Citrat und Glucose

7. 5. Nährlösung für die Anzucht von *Fischerella* sp.

BG-11:	NaNO ₃	1,5 g
(pH 7,1)	K ₂ HPO ₄	0,04 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,075 g
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,036 g
	Zitronensäure	0,006 g
	Eisen-Ammoniumzitrat	0,006 g
	EDTA (Dinatrium-Salz)	0,001 g
	Na ₂ CO ₃	0,02 g
	Spurenelemente-Mix A5	1,0 ml
	H ₂ O dest.	ad 1,0 l

Spurenelemente-Mix A5:	H_3BO_3	2,86 g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,81
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,222 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,39 g
	$\text{Co} (\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	49,4 mg
	H_2O dest.	1,0 l

7. 6. Warendeclaration von Blumenerde (Dehner)

Torfprodukt DIN 11540 - F50

Typenbezeichnung: Kultursubstrat

Zersetzungsgrad: Gemisch aus wenig und stark zersetztem Hochmoortorf
(H₂ - H₄ und H₇ - H₉)

pH - Wert: 5 - 6

Nährstoffgehalt: 50 - 300 mg/l N - Stickstoff
80 - 300 ng/l P₂O₅ - Phosphat
80 - 300 mg/l K₂O - Kaliumoxid

8. Antibiotikazusätze in Medien, Agarplatten und Zellkulturen

Ampicillin	100 µg / ml
Chloramphenicol	25 µg / ml
Gentamicin	80 µg / ml
Kanamycin	50 µg / ml
Rifampicin	50 µg / ml
Streptomycin	50 µg / ml (plasmidcodierte Resistenz) 100 µg / ml (chromosomale Resistenz)

9. Methoden

9. 1. Anzucht von Legionellen in Flüssigkultur

Es wird eine 5 ml Vorkultur in GC-FC-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. 100 ml GC-FC-Medium werden anschließend mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei 37 °C für weitere 2 Tage inkubiert.

9. 2. Anzucht von Legionellen auf BCYE-Agar-Platten

Die Kultivierung von Legionellen erfolgt auf gepuffertem Aktivkohle-Hefe-Extrakt-Agar (BCYE) bei 37 °C unter Zusatz von 5 % CO₂ für 3 Tage. Die Stämme werden maximal 5 Mal passagiert und können in sterilem, bidestilliertem Wasser bei -70 °C gelagert werden.

9. 3. Anzucht von *Acanthamoeba castellanii*

Die Aufzucht von axenischen Amoebenkulturen erfolgt in 250 ml Gewebekulturflaschen. 500 µl Amoebensuspension werden in 20 ml PYG 712 - Amoebenmedium gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen können nach 6 Tagen gesplittet werden. Die Lagerung einer dicht gewachsenen Amoebenkultur erfolgt in 50 % Glycerin bei -70 °C.

9. 4. Anzucht von *Fischerella* sp.

Die Kultivierung von Fischerellen erfolgt im Flüssigmedium BG-11 für Blau-Grün-Algen. Der Ansatz wird bei 37 °C und einer Lichtintensität von 3000 lux inkubiert. Die Subkultivierung der verzweigt-filamentös wachsenden Cyanobakterien erfolgt nach 3 bis 4 Wochen Wachstum.

9. 5. Extraktion chromosomaler DNA (Birnboim und Doly, 1979)

Die Zellen aus 2 ml Übernachtkultur in 1 x YT-Medium werden in einer Eppendorf-Zentrifuge 2 min abzentrifugiert, in 200 µl 0,15M NaCl / 0,1M EDTA (pH 8,0) gewaschen und in 100 µl 20%iger Saccharose / 10mM Tris-Cl (pH 8,0) resuspendiert. Durch Zugabe von 30 µl 250mM EDTA (pH 8,0) und 20 µl Lysozym-Lösung (20 mg / ml) erfolgt in einem 30-minütigem Inkubationsschritt bei 37 °C unter leichtem Schütteln die Protoplastierung der Zellen. Man gibt weitere 20 µl 250mM EDTA (pH 8,0) und 24 µl 10% SDS hinzu und bringt das Gesamtvolumen durch TES (pH 8,0) - Zugabe auf 500 µl. Nach Zugabe von 3 µl Proteinase K-Lösung (10 mg / ml) wird bis zum Aufklaren (ca. 1 h) geschüttelt. Es werden 125 µl 5M NaClO₄ hinzugegeben und nach Umfüllen in Röhrcchen diese zu gleichen Volumenanteilen mit

Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) befüllt. Man schüttelt bei Raumtemperatur bis eine homogene, weiße Suspension entsteht (1 - 2 h). Die Phasentrennung erfolgt durch 10-minütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge. Die obere, klare Phase wird mit 1 ml Ethanol abs. versetzt und für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die auf diese Weise gefällte chromosomale DNA wird pelletiert, in 50 - 70 µl H₂O bidest. gelöst und bei 4 °C gelagert.

9. 6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse

9. 6. 1. Normalansatz (Miniprep)

Lösungen:

Lsg. I:	Glucose	50 mM	Lsg. II:	NaOH	0,2 N
	EDTA	10 mM		SDS	1%
	Tris-Cl (pH 8,0)	25 mM			
	Lysozym	5 mg / ml	Lsg. III:	NaAc	3M
	(frisch ansetzen)			(pH 4,8)	
TE-Puffer:	Tris-Cl (pH 8,0)	10 mM			
	EDTA (pH 8,0)	1 mM			
Phenol:	Tris-Cl (pH 8,0)	1M	1 / 3 Vol %		
	Phenol		2 / 3 Vol %		

Eine Übernachtskultur von 1,5 ml in 1 x YT-Medium wird bei 8000 rpm für 20 min zentrifugiert und das Pellet mit 100 µl Lösung I (5 mg / ml Lysozym) versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT werden 200 µl Lösung II hinzugegeben, gevortext und 5 -10 min auf Eis inkubiert. Die protoplastierten Zellen werden durch Zugabe der alkalischen SDS-Lösung aufgeschlossen, so daß die Lösung schleimig klar wird. Man versetzt den Ansatz mit 150 µl Lösung III, inkubiert 10 min auf Eis und zentrifugiert anschließend für 10 min kalt ab. Chromosomale DNA und Proteine werden durch die Zugabe des Natrium-Acetats ausgefällt. Der Überstand wird 2 x phenolisiert und die Plasmid-DNA durch Zugabe eines doppelten Volumens Ethanol abs. für 1 h bei -70 °C gefällt. Die DNA wird abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Man zentrifugiert erneut und nimmt das getrocknete Pellet in 50 µl TE auf.

9. 6. 2. Großansatz (Maxiprep)

RNAse-Lsg.:	RNAse	1 mg / ml in
	Tris-Cl (pH 8,0)	5 mM

Der zehnfache Ansatz einer Übernachtskultur in 1 x YT-Medium (15 ml) wird in JA20-Zentrifugenröhrchen bei 8000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wird in 1 ml Lysozym-Lösung (5 mg / ml) resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Man gibt 2 ml alkalische SDS-Lösung hinzu, mischt gut und läßt den Ansatz für 10 min auf Eis stehen. Nach Zugabe von 1,5 ml 3M Natrium-Acetat (pH 4,8) erfolgt die Fällung von Zelltrümmern, Proteinen und chromosomaler DNA bei 10-minütiger Inkubation auf Eis. Diese werden bei 15000 rpm und 4 °C in 10 min pelletiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wird nicht direkt phenolisiert, sondern durch Zugabe von 9 ml Ethanol abs. zwischengefällt (1 h, -70 °C) und pelletiert (15000 rpm, 4 °C, 30 min). Das Pellet wird nach dem Trocknen in 400 µl TE aufgenommen und mit 8 µl RNAse (10 µg / µl) versetzt. Man inkubiert 30 min bei 37 °C, phenolisiert zwei Mal und fällt die DNA mit Ethanol abs. Nach dem Waschen und Trocknen wird das Sediment in 50 µl TE aufgenommen.

9. 7. Phenol-Extraktion (Thuring et al., 1975)

Die Phenolisierung ist eine Methode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren und Proteinen. Dazu wird die wässrige Lösung mit dem gleichen Volumenanteil Phenol versetzt, geschüttelt und zwecks Phasentrennung anschließend zentrifugiert. Die denaturierten Proteine bilden dabei eine Interphase zwischen der oberen, wässrigen, DNA-haltigen und der unteren Phenolphase. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen, mit dem gleichen Volumen Phenol / Chloroform im Verhältnis 1:1 versetzt und kräftig geschüttelt. Chloroform dient dabei der besseren Phasentrennung. Nach Zusatz von Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) werden verbliebene Phenolreste in der wässrigen Phase ausgeschüttelt.

9. 8. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wird mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt:

Plasmid-DNA: $OD_{260} = 1 \Rightarrow 50 \mu\text{g} / \text{ml}$

Oligos: $OD_{260} = 1 \Rightarrow 20 \mu\text{l} / \text{ml}$

9. 9. Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Man nützt hierzu die Eigenschaft von thermostabilen DNA-Polymerasen aus, die den Bereich zwischen zwei gewählten Primern aufpolymerisieren. Die Primer wählt man aus den Randbereichen der zu polymerisierenden DNA. Man setzt sie im Überschuß einem Reaktionsgemisch aus chromosomaler DNA, den vier Desoxynukleosid-Triphosphaten und der thermoresistenten Taq-Polymerase zu. Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragments beruht auf einer Kettenreaktion, die durch den zeitlich kontrollierten Wechsel der Temperatur ermöglicht wird. Es wiederholt sich stets ein Zyklus aus Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstrangs, Primeranealing und Polymerisierung des Gegenstrangs.

Reaktionsansatz:

- 1 μl 20 mM dATP
- 1 μl 20 mM dCTP
- 1 μl 20 mM dGTP
- 1 μl 20 mM dTTP
- 10 μl 10 x Taq-Polymerasepuffer
- 6 μl 25 mM MgCl_2
- 1 μl 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ chromosomale DNA
- je 1 μl 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ Primer 1 + 2
- 1 μl Taq-Polymerase

ad 100 μl H_2O bidest.

9. 9. 1. Amplifizierung von *mip*

Zur Amplifizierung des *mip*-Gens wurde 1 µl chromosomale DNA des Stammes *Legionella pneumophila* Ph I in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

Reaktionsbedingungen (Temperatur; Zeit):

Denaturierung:	94°C; 1 min
Hybridisierung:	54°C; 1 min
Polymerisierung:	72°C; 1 min
Anzahl der Zyklen:	30
initialer Denaturierungsschritt:	2 min
terminaler Elongationsschritt:	5 min

9. 10. Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonucleasen vom Typ II

10 x Universalpuffer:	Tris-Acetat (pH 7,9)	0,33 M
	Kaliumacetat	0,66 M
	Magnesiumacetat	0,1 M
	Dithiothreitol (DTT)	5 mM
	BSA	1 mg / ml
10 x Reaktionapuffer für <i>Sal</i> I:	Tris-Cl (pH 8,0)	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	NaCl	100 mM
10 x Reaktionspuffer für <i>Sma</i> I:	Tris-Cl (pH 7,4)	20 mM
	MgCl ₂	5 mM
	KCl	50 mM

Restriktionsendonukleasen ermöglichen es, DNA sequenzspezifisch zu schneiden, um auf diese Weise DNA-Fragmente gezielt zu ligieren, oder das Ergebnis einer Klonierung im Gel zu überprüfen. Pro Ansatz werden 1 - 2 μg DNA mit 5 - 10 Units des erforderlichen Restriktionsenzym gespalten. Der Spaltansatz enthält 2 μl 10 x Inkubationspuffer und wird mit H_2O bidest. auf 20 μl gebracht. Man inkubiert den Ansatz mit der für das Enzym optimalen Temperatur (i. d. R. 37 °C) und stoppt die Reaktion nach 2 Stunden durch Zugabe von 2 μl Stoppuffer ab. Der Stoppuffer ermöglicht zudem die Markierung der Lauffront im Agarosegel bei anschließender elektrophoretischer Auftrennung.

9. 11. Größentrennung von Biopolymeren durch Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird. Elektrophoresen erfolgen zumeist in einer elektrisch neutralen, festen Gelmatrix aus Agarose oder Polyacrylamid (PAA). Die Gele werden in Form von hochkant oder horizontal angeordneten Platten-Gelen gegossen. Die aufzutrennenden Proben werden in kleine Geltaschen einpipettiert, die aufgetrennten Moleküle treten nach der Elektrophorese als sog. Banden in Erscheinung. Das Wanderungsverhalten von Makromolekülen in derartigen Gelen hängt u. a. von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, der Nettoladung, der Makromolekülform und -größe, sowie der Ionenstärke, der Porengröße und der Temperatur der verwendeten inerten Matrix, ab.

Agarose - und Polyacrylamid - Gele wirken aufgrund ihrer Porenstruktur wie Molekularsiebe, die die Wanderung von Makromolekülen entsprechend ihrer Größe verlangsamen, während niedermolekulare Substanzen relativ frei durch die Matrix wandern können. Die Porengröße kann in Agarosegelen durch die Agarosekonzentration variiert werden, wobei sie mit steigender Konzentration der Matrixsubstanz absinkt. In PAA-Gelen bestimmt der Vernetzungsgrad und die PAA-Konzentration die Porengröße.

9. 11. 1. Elektrophorese von Nukleinsäuren

10 x Tris-Phosphatpuffer (pH 8,0):	Tris-Cl	108 g
	EDTA (pH 8,0)	40 ml
	H ₃ PO ₄ (85 %)	15,5 ml
	H ₂ O bidest.	ad 1,0 l

10 x Tris-Boratpuffer (pH 8,3):	Tris-Base	0,09 M
	Borsäure	0,09 M
	EDTA	2,5 mM

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar um so schneller, je kleiner sie sind. Während sich Konformationsunterschiede von Nukleinsäuren stark bemerkbar machen, hat die Zusammensetzung i. d. R. nur einen geringen Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit. So wandern z.B. unter nativen Bedingungen ringförmig geschlossene DNA-Moleküle, zirkuläre DNA mit offenen Phosphodiesterbindungen und lineare, doppelstängige DNA-Moleküle gleicher Länge sehr unterschiedlich.

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente werden entweder Tris-Phosphat-Gele (0,8 % Agarose, 75 mA, 16 h) oder Tris-Borat-Gele (1 % Agarose, 180 V, 1,5 h) eingesetzt. Die entsprechende Menge Agarose wird dazu in 200 ml des jeweiligen Puffers durch Erhitzen gelöst und in Form gegossen. Der Einschub eines Teflonkammes führt nach dem Auspolimerisieren des Gels zur Ausbildung der Probestaschen. Die Gele erlauben eine Auftrennung von Fragmenten mit einer Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kb Länge.

9. 11. 2. Elektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

10 x TGS-Laufpuffer: (pH 8,3)	Tris-CL	0,25 M
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 %

30 % Acrylamid-Lsg.:	Acrylamid	30 g
	N, N'-Methylen-Bisacrylamid	0,8 g
	H ₂ O bidest.	ad 100 ml

Trenngel (10 %):	Acrylamid	10 ml
	Tris-Cl (pH 8,8) 1,875 M	6 ml
	SDS (10 %)	0,3 ml
	H ₂ O bidest.	13,58 ml
	TEMED	45 µl
	APS (10 %)	75 µl
Sammelgel (5 %):	Acrylamid	5 ml
	Tris-Cl (pH 6,8) 0,625 M	3 ml
	SDS (10 %)	0,3 ml
	H ₂ O bidest.	21,58 ml
	TEMED	45 µl
	APS (10 %)	75 µl
Probenpuffer:	Tris-Cl (pH 6,8)	0,0625 M
	SDS	2 %
	Glycerin	10 %
	Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,05 %
Methylgrün-Lsg.:	Glycerin (50 %)	1 ml
	Tris-Cl (pH 6,8) 0,5 M	625 µl
	H ₂ O bidest.	875 µl
	Methylgrün	25 mg
PBS: (Phosphat-gepufferte Saline)	NaCl	8 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	KCl	0,2 g
	NaH ₂ PO ₄	1,14 g
	H ₂ O bidest.	ad 1,0 l

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt in Gegenwart von Denaturierungsreagentien. Negativ geladenes SDS lagert sich im konstanten Gewichtsverhältnis an die Proteine an und kompensiert vorhandene positive Partialladungen. Die Folge ist eine Wanderung zur Anode. Gleichzeitig werden die Proteine vollständig denaturiert und wandern daher entsprechend ihrer Molmasse in einem Gel geeigneter Porosität.

Die diskontinuierlich verlaufende Vertikalelektrophorese des Laemmli-Gelsystems zeichnet sich dadurch aus, daß die aufgetragenen Proteinproben zunächst in einer Sammelschicht konzentriert werden und von dort in das eigentliche Trenngel hineinwandern.

Trenn- und Sammelgel unterscheiden sich im pH und im Acrylamid- / Bisacrylamidgehalt. Die Hauptkomponente des Polymers ist Acrylamid, während Bisacrylamid für die Quervernetzung der Acrylamidpolymere verantwortlich ist.

Die Acrylamidmischung des Trenngels wird luftblasenfrei zwischen zwei mit Teflonspacern abgedichtete Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Butanol überschichtet. Der Luftabschluß fördert die schnellere Auspolymerisierung des Gels. Nach 1 h wird das Butanol entfernt und bis zum Glasrand die Sammelgelmischung auf das Trenngel gegossen. Ein Teflonkamm geeigneter Größe wird in die Gellösung geschoben und bildet nach der Polymerisierung die Geltaschen. Das Trenngel wird üblicherweise 10 cm, das Sammelgel 3 cm hoch gegossen. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird der Kamm und der untere Teflonspacer entfernt und die Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wird luftblasenfrei mit Laufpuffer befüllt und die Geltaschen mit den Proteinproben beladen. Die Elektrophorese erfolgt spannungskonstant bei 35 V für 16 h oder bei 150 V für 4 h. Kurz vor Beendigung des Gellaufs werden je 2 µl Methylgrün in die Geltaschen pipettiert, um die Spuren für die anschließende Westernblot-Analyse zu markieren.

9. 12. Gewinnung von Gesamtzellysaten für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

1,5 ml einer dicht gewachsenen Übernachtskultur von *E. coli* wird pelletiert, 2 x in je 3 ml kaltem PBS gewaschen und in 100 µl 1 x Laemmli-Puffer resuspendiert. Durch Erhitzen der Proben auf 100 °C für 10 min werden die Proteine denaturiert. Nachdem Zelltrümmer durch Zentrifugieren entfernt wurden, können die Proben für die SDS-PAGE verwendet werden, oder bei -20 °C gelagert werden.

9. 13. Westernblot- (Immunoblot-) Analyse

Die von Towbin et al. (1979) beschriebene Methode für den Proteintransfer auf Nitrozellulose bildet die Grundlage des von Kyhse-Andersen (1984) entwickelten "halbtrockenen" Verfahrens, daß mittels einer Graphitplatten-Kammer innerhalb kurzer Zeit den Proteintransfer ermöglicht.

Anodenpuffer I:	Tris	0,3 M
	Methanol	20 %
Anodenpuffer II:	Tris	25 mM
	Methanol	20 %
Kathodenpuffer:	Tris	25 mM
	Methanol	20 %
	ϵ -Amino-n-capronsäure	40 mM
Blockpuffer:	BSA	3 % in 1 x TBS
1 x TBS:	Tris-Cl (pH 7,5)	50 mM
	NaCl	150 mM
Entwicklerlsg.:	1 x TBS	47 ml
	0,3 % 4-Chloro-1-naphtol (in 100 % Methanol)	3 ml
	H ₂ O ₂ (30 %)	40 μ l
Ponçeau S - Lsg.:	2 % Ponçeau S in 30 % TCA	

9. 13. 1. Proteintransfer auf Nitrozellulose

Der Proteintransfer auf Nitrozellulose erfolgt über ein sog. halbtrockenes Verfahren. Die Blotkammer wird dabei wie nachfolgend beschrieben vorbereitet und beladen: die untere Graphitplatte (Anode) wird zunächst mit H₂O deion. befeuchtet. Daraufhin werden 6 Lagen Whatman-Papier auf Gelgröße zurechtgeschnitten, in Anodenpuffer I getränkt und auf die Anodenplatte gelegt. Man trinkt 3 Lagen Whatman-Papier in Anodenpuffer II und legt sie auf den bereits bestehenden Stapel. Es folgt ein in Anodenpuffer II angefeuchteter Nitrozellulose-Filter. Hierauf wird nun das SDS-Gel aufgelegt. Schließlich werden 9 Lagen Whatman-Papier in Kathodenpuffer getränkt und auf das Gel gestapelt. Die obere Graphitplatte (Kathode) wird daraufhin mit H₂O deion. befeuchtet und aufgesetzt. Alle Schichten müssen luftblasenfrei in Gelgröße aufeinander liegen. Der Proteintransfer erfolgt stromkonstant für 1 h bei Raumtemperatur mit 0,8 mA / cm². Eine Kühlung ist aufgrund der geringen Stromstärke nicht erforderlich.

9. 13. 2. Blocken des Nitrozellulosefilters

Der Filter mit den Proben wird eine Stunde lang in 3 % BSA geschüttelt, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Schweißt man ihn nun in Folie ein, so ist er bei -20 °C lagerfähig.

9. 13. 3. Färben des Markers

Der Filterstreifen mit den aufgetrennten Molekulargewichts-Standard wird nach dem Blotten vom Nitrozellulosefilter abgeschnitten, für 10 min in 2 % Ponçeau S gefärbt und anschließend unter Wasser gespült.

9. 13. 4. Antikörper-Inkubation

Nach der Absättigung erfolgt für eine Stunde die Antikörper-Inkubation in 10 ml 3 % BSA. Das Kaninchenserum mit dem monoklonalen Antikörper gegen das zu untersuchende Protein wird im Verhältnis 1 : 500 dem Puffer beigemischt. Danach wird der Filter 3 Mal für 10 min in 1 x TBS gewaschen und mit dem zweiten, Peroxydase-gekoppelten α -Kaninchen Ak vom Schwein (Verdünnung 1 : 1000) für eine weitere Stunde in 3 % BSA inkubiert.

9. 13. 5. Farbreaktion

Durch eine Peroxydase-katalysierte Farbreaktion lassen sich die auf Nitrozellulose immobilisierten und vom ersten Antikörper erkannten Proteine sichtbar machen. Der Filter wird 3 Mal für jeweils 20 min in 1 x TBS gewaschen und die Farbreaktion durch Zugabe von 50 ml Färbelösung gestartet. Nach 5 bis 10 min Inkubation wird die Reaktion durch Spülen in H₂O gestoppt. Der Nitrozellulosefilter wird schließlich an der Luft getrocknet und lichtdicht gelagert.

9. 14. DNA-Elution aus Agarosegelen

Die zu eluierende DNA-Bande wird mit dem Skalpell unter UV-Licht so knapp wie möglich aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Cap mit einem Plastikspatel mechanisch zerkleinert. Der grobe Gelbrei wird mit etwa der Menge an Phenol versetzt, die man an wässriger DNA-Lösung aus dem Gel eluieren kann (200 - 400 µl Phenol) und gut gevortext. Man inkubiert 20 min bei -70 °C und zerkleinert die Gelbruchstücke während des Auftauens zu einem feinen Brei. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge für 15 min trennt sich die wässrige DNA-Lösung vom Phenol ab und kann als obere Phase abgenommen werden. Sie wird mit dem gleichen Volumen Phenol / Chloroform (1 : 1) versetzt, gut ausgeschüttelt, mit Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) erneut gevortext und schließlich mit 1 / 10 Vol% Natriumacetat in doppeltem Volumen Ethanol abs. für 1 Stunde bei -70 °C gefällt. Die DNA wird anschließend kalt pelletiert (15 min), mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

9. 15. Herstellung kompetenter Zellen (Dagert, 1979)

3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* in 1 x YT-Medium wird zehnfach verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von 125 Klett-Einheiten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden auf Eis abgekühlt und in JA20-Röhrchen kalt abzentrifugiert (4 °C, 8000 rpm, 10 min). Man wäscht das Zellsediment in 10 ml eiskalter 0,05M CaCl₂-Lösung, zentrifugiert erneut und resuspendiert nochmals in 0,05M CaCl₂-Lösung. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen pelletiert und in 3 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Dieser Ansatz kann nun für eine Transformation genutzt werden. Um die Zellen im Kompetenzstadium für mehrere Monate haltbar zu machen, versetzt man sie mit Glycerin (Endkonzentration 25 %), inkubiert 1 - 2 Stunden auf Eis und friert sie bei -70 °C in Aliquots zu je 100 µl ein.

9. 16. Ligation von DNA-Fragmenten

5 x Reaktionspuffer für	Tris-Cl (pH 7,5)	66 mM
T4 DNA-Ligase	ATP	1 mM (in 10 mM Tris-Cl)
	DTT	2 mM
	BSA	0,1 mg / ml

Fragment- und Vektor-DNA werden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und über ein Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wird aus dem Gel eluiert, gefällt, gewaschen und getrocknet. Man resuspendiert die Pellets von Insert- und Vektor-DNA in 15 µl H₂O, wobei die Fragment-DNA in dreifachem Überschuß (3 µl) der Vektor-DNA (1 µl) zugesetzt wird. Man versetzt die DNA-Lösung mit 4 µl 5 x Ligasepuffer, gibt dem Ansatz 1 Unit Ligase hinzu und inkubiert 20 h bei 14 °C. Der Ligationsansatz ist nun für eine Transformation einsatzbereit.

9. 17. Transformation (Dagert, 1979)

Der Ligationsansatz wird mit 100 µl kompetenter Zellen versetzt und 1 Stunde zwecks Adaptation auf Eis inkubiert. Für 60 sec erfolgt ein Hitzeschritt bei 42 °C, die Zellen werden danach sofort wieder auf Eis gelagert. Man versetzt den Ansatz mit 1 ml YT-Medium und läßt die Zellen 2 Stunden lang bei 37 °C wachsen, bevor sie auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert werden.

9. 18. Radioaktive Markierung von DNA durch Random-Priming

Diese Methode beruht auf der Verwendung einer chemisch synthetisierten Mischung aller statistisch denkbaren Hexanukleotide, die als Primer an die zuvor denaturierte DNA binden. Der komplementäre Strang wird in einer nachfolgenden Enzymreaktion vom 3'-OH-Ende durch das Klenow-Enzym mit radioaktiv markierten Desoxynukleosidtriphosphaten aufgefüllt.

25 ng der zu markierenden DNA werden in 9 µl H₂O gelöst und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die DNA wird auf Eis abgekühlt. Man gibt der Lösung je 1 µl der nicht radioaktiven Desoxynukleosidtriphosphate dCTP, dGTP und dTTP hinzu und versetzt den Ansatz mit 2 µl Reaktionsmix. Nach Zugabe von 5 µl \cong 50 µC [α -³²P] dATP (3000 Ci / mMol) und 1 µl Klenow-Enzym wird der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt, indem man 10 min auf 65 °C erhitzt und / oder 2 µl 0,2M EDTA (pH 8,0) zugibt.

Es wird ein Kit der Firma Boehringer mit nachfolgendem Inhalt verwendet:

Control-DNA:	20 μ l 12,5 μ g / ml λ -DNA
dATP:	50 μ l Desoxyadenosin-5'-triphosphat 0,5 mM in Tris-Puffer
dCTP:	50 μ l Desoxycytidin-5'-triphosphat 0,5 mM in Tris-Puffer
dGTP:	50 μ l Desoxyguanosin-5'-triphosphat 0,5 mM in Tris-Puffer
dTTP:	50 μ l Desoxythymidin-5'-triphosphat 0,5 mM in Tris-Puffer
Reaktionsgemisch:	100 μ l Hexanukleotidgemisch in 10 x Reaktionspuffer
Kleenow-Enzym:	50 μ l Kleenow-Enzym 2 U / μ l in 50 % Glycerin

Die DNA wird mit 5 μ l \cong 50 μ C [α - 32 P] dATP, 3000 Ci / mM gelabelt.

9. 19. Didesoxy-Sequenzierung mit dem " 17 Sequencing TM Kit" (Pharmacia)

(Sanger, 1977)

40 % Acrylamid-Lsg.:	Acrylamid	193 g
	Bisacrylamid	6,7 g
	H ₂ O bidest.	ad 500 ml
Sequenzier-Gel:	Acrylamid-Lsg. (40 %)	10 ml
	10 x TBE	5 ml
	Harnstoff	11,5 g
	H ₂ O bidest.	ad 50 ml
	Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	250 μ l
	TEMED	50 μ l

Zur Sequenzierung wurde der "T7 Sequencing™ Kit" (Pharmacia) verwendet. Der Kit enthält folgende Lösungen:

'A' Mix-Short & -Long:	ddATP in Lösung mit dATP, dCTP, dGTP, dTTP
'C' Mix-Short & -Long:	ddCTP in Lösung mit dATP, dCTP, dGTP, dTTP
'G' Mix-Short & -Long:	ddGTP in Lösung mit dATP, dCTP, dGTP, dTTP
'T' Mix-Short & -Long:	ddTTP in Lösung mit dATP, dCTP, dGTP, dTTP
T7 DNA-Polymerase:	in gepufferten Glycerin-Lsg.
"Enzyme Dilution Buffer":	gepufferte Lsg. aus Glycerin, BSA und DTT
Universal-Primer:	5'-d[GTAAAACGACGGCCAGT]-3' in wässriger Lsg. 0,8 µM (4,44 µg / ml)
"Annealing Buffer":	gepufferte Lsg. aus MgCl ₂ und DTT
"Labeling Mix-dATP":	dCTP, dGTP und dTTP in Lösung
Stop-Lsg.:	deionisierte Formamid-Lsg., die EDTA, Xylencyanol und Bromphenolblau enthält
"Control Template":	10 µl ss-M13 mp 18 DNA in 50 µl Tris-EDTA Puffer

Das Sanger-Verfahren zur Bestimmung der Basenfolge in einem DNA-Fragment ist ein enzymatisches Verfahren, bei dem DNA-Polymerase eingesetzt wird. Als Substrat für das Enzym werden zusätzlich zu den normalen Desoxynukleosidtriphosphaten 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate verwendet. Der Einbau der Dideoxy-Verbindungen bewirkt den Abbruch der Synthese. Die zu sequenzierende DNA muß in einzelsträngiger Form vorliegen. Das Prinzip des Sequenzierverfahrens beruht auf der Erzeugung einer Population unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die sich alle durch ein identisches Ende und ein variables Ende mit jeweils einer der vier möglichen Basen der DNA auszeichnen. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden in den dünnen, hoch auflösenden Sequenzgelen durch Gelelektrophorese voneinander getrennt.

Die Reaktionsdurchführung erfolgt nach Angabe des Herstellers:

2 µg DNA werden in 8 µg H₂O bidest. verdünnt und mit 2 µl 2N NaOH versetzt. Man inkubiert den Ansatz 10 min bei Raumtemperatur und fällt anschließend die nun einzelsträngige DNA durch Zugabe von 3 µl 3M NaAc (pH 4,8), 7 µl H₂O bidest. und 60 µl Ethanol abs. Der Ansatz wird zu diesem Zweck 15 min auf Trockeneis inkubiert. Die DNA wird pelletiert (10 min), mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl H₂O bidest. aufgenommen. Der Primer wird

durch Zugabe von 2 µl "Annealing-Buffer" und der gleichen Menge an Primer-Lösung an die ss-DNA hybridisiert. Der Ansatz wird dazu für 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur stehen gelassen. In der Zwischenzeit bereitet man die Reaktionsgefäße vor, in die je 2,5 µl der jeweiligen Didesoxynukleotide einpipettiert werden ("A" Mix-Short, "C" Mix-Short, "G" Mix-Short, "T" Mix-Short) und stellt die Caps auf Eis. Die T7 DNA-Polymerase wird mit dem "Enzyme Dilution Buffer" aus dem Kit auf 1,5 U / µl verdünnt. Um den Enzym-Premix zu vervollständigen, werden diesem nun 3 µl "Labeling Mix-dATP", 3 Units T7 DNA-Polymerase und 1 µl [α -³²P] dATP zugesetzt. Der Ansatz wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden die Caps mit den Didesoxynucleotide-Mixen für 1 min bei 37 °C vorgewärmt. Nun gibt man jeweils 4,5 µl des Reaktionsansatzes in die Caps und inkubiert nochmals 5 min bei 37 °C, bevor die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stop-Lösung und 3-minütiger Inkubation bei 95 °C terminiert wird. Ein zuvor durch halbstündigen Lauf vorgewärmtes Sequenziergel kann nun mit je 2,5 µl in der Reihenfolge "G, A, T, C" beladen werden. Man läßt das Gel bei 40 Watt laufen. Je nach Lauflänge (kurz, mittel, lang) trägt man nach 2,5 Stunden erneut Proben auf, beendet den letzten Lauf jedoch, wenn die Bromphenolblau-Front herausläuft (ca. nach 1,5 Stunden). Das Gel wird danach vorsichtig auf Whatman-Papier übertragen, mit Folie abgedeckt und 1,5 Stunden unter Vakuum bei 80 °C getrocknet. Dann wird ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt und über Nacht exponiert.

9. 20. Extraktion von Gesamt-RNA aus Legionellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach dem für Legionellen optimierten "RNeasy-System zur Purifikation von Gesamt-RNA aus Bakterien" (Qiagen GmbH, Hilden). Dieses System beruht auf der selektiven Bindung von Gesamt-RNA an einer auf Silica-Gel basierenden Säule. Über einen speziellen Puffer mit hohem Salzgehalt wird die Bindung von bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von über 200 Basen an die Silica-Gel-Membran ermöglicht. Während Gesamt-RNA spezifisch bindet, werden Kontaminationen in Form von Proteinen und DNA durch die Kombination von verschiedenen Waschpuffern effizient entfernt. Die zunächst durchzuführende Lyse und Homogenisierung der Bakterien erfolgt unter hoch denaturierenden Bedingungen und ermöglicht die Inaktivierung von RNasen und damit die Isolierung von intakter RNA. Dieser Schritt erfolgte unter Verwendung eines speziellen Puffers zur Protoplastierung der Zellen, der in Kombination mit einer Ultraschall-Behandlung den Aufschluß der Zellen erst ermöglichte.

Lösungen:

Protoplasting Buffer (200 ml):	15mM Tris (pH 8,0)	3 ml 1M Tris
	0,45M Sucrose	30,81 g Sucrose
	8mM EDTA (pH 8,0)	3,2 ml 0,5M EDTA
		ad 200 ml H ₂ O
DEPC-H ₂ O:	H ₂ O bidest.	1,0 l
	Diethylpyrocarbonat	2 ml

Pufferlösungen des RNeasy-Kits zur RNA-Extraktion (RLT, RW 1, RPE)

Versuchsdurchführung:

3 ml einer Übernachtskultur von *Legionella pneumophila* werden 1:100 verdünnt in 10 ml GC-FC-Medium angesetzt. Man läßt die Zellen bis zu einer Klett-Zahl von 120 wachsen und zentrifugiert sie für 7 min bei 7000 rpm und 4 °C in einer Kühlzentrifuge. Das Zellpellet wird daraufhin zunächst in 2 ml Protoplasten-Puffer resuspendiert und 2 x 22sec ultrabeschallt (Intervall 80; Pause 20 sec). Das Volumen des Ansatzes wird nun durch Zugabe von Protoplasten-Puffer auf 10 ml erhöht und mit 100 µl Lysozym-Lösung (100 mg / ml in TE) versetzt. Man inkubiert den Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur. Die Protoplasten werden bei 7000 rpm in 5 min sedimentiert und in 350 µl "Lysis Buffer RLT" resuspendiert. Dem Puffer wird kurz vor Verwendung 10 µl / ml β-ME zugesetzt. Man gibt 250 µl Ethanol abs. hinzu und resuspendiert erneut. Daraufhin wird das Lysat auf die RNeasy-Säule aufgetragen und in der Tischzentrifuge für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die Säule mit 700 µl Waschpuffer RW 1 gewaschen (15 sec). Es folgt ein weiterer Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer RPE. Nach erneutem Waschen in 500 µl RPE wird zur Eliminierung von Restalkohol auf der Säulenmembran für 2 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Die RNA-Elution erfolgt abschließend mit 30 - 50 µl DEPC-behandeltem Wasser durch 1-minütige Zentrifugation bei 10000 rpm. Die Proben werden bei -80 °C gelagert.

9. 21. Messung von RNA-Konzentrationen

Ein Aliquot der extrahierten RNA wird 30- bis 40fach mit DEPC-Wasser verdünnt (Endvolumen 500 μ l) und die Absorption bei 260 und bei 280 nm photometrisch gemessen. Während bei einer Wellenlänge von 260 nm hauptsächlich Nukleinsäuren absorbieren, kann bei 280 nm der Proteinanteil ermittelt werden. Der Quotient A_{260} / A_{280} stellt somit ein Maß für die Qualität der extrahierten RNA dar und sollte einen Wert von 1,8 erreichen oder überschreiten.

$$A_{260} = 1 \Rightarrow 40 \mu\text{g RNA} / \text{ml}$$

9. 22. RNA-Analyse durch Northern-Hybridisierung

Lösungen:

10 x MOPS: 0,2M MOPS
 0,05M Na-Acetat
 0,01M EDTA

Die Größenbestimmung intakter mRNA wird durch Northern-Hybridisierung ermöglicht. Extrahierte RNA wird dabei über ein Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Als denaturierendes Agens dient Formaldehyd. Die RNA wird im Anschluß an die Elektrophorese auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe hybridisiert. Anhand des Bandenmusters ist nach Autoradiographie des Röntgenfilms eine Größenordnung der RNA möglich.

9. 22. 1. Herstellung des Agarose-Formaldehyd-Gels

3 - 4,5 g Agarose werden in 219 ml H_2O aufgekocht und im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt. Unter einem Abzug gibt man 30 ml 10 x MOPS-Puffer und 16,2 ml Formaldehyd (37 % Vol / Vol) hinzu, mischt gut und fügt 20 μ l Ethidiumbromid (10 mg / ml) zu. Unter dem Abzug wird das Gel in die RNA-Gelkammer gegossen und diese nach dem Auspolymerisieren des Gels mit 1 x MOPS-Laufpuffer befüllt.

9. 22. 2. RNA-Gelelektrophorese

5 x Formaldehyd-Ladungspuffer:	ges. Bromphenolblau	16 μ l
	500 mM EDTA	80 μ l
	EtBr (10 mg / ml)	100 μ l
	37 % (=12,3 M) Formaldehyd	720 μ l
	100 % Glycerin	2 ml
	Formamid	3084 μ l
	10 x MOPS	4 ml
	DEPC-H ₂ O	ad 10 ml

10 -20 μ g RNA (max. 10 μ l) werden mit 40 μ l 5 x Formaldehyd-Ladungspuffer versetzt, gut gemischt und bei 65 °C für 5 min inkubiert. Die Proben werden kurz auf Eis gekühlt, dann auf das Gel geladen und dieses gestartet. Der Lauf erfolgt bei 5 - 7.5 V / cm für 2 - 3 Stunden und wird beendet, wenn die Bromphenolblau-Front ca. zur Hälfte ins Gel gelaufen ist. Das Gel wird daraufhin 3 x 10 min in 10 x SSC geschwenkt, um überschüssiges Formaldehyd auszuwaschen.

9. 22. 3. RNA-Transfer auf Nitrozellulose durch Northern-Blotting

Lösungen:

Fragmentierlsg.:	250mM	HCl
Denaturierlsg.:	0,5N	NaOH
	1,5M	NaCl
Neutralisierlsg.:	0,5M	Tris-Cl (pH 7,5)
	1,5M	NaCl
20 x SSC	0,3M	Na-Citrat
	3M	NaCl

Der Transfer der RNA auf Nitrozellulose wird mittels einer Vakuum-Blotkammer durchgeführt. Der Nitrozellulosefilter wird um etwa 0,5 cm größer geschnitten, als das zu blottende Gel, kurz in Wasser befeuchtet und für 5 - 10 min in 20 x SSC getränkt. Der Filter wird nun auf die poröse Membran der Blotkammer gelegt, deren Ränder mit einer auf Gelgröße zurechtgeschnittenen Folienmaske luftdicht abgedeckt werden. Das Gel wird daraufhin mittig auf den Filter gelegt, so daß seine Randbereiche die Aussparung der Maske luftdicht abschließen. Die Blotkammer wird geschlossen und ein Vakuum von 50 mbar angelegt.

Sukzessive wird das Gel für je 8 - 10 min mit Fragmentier-, Denaturier- und Neutralisier-Lösung bedeckt. Vor Auftrag der jeweils nächsten Lösung muß die vorhergehende Lösung sorgfältig aus der Blotkammer entfernt werden. Nach erfolgter Denaturierung der RNA wird der eigentliche Transfer durch Auftrag von 20 x SSC auf des Gel eingeleitet. Die Übertragung der RNA auf den Filter erfolgt in einem Zeitraum von 45 min durch Aussalzen, wobei das angelegte Vakuum die SSC-Lösung durch Gel und Filter saugt. Nach dem Transfer wird die RNA auf dem Nitrozellulosefilter für 3 - 4 min unter UV-Licht fixiert oder bei 80 °C im Vakuumofen gebacken. Der Filter kann nun für Hybridisierungen verwendet werden.

9. 22. 4. Northern-Hybridisierung

Lösungen:

Hybridisierungs-Mix:	50 % Formamid	10 ml (100 %)
	5 x SSC	5 ml (20 x)
	0,1 % SDS	0,2 ml (10 %)
	1mM EDTA (pH 7,5)	0,2 ml (0,1M)
	5 x Denhardt's-Lsg.	1 ml (100 x)
	50mM Tris-Cl (pH 7,5)	1 ml (1M)
	H ₂ O bidest.	ad 20 ml
		+ 150 µl ss Hering-Sperma-DNA
100 x Denhardt's-Lsg.:	Polyvinyl-Pyrrolidin	2 g
	Ficoll	2 g
	BSA	2 g
	H ₂ O	ad 100 ml

Der Nitrozellulosefilter mit der zuvor fixierten RNA wird mit der vorgewärmten Lösung des Hybridisier-Mixes in einem Röhrchen bei 42 °C im Rotations-Ofen vorhybridisiert. Die dem Mix zugesetzte denaturierte Hering-Sperma-DNA dient dabei der Absättigung unspezifischer DNA-Bindungsstellen und führt letztlich zur Minimierung des Hintergrundrauschens. Nach sechs Stunden wird die Lösung gegen einen Ansatz ausgewechselt, der die radioaktiv markierte Probe enthält. Bei gleicher Temperatur wird über Nacht inkubiert. Anschließend wird der Filter 2 x 30 min in 2 x SSC / 0,1 % SDS bei 42°C gewaschen. Man kontrolliert den Filter mit dem Geigerzähler und wiederholt den Waschvorgang 2 x 30 min bei 56 °C mit

0,1 x SSC / 0,1 % SDS. Nun wird der Filter in Folie eingeschweißt und gegebenenfalls unter Verwendung von Verstärkerfolien auf einem Röntgenfilm exponiert.

9. 23. Nachweis der bakteriellen Lebensfähigkeit

Der Nachweis bakterieller Lebensfähigkeit erfolgt im 2-Farben Fluoreszenz-Test via LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, NL-Leiden).

Komponenten: a) SYTO 9: grün fluoreszierender DNA-Farbstoff
 b) Propidiumjodid: rot fluoreszierender DNA-Farbstoff

Beide Farbstoffe differieren in ihrer Spektralcharakteristik und ihrer Fähigkeit, Bakterienzellen zu penetrieren. Wird SYTO 9 alleine benutzt, färbt es im allgemeinen alle Bakterien - sowohl die mit intakter Membran, als auch solche mit beschädigter Membran. Im Gegensatz dazu penetriert Propidiumjodid nur Bakterien mit geschädigter Membran und tritt daher mit SYTO 9 in Konkurrenz um die DNA-Bindungsstellen, wenn beide Farbstoffe genutzt werden. In entsprechender Konzentration eingesetzt, werden Bakterien mit intakter Membran grün fluoreszierend angefärbt, während solche mit geschädigter Membran rot fluoreszieren.

Färbe-Protokoll:

Es werden je gleiche Volumina beider Farbstoffe gemischt und 3 µl / ml der Lösung zur Bakteriensuspension gegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird ein geeignetes Volumen der angefärbten Bakterien auf einen 13 mm Polycarbonat-Filter (0,2 µl, geschwärzt) auffiltriert. Der Filter wird mit "mounting oil" eingedeckt und kann nun mikroskopisch ausgewertet werden.

9. 24. Rasterelektronenmikroskopie von *Fischerella* sp.

Die zu untersuchenden *Fischerella*-Filamente werden aus ihrem Medium entnommen und in 6,25 % Glutaraldehyd (in Cacodylat-Puffer) überführt. Der Ansatz wird bei 5 °C für 18 Stunden inkubiert. Mittels Pipette wird nun das Glutaraldehyd abgenommen und die Zellen 5 Mal mit Sörensen-Puffer gewaschen. In einer aufsteigenden Acetonreihe (50, 70, 90, 96, 100 % ; 2 x je 15 min) erfolgt die Entwässerung der Proben. Die Kritisch-Punkt-Trocknung wird in flüssigem CO₂ bei 5 °C durchgeführt. Das derart aufbereitete Zellmaterial wird mit Lötzinn fixiert und erhält eine Gold-Sputterung. Die Auswertung der Proben erfolgt im Rasterelektronenmikroskop.

9. 25. Infektion von *Acanthamoeba castellanii* mit *Legionella pneumophila*

Die Zellen einer axenisch gewachsenen Amoebenkultur werden mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer auf einen Wert von 10⁵ Zellen / ml eingestellt. Man pipettiert je 1 ml der Zellsuspension in die Wells einer Infektionsplatte und läßt die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur am Boden adhären. Nach Ausbildung des semikonfluenten Amoeben-Layers wird das Medium abgesaugt und gegen vorgewärmten (37 °C) Amoeben-Puffer ausgewechselt. Die Amoeben werden nun mit einer MOI ("multiplicity of infection") von 10 (10⁶ Bakterien / Well in 10 µl) mit Bakterien beimpft. Um einen schnellen Kontakt der Bakterien mit den Amoeben zu gewährleisten, werden die Infektionsplatten für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Sorvall RT 600). Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C wird der Amoeben-Layer 2 Mal vorsichtig mit Puffer gewaschen. Noch verbliebene extrazelluläre Bakterien werden daraufhin durch den Zusatz von Gentamicin (80 µg / ml) abgetötet. Um den Infektionszyklus nicht zu unterbrechen, wird nach einer Stunde der gentamicinhaltige Puffer durch antibiotikafreien Puffer ersetzt. Dieser Zeitpunkt wird als Null-Wert der Infektion definiert. Nach Inkubation des Ansatzes bei 37 °C werden zu bestimmten Zeitpunkten (0 h, 1,5 h, 6 h, 1 - 3 d) die Wirtszellen mit einer Pipette stark resuspendiert und die intrazellulär vermehrten Bakterien in entsprechender Verdünnung zwecks Ermittlung der CFU-Rate ("colony forming unit") ausplattiert.

9. 26. Fluoreszenz-Markierung von Oligonukleotid-DNA-Sonden

Material:

0,2 mol Oligonukleotid mit C6-TFA-Aminolinker am 5'-Ende (18mer, bp 705 bis 722 aus 16S rRNA von *L. pneumophila* (variabler Bereich);

Sequenz: 5'--- CTGGTGTTCCTTCCGATC ---3' in 200 µl H₂O deion. (MWG Biotech.)

1M NaHCO₃ / Na₂CO₃ , pH 9

Dimethylformamid

FLUOS-Kit (Boehringer, Mannheim)

Sephadex G-25 Säule (Pharmacia)

15 %iges Polyacrylamidgel: kein Sammelgel, Kamm mit 3 Tachen von 3 cm Breite

80 mA, 250 volt, 1,5 bis 2 h

Gelansatz: 40 ml PAA 15 % (14,25 g Acrylamid, 0,75 g Bisacrylamid,

10 ml NN-Puffer, ad 100 ml H₂O); 360 µl APS (10 %);

36 µl TEMED

NN-Puffer: 162,0 g Tris; 27,5 g Borsäure; 10,3 g EDTA ad 1l H₂O deion.

DC-Fluoreszenzplatte

20 %ige Saccharoselösung

TE-Puffer (pH 7,2) (siehe 8.7.1.)

Nansorb-Säule 20 (Du Pont)

Triethylamin / Te-Puffer (70 µl / 50 ml)

Methanol

Durchführung:

60 µl Oligonukleotid, 120 µl H₂O, 50 µl 1M NaHCO₃ / Na₂CO₃-Puffer und 25 µl FLUOS-Farbstoff werden zur Fluoreszenzmarkierung der Sonde in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wird anschließend mittels einer Sephadex G-25 Säule abgetrennt. Dazu wird die Säule zunächst 3 Mal mit H₂O gewaschen und dann der Reaktionsansatz in 250 µl H₂O aufgetragen. Der 2. bis 7. Durchlauf (je 200 µl H₂O / Durchlauf auf die Säule geben) wird gesammelt, kurz zentrifugiert und in der Vakuumzentrifuge für 2 h getrocknet. Über ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel werden nicht markierte Oligonukleotide separiert. Dazu werden die Fraktionen vereinigt, in 100 µl H₂O aufgenommen und mit 50 µl Saccharoselösung versetzt. Nach dem Gellauf wird die markierte

Sonde unter UV-Licht (365 nm) auf einer DC-Fluoreszenzplatte ausgeschnitten. Die Gelblöckchen werden zerkleinert und in 1 ml TE-Puffer aufgenommen (je 2 Blöckchen). Nach kurzem Zentrifugieren wird der Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren. Der Gelbrei wird ein weiteres Mal in 1 ml TE aufgenommen und über Nacht geschüttelt, dann erfolgt ein neuer Elutionsschritt. Für die nachfolgende Salzabtrennung der vereinigten Probe über eine Nansorb-Säule wird diese zunächst mit 2 ml 100% Methanol und 2 ml Triethylamin-Lösung equilibriert. Zusammen mit Triethylamin-Lösung wird die Probe bis zum Säulenende durchgedrückt. Nach Zugabe von 1 ml 50 % Methanol beginnt diese abzusinken. Die farbige Probe wird inklusive zwei bis drei nachfolgender farbloser Tropfen gesammelt, auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wird die Sonde in 50 µl H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

9. 27. *In situ* Hybridisierung von *L. pneumophila* mit fluoreszenz-markierter Oligonukleotid-DNA-Sonde

Material und Lösungen:

Fluoreszenz-markierte Oligonukleotid-DNA-Sonde (LEG705) (Amman et al., 1990)

1 x PBS: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄ ad 1 l H₂O

Paraformaldehyd: 4% in PBS, pH 7,2, bei max. 70 °C lösen

Hybridisierungspuffer: 0,9 M NaCl; 0,01 % SDS; 20 mM Tris-Cl, pH 7,2

Waschpuffer: 40 mM NaCl; 20 mM Tris-Cl; 0,01 % SDS; 5 mM EDTA

Ethanol

Citrifluor (UKG Chem. Laboratory)

Durchführung:

Die zu untersuchende Bakterienkultur wird je nach Zelldichte durch Zentrifugieren aufkonzentriert (5000 g, 25 min), das Pellet in 100 µl Überstand resuspendiert und mit 0,6 ml 4 % Paraformaldehyd in PBS für 3 - 4 Stunden fixiert. Man wäscht 2 Mal mit 1 x PBS und überführt 4-7 µl der Zellsuspension auf einen mit Aceton entfetteten Objektträger. Auf einem Thermostaten läßt man die Zellen bei 37 °C in 15 min auftrocknen und entwässert sie in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (40, 50, 80, 96 %; je 3 min). Zur Hybridisierung wird 1 µl Sonde (100 ng / µl) mit 9 µl Hybridisierungs-Puffer gemischt und dieser Ansatz auf die fixierten Zellen aufgetropft. Man inkubiert den Objektträger in einer mit Hybridisierungspuffer angefeuchteten Kammer für 3 Stunden bei 43 °C. Anschließend wird der Objektträger in

50 ml vorgewärmtem Waschpuffer für 15 - 20 min eingestellt. Man spült vorsichtig mit H₂O bidest. und läßt den Objektträger im Dunkeln trocknen. Durch Auftropfen von 3 µl Citifluor wird die Probe eingedeckt und kann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden (Phaco 2, 40 x).

9. 28. Proteintrennung durch HPLC (High Performance Liquid Chromatography):

Nachweis von Homogentisat (HGA)

Die Trennleistung normaler Säulenchromatographie ist durch Inhomogenitäten in der Matrix begrenzt, wodurch ein ungleichmäßiger Lösungsmittelfluß durch die Säule bewirkt wird. Durch verbesserte Füllmaterialien auf Kieselgelbasis, die zu einem einheitlichen Säulenbett verpackt sind, wird in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie in einer solchen Säule eine sehr gute Auflösung erreicht. HPLC-Säulen haben aufgrund ihrer sehr dicht gepackten Partikel vernachlässigbare Flußraten, solange kein hoher Druck angelegt wird. Ein ausreichend hoher Druck führt dabei zu einer entsprechend schnellen Flußrate des Lösungsmittels. In der üblichen Säulenchromatographie ist die Flußrate niedrig, damit die aufzutrennenden gelösten Stoffe sich gleichmäßig auch im Innern der großen Matrixpartikel verteilen. In der HPLC erfolgt die Gleichgewichtseinstellung mit dem Innern der winzigen Perlen äußerst schnell, daher lassen sich gelöste Substanzen mit unterschiedlichen Affinitäten für die Matrix sehr effizient sogar bei hohen Flußraten trennen. Im Gegensatz zur normalen Chromatographie benötigt die HPLC zur Trennung eines Proteingemischs nur wenige Minuten und ist damit die Methode der Wahl, um viele Proteine und kleine Moleküle aufzutrennen.

Durchführung:

Der Nachweis von Homogentisat (HGA) erfolgt durch Proteinfractionierung mittels einer mit Photodioden-Detektor (uv-vis Detektor UVD 340 S, Gynkotec, Germering) ausgestatteten HPLC. Die Kulturüberstände der *Legionella* - Stämme, wie auch der von *E. coli* werden nach 24 h (*L.pneumophila*) bzw. 48 h (*E. coli*) abgenommen, bei 12.000 g für 10 min zentrifugiert, und schließlich durch einen 0,2 µm-Membranfilter sterilfiltriert. Die Filtrate werden mit 0,1 Volumen 1,0 N Perchlorsäure versetzt und bis zum Auftrag auf die Säule bei -20 °C gelagert. Je 20 µl der aufgetauten Proben werden auf die mit Knauer Eurospher 100-C18 (5µm) bepackten Trennsäule (125 x 4 mm) aufgetragen. Als Lösungsmittel für die Separation dient ein mit Phosphorsäure auf pH 2 gepufferter linearer Gradient von 100 % A (10 % MeOH, 90 % H₂O) bis 100 % B (MeOH). Ein Lauf dauert 45 min, dem ein 5 min-Segment von 100 % A vor

jedem weiterem Lauf vorgeschaltet ist. Die Elution der Fraktionen wird bei einer Wellenlänge von 300 nm detektiert.