

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen 1, 2 und 3 aufgeführt.

Tabelle 1: *Escherichia coli*-Wildstämme

<i>E. coli</i> -Wildstamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
86-24	EHEC, O157:H7; <i>recA</i> ⁺ , <i>leuX</i> ⁺ ; Stx2-konvertierender Phage ϕ 86-24	Donnenberg <i>et al.</i> , 1993
86-24r	isogene <i>recA</i> -Mutante (Δ <i>recA::cat</i>) von EHEC O157:H7 86-24, Cm ^R	I. Mühldorfer, Fuchs <i>et al.</i> , 1999
86-24 Δ 4.4	isogene <i>leuX</i> -Mutante von EHEC O157:H7 86-24	diese Arbeit
TUV86-2	isogene <i>stx</i> ₂ -Mutante (Δ <i>stxA</i> ₂ :: Δ <i>stxB</i> ₂) von EHEC O157:H7 86-24	Gunzer <i>et al.</i> , 1998
TUV86-2r	isogene <i>recA</i> -Mutante (Δ <i>recA::cat</i>) von TUV86-2, Cm ^R	I. Mühldorfer, Fuchs <i>et al.</i> , 1999
UMD619	<i>eae</i> -Mutante (Δ <i>eae</i> ::Tc ^R) von EHEC O157:H7 86-24, Tc ^R	Donnenberg <i>et al.</i> , 1993
86-24 Sm ^R	spontan Sm ^R Mutante von EHEC O157:H7 86-24, avirulent	I. Mühldorfer
TUV86-1	isogene <i>stx</i> ₂ -Mutante (Δ <i>stxA</i> ₂ :: Δ <i>stxB</i> ₂) von 86-24 Sm ^R	diese Arbeit
EDL933	EHEC, O157:H7; <i>recA</i> ⁺ ; Stx2-konvertierender Phage 933W, Stx1-konvertierender Phage 933J	O'Brien <i>et al.</i> , 1983, Strockbine <i>et al.</i> , 1986
EDL933r	isogene <i>recA</i> -Mutante (Δ <i>recA::cat</i>) von EHEC O157:H7 EDL933, Cm ^R	I. Mühldorfer, Fuchs <i>et al.</i> , 1999
EDL933-Cu	60 MDa Virulenzplasmid-freie Variante von O157:H7 EDL933	Karch <i>et al.</i> , 1987
536	UPEC, O6:K15:H31; <i>hlyI</i> ⁺ , <i>hlyII</i> ⁺ , <i>pil</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>recA</i> ⁺ , Sm ^R	Berger <i>et al.</i> , 1982
536r	isogene <i>recA</i> -Mutante (Δ <i>recA::cat</i>) von UPEC O6:K15:H31 536, Sm ^R , Cm ^R	I. Mühldorfer, Fuchs <i>et al.</i> , 1999
536-21	<i>paiI</i> - und <i>paiII</i> -Deletionsmutante von UPEC O6:K15:H31 536, Sm ^R	Hacker <i>et al.</i> , 1983

Tabelle 2: *Escherichia coli* K-12-Stämme

<i>E. coli</i> K-12-Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r</i> _k ⁻ , <i>m</i> _k ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ ⁻ , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bethesda Research Laboratories, 1986
Sm10 <i>Ipir</i>	<i>thi1</i> , <i>thr1</i> , <i>leuB6</i> , <i>supE44</i> , <i>tonA21</i> , <i>lacY1</i> , <i>recA</i> ⁻ ::RP-4-2-Tc::Mu, Km ^R , <i>Ipir</i>	Miller und Mekalanos, 1988
SY3271 <i>Ipir</i>	F ⁻ , <i>araD</i> , Δ (<i>lac-pro</i>), <i>argE</i> (Am), Rif ^R , <i>nalA</i> , <i>recA56</i> , <i>Ipir</i>	Miller und Mekalanos, 1988

MG1655	λ^- , F^- , Fim^+	Blomfield <i>et al.</i> , 1991, Guyer <i>et al.</i> , 1981.
HB101	F^- , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>hsdD20</i> , (<i>hsr^-</i> , <i>hsm^-</i>), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>lacZ4</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsL20</i> (Sm^R), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-5</i> , <i>mtl-1</i> , λ^-	Boyer und Roulland- Dussoix, 1969
LG1522	<i>ara</i> , <i>fepA</i> , <i>lac</i> , <i>leu</i> , <i>mtl</i> , <i>proC</i> , <i>rpsL</i> , <i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>tonA</i> , <i>trpE</i> , <i>xyl</i> ; trägt das Plasmid ColV-K30 <i>iuc</i> . Indikatorstamm für Aerobaktin.	Carbonetti und Williams, 1984
C600	<i>supE44</i> , <i>hsdR</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i>	Appleyard, 1954
C600(933W)	C600, Stx2-konvertierender Phage 933W	Strockbine <i>et al.</i> , 1986
C600r(933W)	<i>recA^-</i> isogene Mutante von C600(933W)	I. Mühl dorfer
C600(ϕ 86-24)	C600, Stx2-konvertierender Phage ϕ 86-24	I. Mühl dorfer
C600r(ϕ 86-24)	<i>recA^-</i> isogene Mutante von C600(ϕ 86-24)	I. Mühl dorfer
C600(ϕ TUV86-1)	C600, Δ <i>stxA2::\Delta</i> <i>stxB2</i> Phage ϕ 86-24	diese Arbeit
SF25	Transposonmutante des Phagen 933W in C600(pADR- 28), Cm^R , Tc^R	diese Arbeit
SF53	Transposonmutante des Phagen 933W in C600(pADR- 28), Cm^R , Tc^R	diese Arbeit
SF59	Transposonmutante des Phagen 933W in C600(pADR- 28), Cm^R , Tc^R	diese Arbeit
SF67	Transposonmutante des Phagen 933W in C600(pADR- 28), Cm^R , Tc^R	diese Arbeit
SF75	Transposonmutante des Phagen 933W in C600(pADR- 28), Cm^R , Tc^R	diese Arbeit
SF106	Transposonmutante des Phagen 933W in C600(pADR- 28), Cm^R , Tc^R	diese Arbeit
SF156	Transposonmutante des Phagen 933W in C600(pADR- 28), Cm^R , Tc^R	diese Arbeit
SF158	Transposonmutante des Phagen 933W in C600(pADR- 28), Cm^R , Tc^R	diese Arbeit
158-R1	Reinfektante des Phagen aus SF158 in C600	diese Arbeit
158-R2	Reinfektante des Phagen aus SF158 in C600	diese Arbeit
158-R3	Reinfektante des Phagen aus SF158 in C600	diese Arbeit
158-R4	Reinfektante des Phagen aus SF158 in C600	diese Arbeit

Tabelle 3: *Salmonella typhimurium*-Stämme

<i>S. typhimurium</i> -Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
TA2700	Indikatorstamm für Katecholate, ausgenommen DHBA	Luckey <i>et al.</i> , 1972
SR1001	Indikatorstamm für DHBA	Rabsch <i>et al.</i> , 1991 Rabsch, 1998

1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Vektoren und Plasmide

Plasmid	Vektor, relevante Eigenschaften	Referenz
pUC18	<i>ori</i> ColE1, Ap ^R , <i>lacZ</i> α , 2,7 kb	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pLG339	<i>ori</i> pSC101, Tc ^R , Km ^R , 6,2 kb	Stoker <i>et al.</i> , 1982
pGP704	<i>ori</i> R6K, <i>mob</i> RP4, Ap ^R , 3,7 kb	Miller und Mekalanos, 1988
pCVD442	aus pGP704, <i>sacB</i> , Ap ^R , 6,2 kb	Donnenberg und Kaper, 1991
pMMB66EH, -HE	<i>ori</i> V, <i>ori</i> T, IncQ, <i>lacI</i> ^Q , <i>rrnB</i> , Ap ^R , 8,8 kb	Fürste <i>et al.</i> , 1986
pSU2716	<i>ori</i> P15A, Cm ^R , <i>lacZ</i> α , 2,3 kb	Martinez <i>et al.</i> , 1988
pTUV1	pGP704 mit 0,6 kb upstream und 0,9 kb downstream-Sequenzen der <i>stx</i> ₂ -Region, Ap ^R , 5,2 kb	diese Arbeit
pTUV2	pTUV1 mit <i>sacB</i> , Ap ^R , 9,2 kb	diese Arbeit
pUCsacB	pUC18 mit <i>Bam</i> HI-integrierter <i>sacB</i> -Cassette (2 kb), Ap ^R , 4,7 kb	A. Donohue-Rolfe
pADR-28	pLG339 mit 933W-Phagen-DNA, <i>stxA</i> ₂ :: <i>TnphoA</i> , Tc ^R , 12,1 kb	Mühdorfer <i>et al.</i> , 1996
pZT344	1,5 kb <i>Tn10d</i> -Cam in Plasmid mit <i>Tn10</i> Transposase vor <i>tac</i> Promotor, Ap ^R , 7,2 kb	Elliott und Roth, 1988
pFUX158	pUC18 mit 6,8 kb <i>Hind</i> III-Fragment mit Transposon <i>Tn10d</i> -Cam aus dem Phagen des Stamms SF158, 9,5 kb	diese Arbeit
pPSR1	pUC18 mit 686 bp wildtypischem ORF A aus 933W (PCR-Produkt mit Primern cat-7 und cat-8) in <i>Sal</i> I-Site, Ap ^R , 3,4 kb	diese Arbeit
pPSR2HE / pPSR2EH	pMMB66HE / pMMB66EH mit Insert aus pPSR1 in <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI-Sites kloniert, Ap ^R , 9,5 kb	diese Arbeit
pFLX1	pUC18 mit 1.336 bp PCR-Fragment mit <i>leu</i> -1/ <i>leu</i> -2 (EHEC komplette <i>leuX</i> -Region) in <i>Sma</i> I-Site, Ap ^R , 4,0 kb	diese Arbeit
pFLX2	pUC18 mit EHEC <i>leuX</i> upstream -Fragment 678 bp (PCR-Fragment mit <i>leu</i> -1/ <i>leu</i> -5) in <i>Sma</i> I-Site, Ap ^R , 3,4 kb	diese Arbeit
pFLX3	pUC18 mit EHEC <i>leuX</i> downstream-Fragment 575 bp (PCR-Produkt mit <i>leu</i> -2/ <i>leu</i> -6) in <i>Sma</i> I-Site, Ap ^R , 3,3 kb	diese Arbeit
pFLX4	pUC18 mit EHEC Δ <i>leuX</i> -Gesamtfragment 1.234 bp (Inserts aus pFLX2 und pFLX3) in <i>Sma</i> I-Site, Ap ^R , 3,9 kb	diese Arbeit
pFLX5	pCVD442 mit EHEC Δ <i>leuX</i> -Gesamtfragment 1.234 bp (Insert aus pFLX4) in <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I-Sites kloniert, Ap ^R , 7,4 kb	diese Arbeit
pGBB51	pSU2716 mit 250 bp <i>leuX</i> (<i>E. coli</i> 536)-Fragment mit in <i>Hinc</i> II-Site, Cm ^R , 2,6 kb	Ritter <i>et al.</i> , 1995

1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den Tabellen 5 und 6 dargestellt. Sie wurden alle bezogen von der Firma MWG Biotech. Oligonukleotide, die für die DNA-Sequenzierung im LICOR-DNA-Sequenzierer verwendet wurden, wurden bereits mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD am 5'-Ende markiert gekauft.

Tabelle 5: In dieser Arbeit eingesetzte nichtmarkierte Oligonukleotide (PCR, Northern Hybridisierung)

	Sequenz (5'-3'), Verwendung	Referenz
SLT-II-1	CTTCGGTATCCTATTCCCGG Nachweis <i>stx</i> ₂ (5'-Primer)	Olsvik und Strockbine, 1993
SLT-II-2	GGATGCATCTCTGGTCATTG Nachweis <i>stx</i> ₂ (3'-Primer)	Olsvik und Strockbine, 1993
UB-2	CGGGATCCGACGACTGATTGCATTCCGG <i>Bam</i> HI Amplifikation <i>stx</i> ₂ -upstream-Fragment (3'-Primer)	diese Arbeit in: Gunzer <i>et al.</i> , 1998
UB-3	GCTCTAGACAGAGCAATTGCCTTCTGAGC <i>Xba</i> I Amplifikation <i>stx</i> ₂ -upstream- / <i>stx</i> ₂ -Gesamtfragment (5'-Primer)	diese Arbeit in: Gunzer <i>et al.</i> , 1998
FG-1	CGGGATCCGAGTTTTCCAAGTATAATGAG <i>Bam</i> HI Amplifikation <i>stx</i> ₂ -downstream-Fragment (5'-Primer)	diese Arbeit in: Gunzer <i>et al.</i> , 1998
FG-2	GGAATTCCTTGCCTGGCTCCTCTGGTGAT <i>Eco</i> RI Amplifikation <i>stx</i> ₂ -downstream- / <i>stx</i> ₂ -Gesamtfragment (3'-Primer)	diese Arbeit in: Gunzer <i>et al.</i> , 1998
SF-1	GACCAGAGATGCATCCAGAGC Nachweis <i>stx</i> ₂ -Deletionsbereich (5'-Primer)	diese Arbeit
SF-2	GCACAATCCGCCGCCATTGC Nachweis <i>stx</i> ₂ -Deletionsbereich (3'-Primer)	diese Arbeit
SF-3	CCTGGACGTTTGGGACAGC Nachweis <i>sacB</i>	diese Arbeit
SF-4	CCGTTTGCTAACTCAGCCG Nachweis <i>sacB</i>	diese Arbeit
cat-7	GATTGGCACGGAGTCAC Amplifikation Fragment Bakteriophage 933W (5'-Primer)	diese Arbeit
cat-8	CAGGTTAGCCACGGTT Amplifikation Fragment Bakteriophage 933W (3'-Primer)	diese Arbeit
leu-1	GACCGTGATACCACCACACA Amplifikation <i>leuX</i> -upstream-Fragment und <i>leuX</i> -Gesamtregion (5'-Primer)	Ritter, 1996
leu-2	ACCAAGCGCTGCAAAAAGAT Amplifikation <i>leuX</i> -downstream-Fragment und <i>leuX</i> -Gesamtregion (3'-Primer)	Ritter, 1996
leu-5	CGCCACGTCGACACTGAAGA <i>Sal</i> I Amplifikation <i>leuX</i> -upstream-Fragment (3'-Primer)	Ritter, 1996
leu-6	AATAGACGTCGACTGAGGTC <i>Sal</i> I Amplifikation <i>leuX</i> -downstream-Fragment (5'-Primer)	Ritter, 1996
leu-8	CGGCACCAAAAGTATGTAAA Nachweis intaktes <i>leuX</i> (5'-Primer), zusammen mit leu-2	diese Arbeit

leuXdel	CTTCAGT <u>GTCGACT</u> GAGG <i>SaII</i> Nachweis Deletion <i>leuX</i> (5'-Primer), zusammen mit leu-2	diese Arbeit
leuX3	CGGTTGATTTTGAATCAACTGCGTC Sonde gegen <i>leuX</i> im Anticodonbereich	Dobrindt, 1999

Tabelle 6: Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

	Sequenz (5'-3'), Verwendung	Referenz
M13 Universal	TGTAACGACGGCCAGT multiple cloning site pUC18	MWG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGACC multiple cloning site pUC18	MWG
FG-5	ATACCACTCTGCAACGTG Deletionsbereich in <i>stx₂</i>	diese Arbeit in: Gunzer <i>et al.</i> , 1998
cat-2	AGAGCCTGATAAAAACGG Transposon Tn10d-Cam	diese Arbeit
cat-4	TGTTCACTACTGACGGGGT Transposon Tn10d-Cam	diese Arbeit
leu-9	GGGGTGCCTGGAGTGTGA Deletionsbereich <i>leuX</i>	diese Arbeit
leu-10	GTTGACCTTGAGAGAGTT Deletionsbereich <i>leuX</i>	diese Arbeit

1.4 Bakteriellles Toxin

Das in dieser Arbeit verwendete gereinigte Shiga-Toxin 2 (Stx2) (Donohue-Rolfe *et al.*, 1984) wurde freundlicherweise von Anne V. Kane, Leiterin des Intestinal Microbiology Core, GRASP (Gastroenterology Research in Absorptive and Secretory Processes) Center, Boston, zur Verfügung gestellt.

1.5 Antikörper

- Polyklonaler Schweineantikörper gegen **Stx2** (Gunzer *et al.*, 1998, erhalten von A. Donohue-Rolfe, North Grafton)
- Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen **Stx2** (Donohue-Rolfe *et al.*, 1984, erhalten von A. Donohue-Rolfe, North Grafton)
- Monoklonaler Mäuseantikörper gegen **Stx2**: 4D1 (IgG1, spezifisch gegen B-Untereinheit von Stx und Stx2) (Donohue-Rolfe *et al.*, 1989, erhalten von A. Donohue-Rolfe, North Grafton)
- Monoklonaler Mäuseantikörper gegen **Stx2**: 3D1 (IgM, spezifisch gegen A-Untereinheit von Stx und Stx2) (Donohue-Rolfe *et al.*, 1989, erhalten von A. Donohue-Rolfe, North Grafton)
- Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen **Typ 1-Fimbrien** (*E. coli* IHE3034): K1374 (erhalten von B. Westerlund-Wikström, Helsinki)
- Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen gereinigte **H7-Flagellen** (*E. coli* IHE3034) (erhalten von B. Westerlund-Wikström, Helsinki)
- Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen **Intimin** (α RIHisEae) (McKee und O'Brien, 1996, erhalten von M. Wachtel, Bethesda, Maryland)
- Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen **OmpA** (erhalten von Y. Stierhof, Tübingen)

1.6 DNA-, Protein- und RNA-GrößenmarkerDNA-Größenmarker (alle Angaben in kb):

SPP1 x <i>Eco</i> RI:	Gibco BRL 1 kb-Leiter:	MBI Fermentas 1kb-Leiter:
7,85	12,216	10,000
6,97	11,198	8,000
5,86	10,180	6,000
4,70	9,162	5,000
3,38	8,144	4,000
2,68	7,126	3,500
1,89	6,108	3,000
1,80	5,090	2,500
1,45	4,072	2,000
1,33	3,054	1,500
1,09	2,036	1,000
0,88	1,636	0,500
0,67	1,018	
0,48	0,506; 0,517	
0,38	0,396	
	0,344	
	0,298	
	0,220	
	0,201	
	0,154	
	0,134	
	0,075	

Protein-Größenmarker (alle Angaben in kD):

Boehringer Mannheim Low-range Marker:	Amersham RPN 756:	Bio-Rad Prestained SDS-PAGE Standard:
97,4	blau 220	143
66,2	braun 97,4	97
39,2	rot 66	50
26,6	gelb 46	35
21,5	orange 30	30
14,4	blau 21,5	22
	magenta 14,3	

Gibco BRL BENCHMARK
Protein Ladder:

220
160
120
100
90
80
70
60
50
40
30
25
20
15
10

RNA-Größenmarker (alle Angaben in kb):

Gibco BRL
0,24 - 9,5 kb RNA Leiter

9,49
7,46
4,40
2,37
1,35
0,24

1.7 Medien und Nährböden

Die Medien werden, soweit nicht anders vermerkt, mit dest. Wasser angesetzt und für 20 min bei 123°C und 2,2 bar autoklaviert. Hitzeunbeständige Zusätze werden filtersterilisiert und den Medien nach Abkühlen auf 50°C zugegeben.

LB-Medium: 10 g/l Casein-Pepton
 5 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl
 für Agarplatten 15 g/l Agar zusetzen

Dipyridil-Hämin-Agar: 1 l LB-Agar werden nach dem Abkühlen auf 50°C folgende
Komponenten zugesetzt:
 30 µg/ml Hämin
 30 µg/ml L-Histidin
 0,12 % Triethanolamin
 0,6 mM Dipyridyl

M9-Medium: 10 x M9-Salze: 60 g/l Na₂HPO₄
 30 g/l KH₂PO₄
 5 g/l NaCl
 10 g/l NH₄Cl

Für 1 l M9-Medium werden 890 ml dest. Wasser autoklaviert, für Agarplatten werden dem Wasser 15 g/l Agar zugesetzt. Nach Abkühlen auf 50°C werden folgende getrennt sterilisierten Komponenten zugefügt:

100 ml/l 10 x M9-Salze
1 ml/l 1 M MgSO₄
100 µl/l 1 M CaCl₂
10 ml/l 20 % Glucose

MacConkey-Agar: 50 g/l Difco MacConkey-Agar (enthält 1 % Lactose)

Saccharose-Agar: LB-Agar ohne NaCl
 10 % Saccharose
 (hierfür 50 % Saccharoselösung sterilfiltrieren, 200 ml davon zu 800 ml autoklavierten, auf 50°C abgekühlten Agar geben)

Schafblut-Agar: Agarplatten mit gewaschenen Schafserythrozyten (von Oxoid)

Schwärmagar: LB-Medium mit 3 g/l Agar

SOC-Medium:	100 x SOC-Salze:	1 M NaCl
		250 mM KCl
		1 M MgCl ₂
		1 M MgSO ₄
		sterilisieren
	Medium:	20 g/l Casein-Pepton
		5 g/l Hefeextrakt
		10 ml/l 100 x SOC-Salze (nach Autoklavieren zugeben)

Weichagar für Phagen-Plaques-Assay: LB-Medium mit 7,5 g/l Agar

Antibiotika:

	<u>einzusetzende Konzentration</u>	<u>Lösungsmittel für Stocklösung</u>
Ampicillin	100 µg/ml	dest. Wasser
Chloramphenicol	30 µg/ml	abs. Ethanol
Mitomycin C	200 ng/ml	dest. Wasser
Tetracyclin	10 µg/ml	abs. Ethanol

Sonstige Zusätze:

	<u>einzusetzende Konzentration</u>	<u>Lösungsmittel für Stocklösung</u>
Dipyridyl	0,6 mM	dest. Wasser
IPTG	1 mM	dest. Wasser
X-Gal	80 mg/ml	N,N'-Dimethylformamid

1.8 Chemikalien, Enzyme, Kits, Geräte und Sonstiges

Chemikalien, Enzyme und Filterprodukte:

Chemikalien und Grundstoffe für Medien wurden bezogen von den Firmen Aldrich, Biomol, Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Difco, Fluka, ICN Biomedicals, Merck, Oxoid, Roth, Serva und Sigma.

Die verwendeten Enzyme wurden gekauft bei den Firmen Biozym Diagnostik, bio-Veda, Boehringer Mannheim, Eurogentec, Gibco BRL, New England Biolabs, Pharmacia Biotech und Promega.

Filterprodukte wurden geliefert von den Firmen Millipore, Pall sowie Schleicher und Schuell.

Medien und Materialien für die Zellkultur wurden bezogen von den Firmen PAA, Sigma und Falcon.

Kits:

ECL-Kit	Amersham
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit	Amersham
GeneClean-Kit	Bio 101/Dianova
Random Primers DNA Labeling System	Gibco BRL
ProtoBlot Immunoscreening System	Promega
Sure-clone Kit	Pharmacia Biotech

Filme:

Röntgenfilm:	x-ray Retina XBD
ECL-Film:	Amersham Hyperfilm ECL
Farbabzüge:	Fujichrome Sensia II daylight, 100 ASA

Geräte:

Analysenwaage:	Chyo JL-180
Brutschrank:	memmert; Heraeus
Bunsenbrenner:	Fireboy eco
Computerprogramme:	Microsoft Office 97 GCG (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)
CO ₂ -Brutschrank:	Heraeus
DNA-Vakuumblotkammer:	Pharmacia LKB VacuGene XL (Blotkammer) Pharmacia LKB VacuGene Pump (Vakuumpumpe)
DNA- und RNA-Gelkammern:	Bio-Rad; Hartenstein; Roth
DNA-Sequenziergerät:	MWG biotech LI-COR DNA-Sequencer, Modell 4000 inclusive Software
Dotblotter:	Schleicher und Schuell
Elektroporationsgerät:	Bio-Rad Gene Pulser
ELISA-Reader:	Bio-Rad Model 450
Filterstanzgerät:	Millipore
Frenchpress:	SLM Aminco
Gefrierschrank - 20°C:	pivileg senator
Gefrierschrank - 80°C:	Revco
Gefriertruhe - 80°C:	Revco
Geldokumentationssystem:	Bio-Rad Gel Doc 2000
Geltrockner:	Hoefer Scientific Instruments
Großzentrifugen:	Beckman J2-HC Sorvall RC-5B
Hybridisierungsofen:	MWG Biotech
Kühlschrank:	senator
Kühlzentrifugen:	Heraeus Biofuge 13 R Heraeus Megafuge 1.0 R
Klett-Photometer:	Klett Summerson
Magnetrührer:	GLW M21
Mikropipetten:	Gilson pipetman P20, P200, P1000
Mikrowelle:	Philips M630
Mixer:	Vortex Genie 2
Netzgerät:	Consort E 455 Bio-Rad PowerPac 300
PCR-Maschine:	biomed Thermocycler 60 Techne Progene
pH-Meter:	Heidolph MR 3001
Photometer:	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000
Photoapparat:	Nikon F 601 M
Protein-Minigelkammer:	Bio-Rad Mini-Protean II
Schüttler:	GLW L-40 GFL 3005
Schüttelinkubator:	innova 4300; Hartenstein
Schweißgerät:	privileg
Sterilbank:	Nunc Microflow Biological Safety Cabinet
Szintillationszähler:	berthold LB 1210 B
Tischzentrifuge:	Eppendorf
Tischinkubator:	Liebisch
Ultrazentrifuge:	Sorvall OTD-75
UV-Crosslinker:	GS Gene Linker UV Chamber
UV-Transilluminator:	Biometra
Vakuumgerät (DNA-Minipräp):	Promega Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold

Vakuengerät (96-well Filterplatten):	Millipore
Vakuumofen:	Heraeus
Vakuumpumpe:	KNF Neuberger
Vakuumzentrifuge:	uniequip univapo 150H
Videokamera, Bildbearbeitungssystem:	hama cosmicar, Cybertech CS 1
Waagen:	Chyo MP3000
Wasserbäder:	GFL
Westernblot Graphitkammer:	Institutswerkstatt

1.9 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen werden, soweit nicht anders vermerkt, mit destilliertem Wasser angesetzt.

6 x Agarosegel-Ladepuffer:	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol FF
	15 %	Ficoll Typ 400 (Pharmacia)

Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer):	100 mM	Tris-HCl
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	pH 9,5	

Denaturierungslösung:	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl

5 x Laemmli-Puffer:	I.	1,1 g	SDS
		0,41 g	EDTA
		0,17 g	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O
		1,1 ml	β-Mercaptoethanol
		pH-Wert mit NaOH auf 7,2 einstellen, mit H ₂ O _{dest.} auffüllen auf 10 ml	
	II.	0,2 %	Bromphenolblau in 50 % Glycerin
III.	I. und II. zu gleichen Teilen mischen		

Neutralisierungslösung:	0,5 M	Tris-HCl pH 8
	1,5 M	NaCl

P1:	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
	pH 8	

P2:	0,2 N	NaOH
	1 %	SDS

10 x PBS:	80 g/l	NaCl
	2 g/l	KCl
	11,5 g/l	Na ₂ HPO ₄
	2 g/l	KH ₂ PO ₄

Saline:	0,9 %	NaCl
---------	-------	------

20 x SSC:	175,3 g/l 88,2 g/l pH 7	NaCl Na-Citrat			
1 x TAE:	40 mM 1mM	Tris-Acetat EDTA	50 x TAE:	242 g/l 57,1 ml/l 100 ml/l	Tris-Base Essigsäure 99,7 % EDTA (0,5 M, pH 8)
0,5 x TBE:	45 mM 1 mM	Tris-Borat EDTA	5 x TBE:	54 g/l 27,5 g/l 20 ml/l	Tris-Base Borsäure EDTA (0,5 M, pH 8)
1 x TPE:	90 mM 2 mM	Tris-Phosphat EDTA	10 x TPE:	108 g/l 15,5 ml/l 40 ml/l	Tris-Base 85 % Phosphorsäure EDTA (0,5 M, pH 8)
1 x TBS/Tween:	10 mM 0,9 % pH 7,5 0,05 %	Tris-HCl NaCl Tween 20	10 x TBS/Tween:	100 ml/l 90 g/l 5 ml/l	1 M Tris-HCl pH 7,5 NaCl Tween 20

2. Methoden

2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.1.1 Kleiner Maßstab (DNA-Reinigung mit Diatomeenerde)

Der Stamm mit dem gewünschten Plasmid wird unter dem Selektionsdruck eines geeigneten Antibiotikums in einer Übernachtskultur angezüchtet. 2 ml der Kultur werden abzentrifugiert und das Sediment in 150 µl Puffer I aufgenommen. 150 µl Puffer II werden zugefügt, das Eppendorfgefäß zum Mischen einige Male invertiert und für 5 min auf Eis gestellt. Danach werden 150 µl Puffer III hinzupipettiert, gut gevortext und nochmal für 5 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine werden 5 min bei voller Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Zum klaren Überstand werden 900 µl L6-Puffer sowie 50 µl Diatoms gegeben und 1 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wird der Ansatz in eine Spritze überführt, die über eine Fritte an eine Vakuumapparatur angeschlossen ist, und die Flüssigkeit wird abgesaugt. Die in der Fritte verbleibende Diatomeenerde wird mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Nach vollständigem Absaugen des Puffers wird die Fritte in ein leeres Eppendorfgefäß gesetzt, die noch verbleibende Flüssigkeit für 20 sec aus dem Sediment herauszentrifugiert und die Fritte in ein frisches Gefäß überführt. Zum Lösen der DNA von der Diatomeenerde werden 50 µl bidest. Wasser (steril) auf die Diatomeenerde pipettiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Lösung für 20 sec in das Gefäß zentrifugiert.

Lösung I: s. 1.9 (Puffer P1)

Lösung II: s. 1.9 (Puffer P2)

Lösung III: 3 M Na-Acetat
pH 4,8

L6-Puffer: 100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 6,4
8,8 ml 0,5 M EDTA pH 8
13,2 ml H₂O_{dest.}
2,6 ml Triton X-100
120 g Guanidinthiocyanat

Diatoms: 10 g Diatomeenerde
50 ml H₂O_{dest.}
500 µl HCl_{konz.}

Waschpuffer: 10 ml 5 M NaCl
5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
2,5 ml 0,5 M EDTA pH 8
H₂O_{dest.} ad 250 ml
250 ml Ethanol

2.1.2 Mittlerer Maßstab (QIAGEN)

Je nach Kopienzahl des zu isolierenden Plasmids werden 50 bis 200 ml Übernachtskultur des plasmidhaltigen Stamms mit einem geeigneten Antibiotikum angezüchtet. Die Zellen werden geerntet und in 4 ml Puffer P1 aufgenommen. Der Suspension werden 4 ml Puffer P2 zugesetzt, das Gefäß zum Mischen mehrmals invertiert und 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 4 ml Puffer P3 wird der Ansatz nochmal vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis gestellt. Bei Kulturvolumina von mehr als 100 ml müssen die Mengen der Puffer P1, P2 und P3 verdoppelt werden. Das Zellpräzipitat wird bei 30.000 x g und 4°C zweimal für 15 min abzentrifugiert. Währenddessen wird eine QIAGEN-tip 100 Säule mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Der klare Zentrifugationsüberstand wird auf die Säule aufgetragen und diese danach mit 20 ml Puffer QC gewaschen. Die Elution der

gebundenen DNA erfolgt mit 5 ml Puffer QF. Nach Zugabe von 3,5 ml Isopropanol zum Eluat wird die DNA bei 4°C gefällt. Daraufhin wird sie für 30 min bei 15.000 x g und 4°C abzentrifugiert, das Pellet mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 bis 200 µl bidest. Wasser (steril) aufgenommen.

P1:	s. 1.9	
P2:	s. 1.9	
P3:	3 M pH 5,5	K-Acetat
QBT:	750 mM 50 mM 15 % pH 7 0,15 %	NaCl MOPS Ethanol Triton X-100
QC:	1 M 50 mM 15 % pH 7	NaCl MOPS Ethanol
QF:	1,25 M 50 mM 15 % pH 8,5	NaCl Tris-HCl Ethanol

2.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *E. coli*

Die Zellen aus 1 ml Übernachtskultur werden geerntet und in 1 ml Puffer TNE gewaschen. Das Pellet wird in 270 µl TNEX aufgenommen, 30 µl Lysozym (5 mg/ml) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) zupipettiert und die Ansätze so lange bei 65°C verdaut, bis die Lösung klar ist. Die freigesetzte DNA wird nach Zugabe von 15 µl 5 M NaCl und 500 µl eiskaltem 100 % Ethanol unter vorsichtigem Schwenken gefällt und für 10 min in der Kühlzentrifuge bei voller Geschwindigkeit abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit eiskaltem 80 % Ethanol gewaschen, für 20 min luftgetrocknet und in 100 µl bidest. Wasser (steril) aufgenommen.

TNE:	10 mM 10 mM 10 mM pH 8	Tris NaCl EDTA
TNEX:	1 % Triton X-100	in TNE

2.3 Phenolisierung von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Zum Entfernen unerwünschter Bestandteile in DNA-Präparationen wie verunreinigende Proteine wird dem Ansatz 1 Vol eines Gemischs aus äquilibriertem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt und gevortext. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation wird die obere, wäßrige Phase abgenommen, dabei muß darauf geachtet werden, daß die an der Phasengrenze akkumulierenden Verunreinigungen nicht mitgeschleppt werden. Die wäßrige Phase wird in derselben Form ein zweites Mal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und die DNA in der frisch abgenommenen wäßrigen Phase alkoholisch gefällt.

2.4 Alkoholische Fällung von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Zu einem bestimmten Volumen DNA-Lösung werden 1/10 Vol Na-Acetat pH 4,8 und 2 bis 2,5 Vol 100 % Ethanol zugegeben. Der Ansatz wird für mindestens 1 h bei - 80°C inkubiert und danach die DNA für 10 min in der Kühlzentrifuge (max. Geschwindigkeit) abzentrifugiert. Das Pellet wird mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, in der Vakuumentrifuge getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen bidest. Wasser (steril) aufgenommen.

2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Für die Quantifizierung von Nukleinsäuren werden geeignete Verdünnungen in bidest. Wasser photometrisch bei den Wellenlängen von $\lambda = 260$ nm und 280 nm in Quarzküvetten gegen bidest. Wasser gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA und RNA. Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt die Reinheit der Nukleinsäurepräparation an, der Wert soll optimalerweise zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Sambrook *et al.*, 1989)

Für die DNA-Analyse sowie zur Isolation von geeigneten DNA-Fragmenten für Klonierungen werden DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. 1 bis 10 µg DNA werden mit 1 U/µg des gewünschten Restriktionsenzym versetzt und je nach Enzym in 1 bis 2 x One-Phor-All-Puffer (Pharmacia Biotech) für 1 h gespalten. Der Verdau wird abgestoppt durch Hitzeinaktivierung des Enzyms oder durch die Zugabe von 1/5 Vol. 6 x Agarosegel-Ladepuffer.

6 x Agarosegel-Ladepuffer: s. 1.9

2.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. DNA-Moleküle unterschiedlicher Größen wandern unterschiedlich schnell durch das Gel, zur Größenbestimmung der Fragmente werden DNA-Marker mit auf die Gele aufgetragen. Unterschiedliche Agarosekonzentrationen erlauben eine effiziente Auftrennung der DNA-Fragmente verschiedener Größenbereiche:

<u>% Agarose</u>	<u>Länge linearer DNA (kb)</u>
0,3	60 - 5
0,6	20 - 1
0,7	10 - 0,8
0,9	7 - 0,5
1,2	6 - 0,4
1,5	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

Die entsprechende Menge Agarose wird zu 1 x TAE-, 0,5 x TBE- oder 1 x TPE-Puffer zugegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach dem Abkühlen auf 60°C wird sie in eine entsprechende Gelgießkammer gegossen, in die ein Kamm mit Zähnen geeigneter Größe eingesetzt wird. Nach dem Festwerden wird das Gel in eine Gelkammer überführt, mit dem entsprechenden Puffer knapp bedeckt und die mit Agarosegel-Ladepuffer versehenen Proben sowie der Marker aufgetragen. Das Gel läuft je nach Puffer und Größe der Kammer bei 80 bis 150 V (ca. 5 V/cm Elektrodenabstand). Nach dem Lauf wird das Gel in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht begutachtet.

50 x TAE: s. 1.9

5 x TBE: s. 1.9

10 x TPE:	s. 1.9
6 x Agarosegel-Ladepuffer:	s. 1.9

2.8 Elution von DNA aus Agarosegelen (GeneClean-Kit, Bio 101/Dianova)

Für die Elution von DNA aus einem Agarosegel mithilfe des GeneClean-Kits muß die Auftrennung der DNA in einem TAE-Gel erfolgen. Das Gel wird kurz gefärbt und auf dem UV-Transilluminator bei der niedrigsten UV-Einstellung begutachtet. Die gewünschte DNA-Bande wird ausgeschnitten, in einem Eppendorfgefäß mit 2,5 Vol 6 M NaI versetzt und bei 50°C geschmolzen. Zu diesem Ansatz werden 5 µl GLASSMILK zugegeben, 5 min auf Eis inkubiert, die GLASSMILK abzentrifugiert und das Pellet 3 x in 200 µl NEW WASH gewaschen. Die DNA wird durch Zugabe von einem geeigneten Volumen bidest. Wasser (steril) zum Pellet und 2 min Inkubation bei 50°C gelöst, die GLASSMILK abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand für Ligationen oder Hybridisierungen weiter verwendet.

2.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al.*, 1989)

Vor dem Einsatz in einer Ligation müssen die freien Enden des geschnittenen Vektors dephosphoryliert werden, um einen übermäßigen Verlust des Vektors durch Religation zu vermeiden. 5 µg der geschnittenen Vektor-DNA werden in 90 µl 10 mM Tris pH 8 aufgenommen und mit 10 µl One-Phor-All-Puffer (Pharmacia Biotech) oder CIP-Puffer (Boehringer Mannheim) versetzt. Für die Dephosphorylierung von sticky ends werden 2 U CIP (calf intestinal phosphatase, Boehringer Mannheim), für die Phosphatase-Behandlung von blunt ends 4 U CIP zugegeben und für 30 min bis 1 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird phenolisiert, die DNA gefällt und in einem geeigneten Volumen bidest. Wasser (steril) aufgenommen.

2.10 DNA-Ligation (Sambrook *et al.*, 1989)

250 bis 500 ng des gespaltenen, dephosphorylierten Vektors werden mit einem 2- bis 5-fachen Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragments versetzt. Nach Zusatz von 1 U Ligase (Gibco BRL) und der entsprechenden Menge 5 x Ligase-Puffer (Gibco BRL) wird der Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert. Danach kann er in einen geeigneten *E. coli* K-12-Stamm transformiert werden. Für Standardklonierungen wird der *E. coli* K-12-Stamm DH5α, für Klonierungen mit λ-*pir*-abhängigen Vektoren die *E. coli* K-12-Stämme SY3271*pir* oder SM101*pir* verwendet.

2.11 PCR (Saiki *et al.*, 1988)

Die PCR (polymerase chain reaction) dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten mithilfe einer Template-DNA und zweier spezifischer Oligonukleotide, die einer Folge von cyclisch ablaufenden Denaturierungs-, Annealing- und Syntheseschritten unterworfen werden. Denaturierung und Synthese erfolgen bei 95°C bzw. 72°C. Je nach Größe des gewünschten DNA-Fragments und nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide werden unterschiedliche Kettenelongationszeiten und Annealingtemperaturen verwendet.

Grundprogrammierung Thermocycler:

1.	95°C	2 min
2.	95°C	45 sec
3.	Annealingtemperatur	45 sec
4.	72°C	1 min/kb
5.	72°C	10 min
6.	4°C	hold

Die Schritte 2 bis 4 werden 30 x wiederholt.

Man rechnet mit einer Synthesezeit von ca. 1 min pro kb zu amplifizierende DNA. Die Schmelztemperatur T_m und die Annealingtemperatur T_a eines Oligonukleotids berechnen sich nach den folgenden Formeln:

$$T_m = 69,4 + 0,41 \times \text{GC\%} - 650/\text{Länge}$$

$$T_a = T_m - 3^\circ\text{C}$$

Die niedrigere der für beide Oligonukleotide berechneten Temperaturen T_a kommt als Annealingtemperatur in der PCR zum Einsatz. Je nach Amplifikationseffizienz werden die Zeiten und Temperaturen auf ein spezifisches System eingestellt.

Als DNA-Template dienen hitzelysierte Bakterien. Die gewaschenen Zellen aus 1 ml Übernachtkultur oder 1 Impfloße voll Bakterien von der Agarplatte werden in 500 μl bidest. Wasser suspendiert, 10 min bei 95°C gekocht und direkt in der PCR eingesetzt. Alternativ können 10 ng isolierte DNA verwendet werden.

2.11.1 PCR mit dem Gibco BRL Supermix:

Im Supermix sind die Grundbestandteile des PCR-Ansatzes schon vorgemischt, für einen 50 μl Ansatz müssen nur noch die Primer und das Template wie folgt zugegeben werden:

<u>Komponenten für PCR-Ansatz:</u>	<u>Volumen:</u>
Supermix (Gibco BRL)	45 μl
DNA-Template	1 μl
Primer 1 (500 ng/ μl)	1 μl
Primer 2 (500 ng/ μl)	1 μl
H ₂ O _{bidest.}	2 μl

2.11.2 PCR mit der DAp GOLDSTAR-Polymerase:

Die Besonderheit der DAp-Polymerase ist ihre 3'-5' Korrekturleseaktivität, die das Auftreten von Lesefehlern bei der DNA-Amplifikation minimiert, was insbesondere für die Klonierung großer DNA-Fragmente erwünscht ist. Für einen 50 μl Ansatz werden die Komponenten wie angegeben gemischt und die PCR über einen Hotstart gestartet.

<u>Komponenten für PCR-Ansatz:</u>	<u>Volumen:</u>
10 x DAp-Polymerase Reaktionspuffer	5 μl
25 mM MgCl ₂	3,5 μl pro kb*
dNTP-Mix	5 μl
DNA-Template	0,5 μl
Primer 1 (500 ng/ μl)	1 μl
Primer 2 (500 ng/ μl)	1 μl
DAp-Polymerase	0,5 μl
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 μl

* 3,5 μl pro kb des zu amplifizierenden DNA-Fragments

MgCl₂ und 10 x DAp-Polymerase Reaktionspuffer: Eurogentec

dNTP-Mix: je 2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP

2.12 Klonierung von PCR-Produkten (Sure-clone-Kit, Pharmacia Biotech)

Viele thermostabile DNA-Polymerasen hängen am 3'-Ende neusynthetisierter PCR-Fragmente template-unabhängig ein einzelnes dATP an, was die Klonierung dieser Fragmente stören kann. Um diesen Effekt zu vermeiden werden anhand der 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragments von DNA-Polymerase I diese einzelsträngigen Überhänge von den PCR-Fragmenten abgeschnitten und die nunmehr geblunteten 5'-Enden zur Erhöhung der Klonierungseffizienz phosphoryliert. Je nach Produktausbeute in der PCR-Reaktion werden 1 bis 16 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl Blunting/Kinasing-Puffer sowie mit je 1 µl Klenow-Fragment und Polynucleotid-Kinase versetzt und die Mixtur mit bidest. Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wird der Ansatz phenolisiert und die wäßrige Phase über eine Sephacryl S-200 Säule gereinigt. Hierfür werden 500 µl Säulenmaterial in ein Säulengefäß gefüllt und die Flüssigkeit 30 sec abzentrifugiert. Die Säule wird in ein frisches Eppendorfgefäß gesetzt, die wäßrige Phase aus obiger Phenolisierung auf die Säule pipettiert und für 30 sec abzentrifugiert. Verunreinigungen verbleiben in der Säule, während sich die gereinigten PCR-Fragmente im Säuleneluat befinden. Das Eluat kann direkt in einer Ligationsreaktion wie unter Absatz 2.10 beschrieben eingesetzt werden.

2.13 Automatisierte Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977)

Das Prinzip der automatischen DNA-Sequenzierung beruht auf dem Einbau eines farbstoffmarkierten Primers in das Produkt einer Einzelstrang-PCR. Dessen Synthese wird je nach dem gewünschten zu lesenden Nukleotid durch den Einbau der entsprechenden Didesoxyribonukleotide abgestoppt. Die resultierenden farbstoffmarkierten DNA-Fragmente werden mit Hilfe eines automatischen Sequenziersystems (LICOR DNA Sequenzer 4000) aufgetrennt und die gelesene Sequenz anhand der Programme BLAST (Altschul *et al.*, 1997) und GCG (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) analysiert.

Für die Synthese der farbstoffmarkierten PCR-Fragmente wird der Amersham Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit verwendet. Die zu sequenzierende Template-DNA (100 ng pro kb Plasmid-DNA) wird mit 1 pmol des 5' mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Primers versetzt, das Volumen mit bidest. Wasser auf 13 µl aufgefüllt und gut gemischt. Je 3 µl des Gemischs werden in mit A, C, G und T markierte Mini-Eppendorfgefäße überführt, entsprechend je 1 µl A-, C-, G- oder T-Reagenz zugegeben, mit Mineralöl überschichtet und einem PCR-Lauf unterzogen, dessen Grundprogramm folgendermaßen aussieht:

1.	95°C	2 min
2.	95°C	45 sec
3.	Annealingtemperatur	45 sec
4.	70°C	45 sec

Die Schritte 2 bis 4 werden 30 x wiederholt.

Die Annealingtemperatur T_a berechnet sich in diesem Fall aus der Formel

$$T_a = T_m + 3^\circ\text{C}$$

Die Schmelztemperatur T_m wird wie im Abschnitt "PCR" beschrieben berechnet. Nach der PCR werden jedem Ansatz 3 µl Bluemarker (Biozym Diagnostik) zugesetzt und je 1,5 µl von jedem Ansatz auf ein 6 % Polyacrylamid-Gel geladen, das über Nacht im Sequenziergerät läuft. Die Signale der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden mit Hilfe eines Lasers detektiert und die Sequenz anhand der im LICOR zur Verfügung gestellten Software gelesen.

A-, C-, T-, G-Reagenz: Tris-HCl pH 9,5; MgCl₂, Tween 20; Nonidet P-40; 2-Mercapto-ethanol; dATP; dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP; thermostabile Pyrophosphatase; Thermostable DNA-Polymerase und das entsprechende Dideoxynucleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP)

2.14 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

2.14.1 Kompetente Zellen durch CaCl₂-Behandlung und Hitzeschock-Transformation (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Behandlung mit CaCl₂ ist geeignet, *E. coli* K-12 Stämme für eine Hitzeschocktransformation kompetent zu machen. Die Übernachtskultur eines entsprechenden Stammes wird 1:100 in 50 ml LB-Medium verdünnt und unter Schütteln bei 37°C bis zur OD₆₀₀ = 0,7 hochgezüchtet. Die Kultur wird für 10 min auf Eis gestellt und die Bakterien in sterilen Röhren bei 3.000 rpm für 5 min geerntet. Das Sediment wird in 12,5 ml sterilem, eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, die Zellen unter denselben Bedingungen erneut abzentrifugiert, wieder aufgenommen in 1,25 ml 0,1 M CaCl₂ und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach werden 240 µl steriles, kaltes 86 % Glycerin zugegeben, gemischt und die Zellen in Aliquots von 100 µl bei - 80°C eingefroren.

Für die Hitzeschock-Transformation werden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird der Ansatz einem Hitzeschock von 90 sec bei 43°C ausgesetzt, kurz auf Eis gestellt und in 1 ml LB-Medium für 2 h bei 37°C geschüttelt. Schließlich werden die Zellen auf Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, bilden Kolonien.

2.14.2 Kompetente Zellen für die Elektroporation und Elektrottransformation

Die Transformation durch Elektroporation findet vor allem bei *E. coli* Wildstämmen Verwendung, weil sie wesentlich effizienter ist als die Hitzeschock-Methode. Eine Übernachtskultur des gewünschten DNA-Rezipientenstammes wird 1:100 in 150 ml LB-Medium verdünnt, bei 37°C unter Schütteln bis zur OD₆₀₀ = 0,3 hochgezüchtet und für 20 min auf Eis gestellt. Nach dem Ernten der Zellen werden diese in eiskaltem sterilem bidest. Wasser gewaschen, zuerst in 50 ml, dann in 25 ml. Die Zentrifugationsschritte erfolgen jeweils bei 4.000 rpm und 4°C für 10 min. Als nächstes werden die Bakterien in 3 ml eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen und in 300 µl desselben aufgenommen. Schließlich werden sie zu je 40 µl aliquotiert und bei - 80°C eingefroren.

Für die Elektroporation werden die eingefrorenen Bakterien auf Eis aufgetaut und 1 µl der zu transformierenden DNA zugefügt, Ligationsansätze sollten hierfür verdünnt werden. Der Ansatz wird zwischen die Elektroden einer vorgekühlten 2 mm Elektroporationsküvette gesetzt und im Elektroporationsgerät einem Spannungsimpuls ausgesetzt, wobei die Einstellungen am Gerät 200 Ω, 25,0 µFD und 2,5 V betragen. Unmittelbar nach dem Impuls werden die Zellen in SOC-Medium überführt und 2 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden sie auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag auf Koloniewachstum überprüft.

2.15 Plasmidtransfer durch Konjugation von *E. coli* Donor- und Rezipientenstämmen (Sambrook *et al.*, 1989)

Plasmide mit integrierter *mob*-Region lassen sich durch Konjugation von einem Donor- auf einen Rezipientenstamm übertragen. Übernachtskulturen von Donor und Empfänger werden 1:100 in LB-Medium mit bzw. ohne Antibiotikum verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 hochgezüchtet. Für die Konjugation werden die Stämme im Verhältnis 1:2 bis 1:10 (Rezipient : Donor) zusammenpipettiert, die Mischung auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien mit LB-Medium von den Platten abgeschwemmt

und Verdünnungsreihen der Suspension auf Selektivagarplatten, auf denen der Plasmidtransfer nach einer weiteren Inkubationszeit angezeigt wird, ausplattiert. Der Selektivagar soll so beschaffen sein, daß eine Unterscheidung der Transkonjuganden vom Donor- und vom Rezipientenstamm möglich ist.

2.16 Konstruktion von isogenen EHEC-Mutanten unter Benutzung von Suizidvektoren durch Genaustausch mittels Doppelcrossover

Plasmide, die auf den λ -*pir*-abhängigen Suizidvektoren pCVD442 oder pGP704 basieren, sind in λ -*pir* exprimierenden Stämmen wie den *E. coli* K-12-Stämmen SY3271*pir* oder SM101*pir* zu halten. Die Übertragung eines dieser Plasmide in einen λ -*pir*-negativen Stamm hat zur Folge, daß es in diesem Stamm nicht replizieren kann. Enthält es jedoch Sequenzen, deren Homologe in diesem Stamm ebenfalls vorhanden sind, so kann es in den entsprechenden Bereich des Genoms integrieren und bei geeigneter Selektion in dieser Form nachgewiesen werden. Auf der Grundlage dieses Prinzips kann ein gezielter Allelaustausch durchgeführt werden.

2.16.1 Integration eines Plasmids basierend auf einem Suizidvektor ins Chromosom (Einzelcrossover)

Für die kontrollierte Deletion von Genen in *E. coli*-Wildstämmen werden zunächst einem der λ -*pir*-abhängigen Suizidvektoren pCVD442 oder pGP704 sog. „up“- und „downstream“-Bereiche des auszuschaltenden Gens, die jeweils einen Bereich von 500 bis 1.000 Basenpaare umfassen sollen, eingesetzt. Diese DNA-Fragmente werden über PCR amplifiziert. Dabei werden über die PCR-Primer spezifische Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingebaut, über die die Klonierung in den Vektor erfolgt. Das 3'-Ende des „upstream“-Bereichs wird über eine Schnittstelle mit dem 5'-Ende des „downstream“-Bereichs verbunden. In den Vektor pGP704 kann zusätzlich eine *sacB*-Kassette eingesetzt werden. Das resultierende Plasmid wird in den *E. coli* K-12 Stamm SY3271*pir* eingeführt und danach für die Konjugation in SM101*pir* transferiert. Aus diesem wird es durch Konjugation in den zu mutierenden λ -*pir*-negativen EHEC-Stamm O157:H7 86-24 übertragen. Eine Selektion auf die plasmidvermittelte Ampicillinresistenz läßt nur Wildstämmen hochwachsen, die das Plasmid über ein Einzelcrossover an der entsprechenden Stelle ins Genom integriert haben. Um die nun resistenten Wildstammderivate von den plasmidhaltigen *E. coli* K-12-Stämmen zu unterscheiden wird die Antibiotikaselektion auf MacConkey-Agar, dem 1 % Lactose zugesetzt ist, durchgeführt. Lactoseverwertende Wildstämmen bilden hier im Gegensatz zu *lac*⁻ SM101*pir*-Derivaten große, rote Kolonien. Diese Kolonien werden gepickt und weitere viermal abwechselnd auf Lactose-MacConkey-Agarplatten und auf M9-Agarplatten, auf denen *E. coli* K-12-Stämme nicht wachsen können, vereinzelt, um eine Kontamination der Kointegrentenstämmen mit den SM101*pir*-Derivaten auszuschließen. Anschließend werden sie genotypisch überprüft.

2.16.2 Induktion eines 2. Crossovers

Nach der Integration eines Plasmids durch homologe Rekombination in das Chromosom soll die integrierte Sequenz durch die Induktion eines zweiten Crossovers wieder deletiert werden, wobei zusätzlich zu den Vektorsequenzen die angrenzenden wildtypischen Genregionen mit verlorengehen sollen. Eine Kolonie des Kointegrentenstammes wird in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika für 5 h bei 37°C geschüttelt und bei beginnender Trübung der Kultur 2 µl davon in 200 ml LB-Medium ohne Antibiotika überimpft. Während des Wachstums der Kultur über Nacht bei 37°C unter Schütteln geht mangels Selektionsdruck das integrierte Plasmid verloren. Von dieser Kultur wird eine Verdünnungsreihe auf geeignete Selektivplatten ausplattiert. Für den Nachweis der Deletion eines Plasmids mit dem *sacB*-Gen, das für Saccharose-Sensitivität kodiert, ist Saccharose-Agar zu verwenden, auf dem die plasmidhaltigen Stämme nur sehr schlecht wachsen. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 30°C. Außerdem ist auf den Verlust der entsprechenden Plasmidantibiotikaresistenz zu testen.

2.17 Radioaktive Kolonie-Hybridisierung

Die Kolonie-Hybridisierung dient dem schnellen Nachweis bestimmter Gensequenzen in gleichzeitig sehr vielen Stämmen ohne Berücksichtigung der Lage der Gene.

2.17.1 Transfer von Kolonien auf Nylonmembran (Sambrook *et al.*, 1989)

Zurechtgeschnittene Nylonfilter werden auf LB-Agarplatten gelegt, auf vormarkierte Stellen in der vorgegebenen Reihenfolge Einzelkolonien aufgepickt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Alternativ können auf Platten mit schon vorhandenen Einzelkolonien runde Nylonfilter für 10 min aufgelegt werden, wobei eine ausreichende Menge Bakterien auf die Filter transferiert wird. Die Filter und der Agar sind zur späteren Identifizierung der Einzelkolonien durch Einstiche zu markieren. Je ein Stück Whatmanpapier wird mit 10 % SDS, mit Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung und mit 2 x SSC befeuchtet. Die Nylonfilter werden nacheinander mit den Kolonien nach oben in der für die Puffer angegebenen Reihenfolge auf die getränkten Papiere gelegt und für 3 min (SDS) und dann 3 x 5 min (restliche Puffer) inkubiert. Nach dem Trocknen werden sie für 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken um die DNA an den Filtern zu fixieren und zwischen zwei Whatmanpapieren aufbewahrt.

Denaturierungslösung: s. 1.9
Neutralisierungslösung: s. 1.9
20 x SSC: s. 1.9

2.17.2 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde mit dem Random Primers DNA Labelling System (Gibco BRL)

Die Verwendung von Zufallsprimern (Hexameren) erlaubt die radioaktive Markierung einer Sonde mittels Bindung der Primer an das DNA-Fragment und Kettenverlängerung durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Die gereinigte Sonden-DNA (25 ng) wird in 24 µl bidest. Wasser aufgenommen, für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Zu diesem Ansatz werden je 2 µl dCTP, dGTP und dTTP sowie 15 µl der Random Primers Buffer Mixture hinzupipettiert. Nach Zugabe von 5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl) und 1 µl Klenow Fragment (3 U/µl) wird der Ansatz gemischt, kurz abzentrifugiert und für 2 h bei 25°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Zufügen von 5 µl Stoppuffer abgestoppt und die Sonde unmittelbar vor der Hybridisierung noch einmal für 5 min aufgeköcht.

2.17.3 Kolonie-Hybridisierung (Sambrook *et al.*, 1989)

Unmittelbar vor der Hybridisierung werden die gebackenen Filter für 5 min in 2 x SSC befeuchtet und 30 min lang in Präwaschlösung bei 50°C geschüttelt. Zur Reduzierung von Hintergrund-Hybridisierungen werden die eingeweichten Kolonien vorsichtig mit einem weichen Papiertuch von den Filtern entfernt. Danach werden die Filter in ein Hybridisierungsröhrchen mit Prähybridisierungslösung überführt und für 2 h bei 68°C im Hybridisierungsofen unter Rotation vorinkubiert. Die doppelsträngige DNA-Sonde wird unmittelbar vor Bedarf für 5 min bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und in die Prähybridisierungslösung pipettiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 68°C. Am nächsten Tag werden die Filter wie folgt gewaschen: 3 x 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung I, 2 x 90 min bei 68°C in Waschlösung II und 1 x 30 min bei 68°C in Waschlösung III. Die Filter werden in Plastikfolie eingeschweißt und je nach Signalstärke über Nacht oder bis zu mehreren Tagen ein Röntgenfilm aufgelegt.

20 x SSC: s. 1.9

Präwaschlösung:	5 x	SSC
	0,5 %	SDS
	1 mM	EDTA pH 8
Prähybridisierungslösung:	6 x	SSC
	0,05 x	BLOTTO
1 x BLOTTO:	5 %	Magermilchpulver
	0,02 %	NaN ₃
Waschlösung I:	2 x	SSC
	0,1 %	SDS
Waschlösung II:	1 x	SSC
	0,1 %	SDS
Waschlösung III:	0,2 x	SSC
	0,1 %	SDS

2.18 Nichtradioaktive Southern Hybridisierung

In der Southern Hybridisierung wird das Vorhandensein bestimmter DNA-Sequenzen anhand einer markierten DNA-Sonde nachgewiesen und die Größe der betroffenen DNA-Fragmente bestimmt. Mithilfe des "enhanced chemoluminescence" (ECL)-Kits werden DNA-Fragmente nichtradioaktiv durch die Bindung des Enzyms Peroxidase an die DNA markiert. Nach der Hybridisierung wird das Enzym durch die Lichtemission bei der Umsetzung eines Substrats (Oxidation von Luminol als Folge von peroxidasekatalysierter H₂O₂-Reduktion) auf einem Blaulicht-empfindlichen Film detektiert.

2.18.1 Southern Blot mit dem VakuGene Blotter (Pharmacia LKB)

Die zu testende DNA wird mit einem Restriktionsenzym geschnitten, auf einem TPE-Agarosegel aufgetrennt, das Gel gefärbt und zusammen mit einem Lineal als Vergleichslängenstandard fotografiert. Eine Nylonmembran wird auf die entsprechende Größe zugeschnitten, für 5 min in bidest. Wasser und danach für 5 min in 20 x SSC eingeweicht. Die poröse Trägerplatte des VakuGene Blotters wird mit dest. Wasser angefeuchtet, die Nylonmembran auf sie aufgelegt und mit einer Plastikmaske so abgedeckt, daß Maske und Membran für mindestens 2 mm überlappen. Schließlich läßt man das Gel auf die Membran gleiten, so daß keine Luftblasen und keine Lücken zwischen Gel und Membran bzw. Maske verbleiben. Der Rahmen der Apparatur wird geschlossen, das Gel trockengetupft und mit 0,5 N HCl als Hydrolyseungslösung bedeckt. Anschließend wird an den VakuGene Blotter Vakuum angelegt und auf 50 cm H₂O stabilisiert. Nach 8 min wird die Salzsäure entfernt, das Gel trockengetupft und Denaturierungslösung aufpipettiert. 8 min später wird die Denaturierungslösung durch Neutralisierungslösung ersetzt, und nach weiteren 8 min wird das trockengetupfte Gel mit der eigentlichen Blotlösung 20 x SSC bedeckt. Der Transfer dauert 40 min, danach werden die Geltaschen auf der Nylonmembran markiert, Gel und Maske abgenommen und die Membran zur nochmaligen Denaturierung der DNA und zum Entfernen von Gelresten in 0,4 N NaOH für 1 min geschwenkt. Die Neutralisation erfolgt für 1 min in 0,25 M Tris-HCl pH 7,5. Danach wird die DNA auf der Membran im UV-Crosslinker fixiert und die Membran zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und aufbewahrt.

20 x SSC	s. 1.9
Denaturierungslösung:	s. 1.9
Neutralisierungslösung:	s. 1.9

2.18.2 Nichtradioaktive Markierung einer DNA-Sonde und Hybridisierung (ECL-Kit, Amersham)

Die fixierte Nylonmembran wird in ein Hybridisierungsröhrchen überführt, mit 10 bis 15 ml auf 42°C vorgewärmten Hybridmix bedeckt und für 1 h unter Rotation im Hybridisierungssofen vorhybridisiert. In der Zwischenzeit wird die DNA-Sonde markiert. 10 µl gereinigte DNA (0,1 bis 1 µg) werden für 10 min bei 95°C denaturiert und danach rasch auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Abzentrifugieren werden 10 µl Labelling-Mix, der das Enzym Peroxidase enthält, zugegeben und diese anhand von 10 µl Glutaraldehydlösung nach kurzem Mischen und Zentrifugieren für 10 min bei 37°C fixiert. Nach Ende der Vorhybridisierungszeit wird die markierte Sonde zur Vorhybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 42°C unter Rotation hybridisiert. Am nächsten Tag wird der Filter für 2 x 10 min bei 50°C in Waschlösung im Wasserbad geschüttelt und danach für weitere 2 x 5 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC gewaschen. Unmittelbar vor der Inkubation mit dem Substrat wird die Detektionslösung vorbereitet, indem ECL-Reagenz 1 und ECL-Reagenz 2 zu gleichen Teilen gemischt werden. Es wird ein Volumen von ca. 0,125 ml/cm² Membran benötigt. Die Nylonmembran wird in der Dunkelkammer für 1 min in der Detektionslösung geschwenkt, luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschlagen und sofort in einer Exponierkassette auf einen Hyperfilm ECL aufgelegt. Nach 3 min wird der Film entwickelt und je nach Signalstärke ein weiterer Film für eine bestimmte Zeit aufgelegt. Die Positionen der Banden relativ zu den Geltaschen werden abgemessen. Im Vergleich zum Gelfoto mit dem fotografierten Lineal und dem DNA-Marker kann so indirekt die Größe der hybridisierenden Banden bestimmt werden.

Waschlösung: 0,5 x SSC
 0,4 % SDS

20 x SSC: s. 1.9

2.19 Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli* (von Gabain *et. al.* 1983)

Bei allen Methoden der Präparation oder Analyse von RNA muß darauf geachtet werden, daß diese möglichst wenig in Berührung mit RNasen kommt. Dies wird zum einen durch die Benutzung von DEPC-behandelten Puffern und zum anderen durch entsprechend vorsichtigen Umgang mit den Proben gewährleistet. Zur Inaktivierung von RNasen wird dest. Wasser für Puffer 0,1 % DEPC zugesetzt, gut geschüttelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Darauffolgendes Autoklavieren des Wassers zerstört die giftige Chemikalie wieder, es kann jetzt zum Ansetzen der benötigten Lösungen verwendet werden.

25 ml LB-Medium werden 1:100 mit einer Übernachtskultur des gewünschten Stamms beimpft und bis zu einer OD von 50 Klett hochgezogen. Die Zellen werden in halb mit Eis gefüllte Röhrchen überführt, 5 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wird in 200 µl eiskaltem SucAc-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorfcap überführt. Nach Zugabe von 200 µl AcSDS und vorsichtigem Mischen werden die Zellen für 1,5 min bei 65°C lysiert. 250 µl saures Phenol (Roth) werden zupipettiert, 30 sec gevortext, für 3 min bei 65°C inkubiert, 5 sec lang in flüssigem Stickstoff gekühlt und 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wird in ein neues Eppendorfcap überführt und die Schritte ab der Zugabe des sauren Phenols sechs- bis achtmal wiederholt. Danach wird die wäßrige Phase mit neutralem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) sooft extrahiert bis keine Interphase mehr zu sehen ist. Die Nukleinsäuren werden mit 1/10 Vol 3 M Na-Acetat pH 4,5 und 2,5 Vol absolutem Ethanol bei - 80°C für mindestens 20 min gefällt. Danach werden sie für 15 min bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 80 % Ethanol gewaschen, 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 180 µl dest. Wasser gelöst. Nach Zugabe von 20 µl DNase I-Puffer und 5 Units RNase-freier DNase I (Amersham Pharmacia biotech) wird der Ansatz für höchstens 15 min bei 37°C inkubiert, erneut mit neutralem Phenol extrahiert, wie beschrieben gefällt, gewaschen und getrocknet und schließlich in 200 µl dest. Wasser aufgenommen.

SucAc-Puffer:	300 mM	Saccharose
	10 mM	Na-Acetat pH 4,5
AcSDS:	10 mM	Na-Acetat pH 4,5
	2 %	SDS (w/v)
Dnase I-Puffer:	400 mM	Tris-HCl pH 7,5
	60 mM	MgCl ₂

2.20 Radioaktive Northern-Hybridisierung

Wie für die Isolierung von RNA beschrieben gilt auch hier die ausschließliche Verwendung DEPC-behandelter Lösungen.

2.20.1 RNA-Gelelektrophorese

tRNA wird in denaturierenden 1,5 % Formaldehydagarosegelen aufgetrennt. Zu diesem Zweck werden 5,25 g Agarose in 304,5 ml Wasser aufgekocht. Nach abkühlen lassen auf 60°C werden 35 ml 10 x MOPS sowie 10,5 ml 37 % Formaldehyd zupipettiert, gut geschwenkt, in eine entsprechende RNA-Gelkammer gegossen und ein passender Gelkamm eingesetzt. Wegen der auftretenden Formaldehyddämpfe sollten diese Schritte unter dem Abzug durchgeführt werden. Pro RNA-Probe werden 20 µg RNA aliquotiert und zusammen mit dem RNA-Marker (Gibco BRL) mit 5 x RNA-Ladepuffer versetzt, gemischt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Das Gel wird nach dem Abkühlen mit 1 x MOPS-Laufpuffer bedeckt, mit den RNA-Proben beladen und für ca. 4 h bei 110 V laufen gelassen (5 V/cm Elektrodenabstand). Danach wird das Gel für 15 min gewässert, um das Formaldehyd zu entfernen, in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht begutachtet und fotografiert. Die Banden der "stabilen" RNAs, d.h. der 23S, 16S und 5S rRNAs sowie der tRNAs, sollten deutlich auf dem Gel zu sehen sein.

10 x MOPS-Laufpuffer:	41,8 g/l	MOPS
	pH 7 einstellen	
	16,6 ml/l	3 M Na-Acetat pH 4,5
	20 ml/l	0,5 M EDTA pH 8
	Lösung filtrieren und lichtgeschützt aufbewahren.	
5 x RNA-Ladepuffer:	25 mg	Bromphenolblau
	80 µl	0,5 M EDTA pH 8
	720 µl	37 % Formaldehyd
	2326 µl	86 % Glycerin
	3084 µl	Formamid
	4 ml	10 x MOPS

2.20.2 RNA-Transfer durch Kapillarblot (Sambrook *et al.*, 1989)

Das zu blottende Gel wird unter UV-Licht begutachtet, zusammen mit einem Lineal fotografiert und der zu blottende Teil ausgeschnitten. Dieser wird mehrmals in dest. Wasser gewaschen und für 45 min in 10 x SSC geschüttelt. Ein Nylonfilter und 5 Stück Whatmanpapier werden auf Gelgröße zugeschnitten. Ein weiteres, langes Stück Whatmanpapier wird über eine Glasplatte gelegt, die als "Brücke" über einer mit 20 x SSC gefüllten Schale liegt, so daß beide Papierenden in den Puffer eintauchen und ihn hochsaugen. Auf dieses mit Puffer angefeuchtete Papier wird das Gel mit der Oberseite nach unten aufgelegt, auf welches wiederum die für 5 min in dest. Wasser und 5 min in 20 x SSC eingeweichte Nylonmembran (Pall Biodyne B, 0,45 µm) zu liegen kommt. Bei jeder Schicht ist darauf zu achten, daß keine Luftblasen in den Stapel eingeschlossen werden. Die Ränder des Gels und

das darunterliegende Whatmanpapier werden mit Frischhaltefolie abgedeckt, um einen Kontakt zwischen den über- und unterhalb des Gels zu liegenden Schichten zu vermeiden. Den Abschluß des Blots bilden die fünf mit 20 x SSC befeuchteten Whatmanpapiere und ein 5 bis 10 cm hoher Stapel zurechtgeschnittener trockener Papierhandtücher, die mit einer Glasplatte und ca. 500 g Gewicht beschwert werden. Über Nacht wird der Puffer aus der Schale durch die Kapillarkräfte hochgesaugt, dabei kommt es zu einem sehr effizienten Transfer der RNA auf die Nylonmembran. Beim Abbauen des Blots wird die Lage der Geltaschen auf der Membran markiert, der Blot im UV-Crosslinker fixiert, getrocknet und zwischen zwei Whatmanpapieren aufbewahrt.

20 x SSC: s. 1.9

2.20.3 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden und Hybridisierung

Der fixierte Filter wird in ein Hybridisierungsröhrchen mit Hybridmix überführt und für mindestens 4 h bei 30°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Währenddessen wird das Sondenoligonukleotid radioaktiv markiert. 1 µl Oligonukleotid (100ng/µl) wird mit 2,5 µl T4-Polynukleotidkinasepuffer (Eurogentec), 10 µl bidest. Wasser, 10 µl [γ -³²P]-dATP (ca. 200 µCi) und 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl, Eurogentec) in einem Ansatz gemischt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion für 5 min bei 65°C wird der Ansatz durch Zugabe von 25 µl 3 M Ammoniumacetat und 125 µl absolutem Ethanol für 30 min im Ethanol/Trockeneisbad gefällt. Das präzipitierte Oligonukleotid wird für 15 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand mit nichtinkorporierter Radioaktivität abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 100 µl bidest. Wasser aufgenommen. Die Hälfte des Ansatzes wird zur Vorhybridisierungslösung pipettiert und der Blot über Nacht bei 30°C hybridisiert. Er wird zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung gewaschen, in Folie eingeschweißt, ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser je nach Signalstärke einige Stunden bis zu zwei Wochen exponiert.

Hybridmix:	20 ml		Formamid, deionisiert
	25 ml	20 x	SSC
	1 ml	10 %	SDS
	200 µl	0,5 M	EDTA pH 8
	5 ml	100 x	Denhardt's
	5 ml	1 M	Tris-HCl pH 7,5
	43,8 ml		H ₂ O _{dest.}
	750 µl	1 %	Heringssperma-DNA

20 x SSC: s. 1.9

100 x Denhardt's:	2 %	Polyvinyl-Pyrrolidon
	2 %	Ficoll 400
	2 %	BSA

Waschlösung:	2 x	SSC
	0,1 %	SDS

2.21 Gewinnung von Gesamtzelllysaten durch Lyse mit Laemmli-Puffer aus *E. coli*

Für die Gewinnung von Gesamtzelllysaten werden jeweils 1,5 ml Übernachtskultur 5 min in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Sollen die Mengen eines bestimmten Proteins zwischen verschiedenen Stämmen verglichen werden, so sind die zu vergleichenden Übernachtskulturen zuvor auf die selbe OD₆₀₀ einzustellen. Die Pellets werden in 100 µl bidest. Wasser aufgenommen, mit je 25 µl 5 x Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 96°C gekocht. Daraufhin werden die Proben ein weiteres Mal für 5 min abzentrifugiert und die klaren Überstände abgenommen, die direkt im SDS-PAGE eingesetzt werden können.

5 x Laemmli-Puffer: s. 1.9

2.22 Gewinnung von Gesamtzelllysaten für Typ 1-Fimbrien-Westernblot durch saure Fimbriendissoziation (Abraham *et. al.*, 1987)

Typ 1-Fimbrien müssen vor der Durchführung eines Westernblots dissoziiert werden, weil FimA ansonsten nicht als Monomer vorliegt und demnach nicht identifiziert werden kann. Die Bakterien werden über Nacht bei 37°C unter Schütteln angezogen und die zu vergleichenden Kulturen auf dieselbe OD₆₀₀ eingestellt. 2,5 ml pro Kultur werden abzentrifugiert und die Sedimente in je 40 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Suspensionen werden mit 2 N HCl auf den pH-Wert 1 eingestellt und 10 min bei 100°C gekocht. Danach werden den Lysaten je 15 µl 5 x Laemmli-Puffer zugesetzt, mit 2 N NaOH neutralisiert und noch einmal für 10 min bei 100°C inkubiert. Nach 5 min Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile können die Proben auf ein Gel geladen werden.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8
 1 mM EDTA pH 8

5 x Laemmli-Puffer: s. 1.7

2.23 Hitzeextraktion von Fimbrien (Khan und Schifferli, 1994)

Für die Extraktion von Fimbrien werden die zu untersuchenden Stämme über Nacht in 150 ml LB-Medium bei 37°C geschüttelt und die geernteten Bakterien in 15 ml Fimbrienextraktionspuffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wird im 60°C Wasserbad für 30 min geschüttelt und die Zellen bei 8.000 rpm 10 min lang abzentrifugiert. Der fimbrienhaltige Überstand wird abgenommen und in ein Centriprap 50 Röhrchen (Millipore) überführt. Unter Zentrifugation werden die 15 ml Ausgangssuspension aufkonzentriert, wobei nach jedem Schritt der im oberen Kompartiment befindliche Filtrationsüberstand verworfen und die verbleibende Suspension erneut aufkonzentriert wird. Der erste und zweite Zentrifugationsschritt erfolgen bei 4°C für 1 h unter 1.500 x g, der dritte Schritt unter denselben Bedingungen für 30 min. Die im unteren Kompartiment des Röhrchens verbleibende Flüssigkeit enthält die Fimbrien, die vor der Durchführung einer SDS-PAGE oder eines Westernblots sauer oder mit Hilfe von Guanidium-Hydrochlorid dissoziiert werden müssen.

Fimbrienextraktionspuffer: 0,5 mM Tris-HCl
 75 mM NaCl
 pH 7,4

2.24 Fimbriendissoziation mit Hilfe von Guanidium-Hydrochlorid

Isolierte Pili werden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 8,3 bis 8,6 M Guanidium-Hydrochlorid-Lösung in 5 mM Tris-HCl pH 8 aufgenommen und für 2 h bei 37°C inkubiert, wobei die Fimbrienstrukturen in ihre Monomere zerfallen. Die Proben werden zweimal für 1.30 h gegen 5 mM Tris-HCl pH 8 dialysiert, je nach Volumen in einem Dialyseschlauch oder im Mikrolitermaßstab in einem mit Dialyseschlauch bespannten Eppendorfcap, in dessen Deckel zuvor ein Loch geschnitten worden war. Nach der Dialyse werden die Pili erneut getrocknet, in einem geeigneten Volumen Puffer aufgenommen und direkt oder nach saurer Fimbriendissoziation mit 5 x Laemmli-Puffer versetzt und auf ein Gel geladen.

5 x Laemmli-Puffer: s. 1.9

2.25 Isolation von Membranproteinen aus *E. coli* (Aono *et. al.*, 1998, modifiziert)

Für die Präparation von Membranproteinen werden die zu testenden Stämme 1:100 in 150 ml M9-Medium angeimpft und 24 h bis zur OD₆₀₀ von ca. 1,0 wachsen gelassen. Die Zellen werden geerntet und mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. In den folgenden Schritten werden entweder Phosphatpuffer oder TEM-Puffer verwendet, denen Proteinaseinhibitor (Boehringer Mannheim completeTM) zugesetzt worden ist. Zum Schutz der Proteine ist stets auf Eis zu arbeiten. Vor der Lyse der Zellen wird das Pellet noch einmal in 10 ml Puffer gewaschen und in weiteren 10 ml aufgenommen. Diese Suspension wird 3 bis 4 mal einer Behandlung durch die French-Press unterworfen, bis die Zellsuspension klar ist. Verbleibende Zelltrümmer werden für 15 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und die Zellhüllen bei 100.000 x g und 4°C für 1 h sedimentiert. Die membranhaltigen Fraktionen im Pellet werden im selben Puffer aufgenommen und nochmals unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das folgende Pellet wird in Sarkosyl-Puffer gelöst und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sarkosyllösung bewirkt, daß die Fraktion der inneren Membran selektiv micellisiert und sich die äußere Membran durch erneute Zentrifugation (100.000 x g bei 15°C für 1 h) sedimentieren läßt. Nach weiterem Lösen und Abzentrifugieren des Pellets unter denselben Bedingungen kann die nun gereinigte äußere Membranfraktion in proteinaseinhibitorhaltigem Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert werden.

Phosphatpuffer: 10 mM Na₂HPO₄ pH 7

TEM-Puffer: 1 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
1 mM MgCl₂

Sarkosyl-Puffer: 0,5 % N-Lauroylsarkosin in Phosphatpuffer oder TEM-Puffer

2.26 Quantifizierung von Proteinen

2.26.1 Bio-Rad Protein-Assay (Bradford, 1976)

Die Proteinquantifizierung mit dem Bio-Rad Protein-Assay beruht auf einer photometrisch bestimmbaren Farbveränderung von Coomassie Blau als Reaktion auf verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung des Farbstoffs an basische und aromatische Aminosäuren. Der Vergleich der gemessenen OD-Werte mit dem einer BSA-Standardlösung bekannter Konzentration ermöglicht die genaue Quantifizierung der zu messenden Proteine.

200 µl des Protein-Assay-Konzentrats werden mit 800 µl bidest. Wasser verdünnt und ein bestimmtes Volumen der zu messenden Proteinlösung zugesetzt. Die Probe wird gut gevortext und die OD₅₉₅ gegen einen Leerwert, der eine entsprechende Menge Wasser statt Protein enthält, gemessen. Als Standardwert wird eine Probe mit demselben zugesetzten Volumen BSA-Lösung (1,4 µg/µl) verwendet. Die in der Ausgangsprobe enthaltene Proteinmenge errechnet sich aus der Formel

$$\text{gesuchte Konz.} = \text{OD}_{595} \text{ Meßlösung} \times \text{Konz. Standard} / \text{OD}_{595} \text{ Standard}$$

2.26.2 Proteinquantifizierung nach Markwell (Markwell *et al.*, 1978)

Diese Methode der Proteinquantifizierung beruht auf der Bildung eines blauen Komplexes aus Protein und den verwendeten Reagenzien. 200 µl Proteinlösung werden mit 600 µl Lösung C vermischt und für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 60 µl von 1:2 in bidest. Wasser verdünntem Folin & Ciocalteu's Phenol-Reagenz (Sigma) werden zum Ansatz gegeben und intensiv gevortext. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 45 min bei Raumtemperatur wird die OD₆₆₀ des Ansatzes photometrisch gemessen. Parallel wird eine Standardkurve mit BSA-Lösungen von 20 bis 100 µg/ml Protein erstellt und anhand dieser Kurve die genauen Konzentrationen der Proteinproben bestimmt.

Lösung A:	2 %	NaCO ₃
	0,4 %	NaOH
	0,16 %	Na-Tartrat
	1 %	SDS
Lösung B:	4 %	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
Lösung C:	100 Teile	Lösung A
	1 Teil	Lösung B
		Frisch ansetzen!

2.27 Auftrennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unterschiedlicher Größe und Ladung denaturiert und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zwei passende Glasplatten werden gründlich mit Ethanol gereinigt und durch ein Paar Spacer getrennt aufeinander gelegt. Sie werden in die Gelhalterungen der Mini-Proteingelkammer eingespannt, welche wiederum in die entsprechende Gelgießapparatur eingesetzt werden. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine werden Trenngele von 7,5 bis 15 % Acrylamid zwischen die Glasplatten gegossen (ca. 3,3 ml), so daß noch genug Platz für einen Gelkamm und ein ca. 1 cm langes Sammelgel bleibt, und mit 2-Butanol überschichtet. Die Polymerisierung erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wird das Butanol entfernt, die Geloberfläche gut gewaschen und getrocknet, darauf jeweils ein 3,9 % Sammelgel gegossen, der Gelkamm eingesetzt und wiederum für 1 h bei Raumtemperatur polymerisiert. Die Gele werden dann in die Gelkammer überführt und Kathoden- sowie Anodenraum mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt. Nach dem Ausspülen der Taschen werden die in Laemmli-Puffer aufgekochten und danach abzentrifugierten Proteine und der Marker (Boehringer Mannheim, low range Marker) aufs Gel geladen. Die anzulegende Stromstärke beträgt 15 bis 20 mA pro Gel, die Gele laufen bis die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht. Danach können sie gefärbt werden.

Lösung B:	75 ml	2 M Tris-HCl pH 8,8
	4 ml	10 % SDS
	21 ml	H ₂ O _{dest.}
Lösung C:	50 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8
	4 ml	10 % SDS
	46 ml	H ₂ O _{dest.}

Gelstock 30 %: ROTH rotiphorese Gel30

Für jeweils zwei Trenngele (Minigele) mit unterschiedlichem Polyacrylamid-Gehalt werden benötigt:

	<u>7,5 %</u>	<u>10 %</u>	<u>12 %</u>	<u>15 %</u>
Lösung B	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Gelstock 30 %	2,5 ml	3,33 ml	4 ml	5 ml
H ₂ O _{dest.}	4,95 ml	4,12 ml	3,45 ml	2,45 ml
Ammoniumperoxodisulfat 10 %	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Für zwei entsprechende 3,9 % Sammelgele (Minigele) werden benötigt:

Lösung C		1,25 ml
Gelstock 30 %		0,65 ml
H ₂ O _{dest.}		3,07 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat		25 µl
TEMED		5 µl
10 x SDS-Laufpuffer:	250 mM	Tris (30,2 g/l Tris Base)
	2,5 M	Glycin (188 g/l)
	1 %	SDS (10 g/l)

2.28 Auftrennung von Proteinen in der Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schägger und von Jagow, 1987)

Die Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht im Vergleich zur herkömmlichen SDS-PAGE eine besonders scharfe Auftrennung von Proteinen im Bereich von 1 bis 100 kD, was besonders für die Durchführung von Westernblots erwünscht ist.

Das Gießen und der Lauf der Gele erfolgen wie für die herkömmliche SDS-PAGE beschrieben in einer Mini-Proteingelkammer. Für den Westernblot werden 10 % Trenngele mit 4 % Sammelgelen verwendet, auf die als Marker Amersham Rainbow RPN 756 aufgetragen wird. Der Lauf der Gele erfolgt mit speziellem Tricin-haltigem Kathodenpuffer (obere Kammer) und Anodenpuffer (untere Kammer). Bei dieser Methode muß eine Verlängerung der Laufzeiten von sowohl dem Proteingel als auch dem Blot im Vergleich zur normalen SDS-PAGE beachtet werden.

Gelpuffer: 3 M Tris-HCl (363,42 g/l)
 0,3 % SDS (3 g/l)
 pH 8,45

Gelstock 30 %: ROTH rotiphorese Gel30

Für je zwei 10 % Tricin-Trenngele (Minigele) werden benötigt:

Gelpuffer	4 ml
Gelstock 30 %	4 ml
86 % Glycerin	1,6 ml
H ₂ O _{dest.}	2,4 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat	80 µl
TEMED	6 µl

Für je zwei 4 % Sammelgele (Minigele) werden benötigt:

Gelpuffer	827 µl
Gelstock 30 %	667 µl
H ₂ O _{dest.}	3,5 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat	40 µl
TEMED	4 µl

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris (12,1 g/l)
 0,1 M Tricin (17,9 g/l)
 0,1 % SDS (1 g/l)

Anodenpuffer: 0,2 M Tris-HCl (24,2 g/l)
 pH 8,9

2.29 Westernblot (Promega ProtoBlot Immunoscreening System)

Im Westernblot werden Proteine, die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Membran geblottet und durch Antikörper nachgewiesen. Ein spezifischer primärer Antikörper, der monoklonal oder polyklonal sein kann, bindet an das nachzuweisende geblottete Protein. Dieser wiederum wird detektiert mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der spezifisch das Fc-Fragment des ersten Antikörpers erkennt und an den das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt ein bestimmtes Farbsubstrat um, dabei bildet sich an der Stelle des zu detektierenden Proteins ein blauer Farbniederschlag.

Nach Beendigung der Tricin-SDS-PAGE werden die Gele abgebaut und die Proteine in einer Graphitkammer auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Anodenseite der Graphitkammer wird befeuchtet und darauf sechs Lagen mit Anodenpuffer I getränktes Whatmanpapier luftblasenfrei paßgenau aufeinandergelegt. Es folgen drei Lagen mit Anodenpuffer II befeuchtetes Whatmanpapier und die ebenfalls in Anodenpuffer II eingeweichte Nitrocellulosemembran. Auf die Membran wird luftblasenfrei das Proteingel transferiert und mit drei weiteren Lagen mit Kathodenpuffer befeuchtetem Whatmanpapier bedeckt. Auf diesen Stapel wird die Kathode aufgesetzt. Der Transfer erfolgt für 2 h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel, der Amersham Rainbow RPN 756 Proteinmarker soll dabei vollständig auf die Nitrocellulose geblottet werden.

Nach dem Transfer wird der Blot abgebaut und die Nitrocellulosemembran für mind. 1 h in eine 10 % Magermilchpulver-Lösung in TBS/Tween gelegt, dabei werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Alle weiteren Schritte erfolgen unter schütteln. Zunächst wird die Membran 3 x 5 min in TBS/Tween gewaschen und dann mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers in TBS/Tween/1,5 % Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wird der Blot wiederum 3 x 5 min in TBS/Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgt ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Als sekundärer Antikörper werden je nach Herkunft des primären entweder ein Ziege-anti-Kaninchen-IgG-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Sigma Immunochemicals A-8025, $0,27 \mu\text{l/ml}$ in TBS/Tween/1,5 % Milchpulver) oder ein Kaninchen-anti-Schweine-IgG-alkalische-Phosphatase-Konjugat (bio-Veda, $0,03 \mu\text{l/ml}$ in TBS/Tween/1,5 % Milchpulver) verwendet. Zum Abschluß wird die Membran noch einmal für 3 x 5 min in TBS/Tween gewaschen und dann mit dem Farbsubstrat, $66 \mu\text{l}$ NBT und $33 \mu\text{l}$ BCIP in 10 ml AP-Puffer, geschüttelt. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität der Banden wird die Reaktion mit dest. Wasser abgestoppt.

Anodenpuffer I:	0,3 M	Tris
	20 %	Methanol
Anodenpuffer II:	25 mM	Tris
	20 %	Methanol
Kathodenpuffer:	25 mM	Tris
	40 mM	ϵ -Amino-n-Caprinsäure
	20 %	Methanol

10 x TBS/Tween s. 1.9
 Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer): s. 1.9

2.30 Immuno-Dotblot

Im Western-Dotblot werden wie im herkömmlichen Westernblot bestimmte Proteine anhand eines spezifischen Primärantikörpers, der mit Hilfe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers detektiert wird, nachgewiesen. Die Stärke der erzielten Farbreaktionen in Verdünnungsreihen des Antigens läßt Rückschlüsse auf dessen relative Menge im Vergleich zu Verdünnungen von Kontrollstämmen zu.

Übernachtkulturen der zu testenden Bakterien werden auf die gleiche OD₆₀₀ von 0,50 eingestellt und je 1 ml der eingestellten Kulturen für 5 min bei 8.000 rpm in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Die Bakterien werden in steriler Saline aufgenommen und Verdünnungsreihen in Stufen von 1:3 hergestellt. Für den Blot wird ein geeignetes Stück Nitrocellulose mit Saline befeuchtet, in den Dotblotter eingespannt und für 5 min an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Dann werden 200 µl jeder Verdünnungsstufe aufgetragen und vollständig auf die Membran gesaugt. Die Entwicklung des Dotblots erfolgt exakt wie für den herkömmlichen Westenblot beschrieben. Als Substrat für die antikörpergekoppelte alkalische Phosphatase können NBT/BCIP (s.o) oder CSPD verwendet werden.

CSPD ist ein Chemilumineszenz-Substrat für alkalische Phosphatase, das einen sensitiven Nachweis dieses Enzyms durch die Produktion von sichtbarem Licht erlaubt, welches wiederum mit Hilfe eines Films detektiert wird. Nach der Inkubation des Blots mit dem Sekundärantikörper, an den die alkalische Phosphatase gekoppelt ist, und den entsprechenden Waschschritten in TBS/Tween wird die Membran kurz in Detektionspuffer äquilibriert. CSPD wird in Detektionspuffer auf 0,25 mM verdünnt, die Membran mit ca. 2 ml dieser Lösung bedeckt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wird abgenommen, die noch feuchte Membran in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt und bei 37°C 30 bis 40 min lang weiterinkubiert. Danach wird für 60 min ein Röntgenfilm aufgelegt und, je nach Signalstärke auf dem ersten Film, die Inkubationszeit für einen weiteren Film verlängert oder verkürzt.

Saline s. 1.9

TBS/Tween s. 1.9

Detektionspuffer 0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
50 mM MgCl₂
pH 9,5

2.31 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Dazu werden die Gele für 30 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend in Entfärbelösung unter schütteln wieder entfärbt, wobei die Entfärbelösung mehrfach gewechselt wird. In die Lösung miteingelegte Papiertücher binden den freigesetzten Farbstoff und beschleunigen die Entfärbung. Der Entfärbeporgang ist beendet, wenn der Hintergrund wieder farblos ist und sich die Banden gut abheben. Nach einem Waschschriff in Wasser können die Gele getrocknet werden.

Coomassie-Färbelösung: 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250 in Entfärbelösung

Entfärbelösung: Methanol / Eisessig / Wasser im Verhältnis 5 : 1 : 5

2.32 Silberfärbung von Proteingelen (Blum *et al.*, 1987)

Die Silberfärbung dient dem Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen, wobei auch noch sehr geringe Proteinmengen detektiert werden können. Alle folgenden Arbeitsschritte werden unter schütteln durchgeführt. Die Proteingele werden in Fixierlösung für mindestens 1 h fixiert und danach in 50 % Ethanol für 3 x 20 min gewaschen. Danach werden sie 1 min lang in Imprägnierlösung kräftig geschüttelt, 3 x 20 sec mit dest. Wasser gespült und für 20 min in Silbernitratlösung inkubiert. Vor dem Entwicklungsschritt ist es wichtig, die Gele nochmals 2 x 20 sec mit dest. Wasser gründlich zu waschen. Die Entwicklung erfolgt in zwei Schritten: zunächst wird das Proteingel in Entwicklerlösung geschwenkt, bis ein grauer Silberniederschlag die Lösung zu trüben beginnt. Dann wird der Entwickler gewechselt und das Gel so lange inkubiert bis die gewünschte Farbintensität der Proteinbanden erreicht ist. Die Reaktion

wird mit Fixierlösung abgestoppt, die Gele nochmals mit dest. Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

Fixierlösung:	30 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure
Imprägnierlösung:	0,02 %	Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O (200 mg/l)
Silbernitratlösung:	0,2 %	Silbernitrat (2 g/l)
Entwicklerlösung:	2,5 %	Natriumcarbonat wasserfrei (25 g/l)
		frisch ansetzen: zu 100 ml Natriumcarbonatlösung 80 µl Formaldehyd zugeben.

2.33 Induktion von Bakteriophagen durch Mitomycin C- oder UV-Licht-Behandlung von Bakterienkulturen

Die Induktion von Stx2-konvertierenden Bakteriophagen hat neben der Produktion von Phagenpartikeln auch die Expression der Toxingene zur Folge. Die Übernachtskultur eines *E. coli*-Stamms mit einem lysogenen Bakteriophagen wird 1:100 in LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln bis zur OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 hochgezüchtet. Für die Phageninduktion durch Mitomycin C werden einer Hälfte der Kultur 200 ng/ml dieses Antibiotikums zugesetzt und zusammen mit der anderen Hälfte als Kontrollkultur bei 37°C geschüttelt. Für die UV-Behandlung werden 10 ml der Kultur bei 5.000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert und die Zellen in 5 ml 10 mM sterilem CaCl₂ aufgenommen. Die Suspension wird in eine sterile Petrischale überführt, im Crosslinker mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt und sofort in einen mit Alufolie umwickelten Kolben mit 45 ml LB-Medium und 2 mM MgCl₂ überführt. Die Abdunklung ist nötig, um die Photoreaktivierung der DNA-Reparatur zu verhindern. Die induzierte Kultur wird zusammen mit einer geeigneten Kontrollkultur bei 37°C weitergeschüttelt. Nach ca. 4 h beginnt die OD₆₀₀ der induzierten Kultur aufgrund der einsetzenden Lysis im Vergleich zur Kontrollkultur zurückzugehen.

2.34 Isolation von Shiga-Toxin aus Bakterienkulturen (Donohue-Rolfe und Keusch, 1983)

2.34.1 Herstellung von Periplasma-Extrakten

2.34.1.1 Minimal-Maßstab für ELISA-Toxinquantifizierung

Jeweils 2 ml Kultur werden für 5 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und aufbewahrt. Das Zellsediment wird einmal in 1 ml PBS gewaschen, in 2 ml Polymyxin B in PBS (2 mg/ml) aufgenommen und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die äußere Membran der Bakterien zerstört und der Inhalt des Periplasmas freigesetzt wird. Die Zellen werden nochmals für 5 min abzentrifugiert, der Lysatüberstand abgenommen und zusammen mit dem Zellkulturüberstand direkt für die Toxinquantifizierung verwendet. Je nach zu erwartendem Toxingehalt einer Kultur können auch die Zellen größerer Kulturvolumina mit entsprechend weniger Polymyxin B-Lösung behandelt und der Toxingehalt des Lysats damit aufkonzentriert werden.

10 x PBS: s. 1.9

2.34.1.2 50 ml-Maßstab für Westernblot

Von den zu untersuchenden Kulturen werden jeweils die OD₆₀₀ bestimmt und je 50 ml für 20 min bei 5.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen und die Zellen mit je 1,5 ml PBS gewaschen. Diese Suspensionen werden in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Die Zellen werden in je 500 µl PBS resuspendiert und danach alle Ansätze

gleichzeitig mit je 500 μl Polymyxin B in PBS (4 mg/ml) versetzt (PBS-Endkonzentration: 2 mg/ml). Nach kurzem Vortexen werden die Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 10 min in der Tischzentrifuge bei Maximalgeschwindigkeit abzentrifugiert. Die Überstände, die nun das zellassoziierte Toxin enthalten, werden abgenommen und im Westernblot eingesetzt. Sollen die Toxinmengen bezogen auf gleiche Ausgangszelldichten im Westernblot verglichen werden, so müssen für die aufs Gel aufzutragenden Extrakte jeweils mit Hilfe der gemessenen OD_{600} die jeweils gleichen Zelldichten entsprechenden Extraktmengen errechnet werden.

10 x PBS: s. 1.9

2.34.2 Stx2-Aufkonzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung

100 ml der Mitomycin C-induzierten Kultur eines Shiga-Toxin-Produzenten werden für 15 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Zu den 100 ml Überstand werden langsam unter Rühren 51,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugefügt und gelöst (80 % Sättigung), dabei fällt präzipitiertes Stx2 aus. Das ausgefallene Toxin wird durch 15 min Zentrifugation bei 10.000 rpm pelletiert, das Sediment in 4 ml 25 mM Tris-HCl pH 7 gelöst und die Lösung zweimal für mind. 3 h in 25 mM Tris-HCl pH 7 dialysiert. Die Proteinkonzentration der dialysierten Lösung wird bestimmt und eine geeignete Menge Protein direkt in der Westernblot-Analyse eingesetzt.

2.35 Quantifizierung von Shiga-Toxin 2 im Toxin-Sandwich-ELISA (Acheson *et al.*, 1989)

Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ermöglicht eine spezifische Quantifizierung von Proteinen in ungereinigten Proteinextrakten. Die Proteine werden an eine Trägermatrix (ELISA-Platte) gebunden und anhand eines spezifischen Primärantikörpers sowie eines Sekundärantikörpers, an den alkalische Phosphatase gekoppelt ist, nachgewiesen. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgt durch den Umsatz eines Farbreagenzes, dessen Farbintensität gemessen wird. Eine Besonderheit des Toxin-Sandwich ELISA ist die Tatsache, daß die Mikrotiterplatte als erstes mit einem Shiga-Toxin 2 (Stx2)-spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet wird. Werden im nächsten Schritt die zu messenden Proteinfractionen aufgetragen, so bindet der monoklonale Antikörper Stx2, während die Bindung unspezifischer Proteine an die Platte minimiert wird. Die Quantifizierung von Shiga-Toxin erfolgt jeweils aus dem Zellkulturüberstand sowie aus Periplasma-Extrakten der Kultur des zu untersuchenden Shiga-Toxin-Produzenten. Aus den Kulturüberständen wird der Anteil an freigesetztem Toxin, aus den Periplasma-Extrakt der Anteil an zellassoziiertem Shiga-Toxin bestimmt.

Eine 96-well-Mikrotiterplatte Nunc-Immuno Maxi Sorp wird mit der Verdünnung eines der Stx2-spezifischen monoklonalen Antikörper 4D1 oder 3D1 (0,4 $\mu\text{l}/\text{ml}$ in PBS, 100 $\mu\text{l}/\text{Napf}$) beschickt und über Nacht bei 4°C adsorbiert. Die Absättigung unspezifischer Proteinbindungen erfolgt für 30 min bei Raumtemperatur mit 1 % BSA in PBS. Als nächstes wird die Platte 5 x mit PBS gewaschen und Verdünnungsreihen der toxinhaltigen Fraktionen in PBS/Tween auf die Platte aufgetragen (100 $\mu\text{l}/\text{Napf}$). Außerdem werden für die Erstellung der Standardkurve 1:2-Verdünnungen von gereinigtem Stx2 in PBS/Tween (50 ng/ml bis 0,39 ng/ml) appliziert. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Nach 5maligem Waschen der Platte mit PBS/Tween wird sie mit dem Primärantikörper, einem polyklonalen Kaninchen-anti-Stx2-Antikörper (0,27 $\mu\text{l}/\text{ml}$ in PBS/Tween, 100 $\mu\text{l}/\text{Napf}$) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann erneut 5 x mit PBS/Tween gewaschen. Als Sekundärantikörper wird dieselbe Verdünnung eines Ziege-anti-Kaninchen-IgG-alkalische-Phosphatase-Konjugats (Sigma Immunochemicals A-8025) verwendet und unter denselben Bedingungen inkubiert und gewaschen. Für die Detektionsreaktion wird das Sigma 104 Phosphatase Substrat (p-Nitrophenyl-Phosphat, Dinatrium, 1mg/ml in AP-Puffer, 100 $\mu\text{l}/\text{Napf}$) auf die Platte aufgetragen und 30 bis 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Platte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm gemessen. Die Erstellung der Standardkurve aus den Werten der Toxinverdünnungsreihe ermöglicht die genaue Berechnung des Toxingehalts der Testfraktionen. Es ist notwendig, die Standardkurve für jede Mikrotiterplatte neu zu bestimmen.

10 x PBS: s. 1.9

10 x PBS/Tween: 5 ml/l Tween 20 in 10 x PBS

Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer): s. 1.9

2.36 Quantifizierung von Shiga-Toxin 2 im [³H]Leucin-Inkorporations-Assay (Keusch *et al.*, 1988)

2.36.1 Zellkultur

Für die beschriebenen Versuche wurden HeLa-Zellen (Cervixkarzinom) oder Vero-Zellen (Meerkatzen-Niere) verwendet. Die Zellen werden in McCoy's 5 A Medium mit 10 % FCS gehalten, das wie folgt angesetzt wird:

Zellkulturmedium:	1 l	GIBCO McCoy's 5 A
	100 ml	FCS (fötales Kälberserum)
	10 ml	Glutamin (200 mM Stocklösung)
	10 ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)

2.36.1.1 Anzuchten von Gewebekulturzellen

Eingefrorene Gewebekulturzellen werden in einem 37°C Schüttelwasserbad aufgetaut und die Zellen sofort aus dem Kryoröhrchen in 15 ml vorgewärmtes Medium in einer 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ wird das Medium gewechselt um das DMSO zu entfernen und die Zellen so lange bei 37°C und 5 % CO₂ weiterinkubiert, bis sie geerntet werden können.

2.36.1.2 Passagieren von Gewebekulturzellen

Nachdem die Gewebekulturzellen einen konfluenten Monolayer gebildet haben wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Dann werden sie in 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min (HeLa-Zellen) bzw. mindestens 10 min (Vero-Zellen) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, damit sie sich vom Boden der Kulturflasche lösen. Die Zellen werden vom Flaschenboden durch leichtes Klopfen abgeschwenkt, 10 ml vorgewärmtes Medium zugefügt und die Zellen durch auf- und abpipettieren gut suspendiert. Ein Aliquot der Suspension wird in eine neue Zellkulturflasche mit 10 ml vorgewärmtem Medium überführt, die Größe des Aliquots ist abhängig vom Zeitpunkt des Experiments, für das die Zellen benötigt werden. 3 ml Aliquot eines konfluenten Monolayers liefern nach 3 Tagen bei 37°C und 5 % CO₂ einen neuen konfluenten Monolayer. Während dieser Inkubation wird je nach Bedarf das Medium gewechselt.

2.36.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte der geernteten Zellsuspension wird anhand eines Hämacytometers durch auszählen der Zellen unter dem Mikroskop bestimmt. Für die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen wird der Farbstoff Trypanblau zugefügt. Tote Zellen färben sich blau, während lebende Zellen hell bleiben.

2.36.1.4 Einfrieren und Aufbewahrung von Gewebekulturzellen

Nach dem Trypsinieren werden je 5×10^6 Gewebekulturzellen (HeLa-, Verozellen) mit 1 ml Aufbewahrungsmedium versetzt und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen werden in Papiertücher eingewickelt, in ein Styroporack gesetzt und für 24 h bei -80°C eingefroren. Danach werden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Aufbewahrungsmedium: 10 % DMSO in FCS

2.36.2 Zytotoxizitätsmessung durch [^3H]Leucin-Inkorporation

Die Messung der Zytotoxizität durch den Einbau von [^3H]Leucin beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen radioaktiv markierte Aminosäuren aufzunehmen und beim Prozeß der Translation in Proteine zu inkorporieren, was im Szintillationszähler gemessen werden kann. Sind Zellen geschädigt, so ist diese Aufnahme von Radioaktivität reduziert oder völlig unterbunden. Zwei Tage vor Durchführung des Versuchs werden in eine 96-Napf-Zellkulturplatte je 20.000 Zellen/Napf (HeLa- oder Verozellen) ausgesät. Am Abend vorher wird das Medium in den Näpfen abgesaugt und zu den konfluenten Monolayern je 100 μl der zu testenden Toxinfraktionen zugegeben (Dreifachbestimmungen!). Für die Toxinquantifizierung wird eine Stx2-Verdünnungsreihe in Zellkulturmedium in Schritten von 1:10 (10 ng bis 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Toxin) mit aufgetragen und über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag werden die Toxinfraktionen abgesaugt, die Zellen in leucinfreiem Medium gewaschen und für 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 mit 100 μl /Napf leucinfreiem Medium, dem 5 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -markiertes Leucin zugesetzt worden sind, inkubiert. Bei diesem Schritt wird von intakten Zellen ^3H -Leu aufgenommen und eingebaut. Die Zellen werden mit leucinfreiem Medium gewaschen und für 15 min bei Raumtemperatur mit 50 μl /Napf 0,1 M KOH lysiert. Die Zugabe von eiskalter 10 % TCA (Trichloressigsäure) bewirkt die Fällung der gelösten Proteine. Die Lysate werden gut suspendiert und auf eine 96-Napf Mikrotiterplatte mit Glasfaserfilterböden (Millipore) überführt, die auf eine passende Vakuumapparatur aufgesetzt wird. Die Flüssigkeit in den Näpfen wird durch die Filter gesaugt, während die gefällten Proteine auf den Filtern verbleiben. Diese werden zweimal mit je 100 μl 10 % TCA und schließlich einmal mit 100 μl 1 % Essigsäure gewaschen. Die Filter werden unter Rotlicht getrocknet und mit Hilfe einer speziellen Stanzapparatur in Szintillationsröhrchen mit je ca. 2 ml Szintillationsflüssigkeit überführt. Die Messung des Einbaus von ^3H -Leu erfolgt im Szintillationszähler. Der Radioaktivitätseinbau von Zellen, die nicht mit Toxin behandelt worden sind, wird als 100 % gesetzt. Die Errechnung einer Standardkurve ermöglicht eine genaue Toxinquantifikation.

leucinfreies Medium:	1 l	GIBCO Minimal essential medium (mit Earle's Salzen, ohne L-Glutamin und L-Leucin)
	10 ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) Na-Pyruvat

[^3H]-markiertes Leucin: 1.000 $\mu\text{Ci/ml}$, davon 50 μl zu 10 ml leucinfreiem Medium

2.37 Phagen-Plaque-Assay

Von der mit mit Mitomycin C oder UV-Licht induzierten, phagenhaltigen Kultur wird 1 ml für 2 min abzentrifugiert und der Überstand durch ein 0,45 μm Filter sterilfiltriert. Der Phagenindikatorstamm wird bis zur stationären Phase in LB-Medium mit 10 mM CaCl_2 und 0,2 % Maltose hochgezüchtet. Von den sterilen Phagenlysaten werden in LB-Medium mit 10 mM CaCl_2 Verdünnungsreihen hergestellt, je 100 μl davon mit je 100 μl Indikatorstamm gemischt und für die Infektion ohne Schütteln bei 37°C für 20 min inkubiert. Zu den Infektionsansätzen werden je 2,5 ml flüssiger, 46°C warmer LB-Weichagar pipettiert, gemischt und sofort auf die auf 37°C vorgewärmten LB-Agarplatten gegossen. Die Inkubation erfolgt über Nacht im 37°C -Brutschrank. Der Phagentiter der Ausgangskultur kann anhand der Zahl der Phagenplaques bestimmt werden.

2.38 Isolation von lysogenisierten *E. coli*-Stämmen

Die zu lysogenisierenden Bakterien werden wie oben beschrieben mit einem Phagenextrakt infiziert, in Weichagar auf Agarplatten ausplattiert und nach der Inkubation über Nacht die Phagenplaques begutachtet. Mit einer sterilen Nadel werden die lysogenen Bakterien in der Mitte eines Plaques gepickt, in sterilem LB-Medium suspendiert, verdünnt, auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert. Die Kolonien werden in einer Kolonie-Hybridisierung mit einer geeigneten phagenspezifischen Sonde getestet. Positive Stämme werden sowohl in einer Reinfektion auf Resistenz gegen den Ausgangsphagen als auch auf die Freisetzung von Phagenpartikeln wie oben beschrieben überprüft. Lysogenisierte Stämme sollen Bakteriophagen freisetzen und sich mit Phagenpartikeln des eigenen Phagen nicht reinfizieren lassen.

2.39 Indirekte Phagenquantifizierung durch relativ quantitative PCR (Fuchs *et al.*, 1999)

Bei der indirekten Phagenquantifizierung durch relativ quantitative PCR wird die bei der Lyse des Wirtsstamms in Form von Phagenpartikeln freigesetzte Phagen-DNA anhand von spezifischen Primern nachgewiesen. Diese Methode ist sehr sensitiv und umgeht das Problem der extremen Instabilität von Stx₂-Phagen, die in einem schnellen Verlust der Infektionsfähigkeit der Phagenpartikel zum Ausdruck kommt. Die phagenhaltigen Kulturen, deren Phagentiter verglichen werden sollen, werden auf dieselbe OD₆₀₀ eingestellt. Jeweils 10 ml der Kulturen werden abzentrifugiert und die Überstände mit Filtern der Porengröße 0,45 µm sterilfiltriert. Durch eine Inkubation der Lysate mit RNase und DNase (Endkonzentrationen jeweils 1 mg/ml) für 30 min bei 37°C werden störende Polynukleotide entfernt. Die Phagenpartikel werden durch Ultrazentrifugation über Nacht bei 29.000 rpm und 4°C pelletiert und die Sedimente in je 200 µl PBS aufgenommen. Unmittelbar vor der Durchführung der PCR werden Verdünnungsreihen dieser Phagensuspensionen in Schritten von 1:10 hergestellt, die für 10 min aufgekocht und zu je 3 µl als Templates in 50 µl-PCR-Ansätzen (Supermix) eingesetzt werden. Als phagenspezifische Primer werden die *stx*₂-spezifischen Oligonukleotide SLTII-1 und SLTII-2 verwendet. Von den PCR-Produkten werden je 10 µl auf Agarosegele aufgetragen und die Intensität der 481 bp Banden zur Abschätzung der relativen Phagenkonzentrationen in den Extrakten miteinander verglichen.

10 x PBS: s. 1.9

2.40 Transposonmutagenese lysogener Bakteriophagen in *E. coli* mit dem Transposon Tn10d-Cam (Elliott und Roth, 1988)

Das Transposon Tn10d-Cam ist ein transpositionsdefektes Minitransposon von 1,5 kb Größe, das ein *cat*-Gen (Chloramphenicol-Resistenz, Cm^R) enthält und auf dem Plasmid pZT344 kodiert vorliegt. Es springt nur, wenn von seinem Wirtsplasmid ausgehend Transposase exprimiert wird. Für die Mutagenese des Bakteriophagen 933W wird das Plasmid in den Stamm C600(933W), der lysogen ist für den Phagen, transformiert und stabil etabliert, indem der resultierende Stamm auf Ampicillin gehalten wird. Für die Induktion der Transposase wird eine Übernachtskultur 1:100 in LB-Medium ohne Antibiotikum verdünnt, 1 mM IPTG zugesetzt und bis zur OD₆₀₀ von 0,7 hochgezogen. Während dieser Zeit wird die Transposase induziert und das Transposon springt zufallsverteilt ins Genom des Wirts. Die IPTG-induzierte Kultur wird wie in den entsprechenden Kapiteln dieser Arbeit beschrieben mit Mitomycin C (200 ng/ml) behandelt und nach einer Inkubationszeit von 5 h die Phagen isoliert. Der Empfängerstamm C600(pADR-28), der ein Tetracyclin-Resistenz (Tc^R)-vermittelndes Plasmid mit einem Reporter-gen für die *stx*₂-Expression enthält, wird in LB-Medium mit 10 mM CaCl₂, 0,2 % Maltose und 10 µg/ml Tc bis zur stationären Phase hochgezüchtet und mit dem Phagenlysat infiziert. Nach einer Infektionszeit von 30 min werden dem Ansatz 4 ml LB-Medium mit Tc zugegeben und die Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt. Eine Verdünnungsreihe dieser Kultur wird auf LB-Agarplatten mit Tc und Cm ausplattiert und über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert. Auf den Platten wachsen nur Klone, die sowohl pADR-28 (Tc^R) als auch ein phagenkodiertes Tn10d-Cam (Cm^R) enthalten. Diese Phagenmutanten können weiteren Tests unterzogen werden.

2.41 Bestimmung der Aktivität von alkalischer Phosphatase (PhoA) im PhoA-Assay (Brickman und Beckwith, 1975; Michaelis *et al.*, 1983)

Im PhoA-Assay wird die Aktivität von alkalischer Phosphatase (PhoA) in Bakterienkulturen ermittelt, wobei die Werte für freie PhoA im Überstand und an Zellen gebundene PhoA getrennt bestimmt werden und zum Schluß die Gesamtaktivität berechnet wird.

Von den zu testenden Bakterienkulturen werden die OD₆₀₀ gemessen, je 2 x 1 ml Kultur (Doppelbestimmung) abzentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Zellpellets werden 3 x mit 1 M Tris-HCl pH 8 gewaschen und in je 1 ml desselben Puffers aufgenommen. Den erwarteten PhoA-Aktivitäten entsprechend werden Verdünnungen der Zellsuspensionen (für die Bestimmung der zellassoziierten PhoA-Aktivität) und der Überstände (überstandsassoziierte PhoA-Aktivität) hergestellt. Zu je 1 ml dieser Verdünnungen werden 100 µl Sigma 104 Phosphatase Substrat (p-Nitrophenyl-Phosphat, Dinatrium, 0,4 % in 1 M Tris-HCl pH 8) zugesetzt und bei 37°C inkubiert, wobei das Substrat hydrolysiert wird und ein gelber Farbstoff entsteht. Wenn die gewünschten Farbintensitäten erreicht sind, werden die Reaktionen durch Zugabe von je 100 µl 1 M K₂HPO₄ abgestoppt. Verdünnungsfaktor und Reaktionszeit (in min) eines jeden Ansatzes müssen notiert werden. Die abgestoppten Ansätze werden abzentrifugiert und die Überstände im Photometer bei den Wellenlängen λ = 420 nm und 550 nm gemessen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (in Phosphatase-Einheiten, units) wird anhand der folgenden Formel berechnet.

$$\text{Aktivität [units]} = 1.000 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{\text{OD}_{420} - 1,75 \times \text{OD}_{550}}{\text{Reaktionszeit} \times \text{OD}_{600}}$$

Als Negativkontrolle wurde in der vorliegenden Arbeit immer die PhoA-Aktivität des *E. coli* K-12-Stammes C600 mitbestimmt. Die so ermittelte PhoA-Grundaktivität des Stammes wurde in den Reportergerneassays, in denen immer Derivate dieses Stammes getestet wurden, von der Gesamtaktivität der Teststämme abgezogen, bevor weitere Berechnungen mit den ermittelten Werten durchgeführt wurden.

2.42 Schnelles PhoA-Screening der C600(933W)-Transposonmutanten

Für die erste Charakterisierung der im vorletzten Kapitel beschriebenen Phagentransposonmutanten werden die Stämme über Nacht in LB-Medium mit Tc, Cm und Mitomycin C angezüchtet. Am nächsten Tag werden die OD₆₀₀ der Stämme gemessen und je 100 µl der Kulturen und 100 µl entsprechender 1:10 Verdünnungen in 1 M Tris-HCl pH 8 auf eine 96-Napf-ELISA-Platte aufgetragen. Zu jedem Napf werden 100 µl Sigma 104 Phosphatase Substrat (p-Nitrophenyl-Phosphat, Dinatrium, 1 mg/ml in 1 M Tris-HCl pH 8) zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Bei beginnender Gelbfärbung wird die Platte zu verschiedenen Zeitpunkten im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von λ = 405 nm gemessen. Anhand der folgenden Formel können die relativen PhoA-Aktivitäten der Teststämme abgeschätzt werden.

$$\text{Aktivität (vorläufig)} = \frac{\text{OD}_{405} \text{ (bereinigt)}}{\text{OD}_{600}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100$$

$$\text{wobei } \text{OD}_{405} \text{ (bereinigt)} = \text{OD}_{405} \text{ (Teststamm)} - \text{OD}_{405} \text{ (LB)}$$

2.43 Motilitätstest auf Schwärmagarplatten

Schwärmagarplatten werden in der Mitte mit je einer Kolonie des zu untersuchenden Stammes beimpft, wobei ist zu beachten ist, daß die Platten bei der Beimpfung nicht zu naß sind. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C werden die Platten begutachtet. Motile Stämme zeigen einen ausgeprägten Schwärmhof um die beimpfte Stelle, während nichtmotile Stämme nur in einer schmalen Zone um die Impfstelle herum wachsen.

2.44 Mannose-sensitive Hefeagglutination (Ørskov und Ørskov, 1983)

Zum Nachweis von Typ 1-Fimbrien werden die Teststämme über Nacht unter Schütteln in LB-Medium angezogen. 10 µl dieser Kultur werden mit 10 µl Hefesuspension (*Saccharomyces cerevisiae* in steriler Saline) ohne und mit 2 % Mannose vermischt und einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Agglutination der Hefezellen durch Typ 1-fimbrierte Bakterien wird durch die Anwesenheit von Mannose gehemmt.

Saline: s. 1.9

2.45 Nachweis der Häminverwertung

Zum Nachweis der Häminverwertung werden die Teststämme auf LB-Agarplatten, die mit dem Eisenchelator Dipyrindyl (0,6 mM) versetzt sind, 30 µg/ml L-Histidin, 0,12 % Triethanolamin und als einzige Eisenquelle 30 µg/ml Hämin enthalten, aufgeimpft. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C. Unter diesen Bedingungen können *leuX⁺* EHEC-Stämme im Gegensatz zu *leuX⁻* EHEC-Stämmen auf den Platten wachsen.

2.46 Nachweis von Enterohämolsin (Beutin *et al.*, 1994)

Die zu testenden Stämme werden auf Blutagarplatten mit gewaschenen Schafserythrozyten (Oxoid) ausgestrichen und für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei α -hämolytischen Stämmen zeigt sich bereits nach 4 h eine beginnende Hämolyse, die nach 24 h zur Bildung großer, klarer Höfe führt, während bei enterohämolytischen Stämmen erst nach 24 h eine leichte Aufhellung um die Kolonien herum sichtbar wird. Die Hämolysehöfe bleiben klein und trüb.