

---

## Glossar

**Agarose** Das weiße Pulver, das aus Meeresalgen gewonnen wird. Nach der Zugabe von Wasser (bzw. Puffer) lässt sich das Agarose-Pulver in einer Mikrowelle lösen. Durch Erhitzen entsteht eine transparente, zähe Flüssigkeit. Diese Flüssigkeit erstarrt nach 30 min. bei Raumtemperatur und bildet eine gelartige Substanz, in der Fragmente der Nukleinsäuren unter Einfluss des elektrischen Feldes nach der Größe getrennt werden können.

**Amplifikation** Ein Schritt bei der PCR, bei dem die DNA-Fragmente vervielfältigt werden.

**Annealing** Ein Schritt bei der PCR, bei dem die komplementäre Anlagerung (Adenin an Thymin, Guanin an Cytosin) eines Primers an einen spezifischen Abschnitt der einzelsträngigen DNA stattfindet.

**Banden** Bezeichnung der horizontalen Striche, die man auf einem Gel nach einer Gelelektrophorese sieht. Es sind DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Länge.

**Base** Bezeichnung in der Molekularbiologie für die Stickstoffbasen Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin und Uracil. Diese Bezeichnung wird auch für die Nukleotide verwendet, weil in einem DNA bzw. RNA Strang der Unterschied zwischen den einzelnen Nukleotiden nur in den Stickstoffbasen liegt.

**bp** Abkürzung für **Basenpaare** (= Nukleotid-Paare). Diese Einheit (bp) verwendet man um die Größe der DNA-Fragmente anzugeben.

**Cofaktor** Anorganische oder kleine organische Komponenten, die für die Aktivität eines Enzyms verantwortlich sind. Im einfachsten Fall sind das Metallionen.

**ddNTPs** *Di*desoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP) sind Nukleotide, die Di-desoxyribose enthalten. Sie werden auch Stop-Nukleotide genannt. Solche Nukleotide werden bei der Sequenzierung verwendet.

**DNA-Doppelhelix** Griech. „helix“ = Windung, Spirale, wendelförmig. Räumliche DNA-Struktur. Auf diese Art werden zwei DNA-Einzelstränge stabil miteinander verbunden.

**dNTPs** Abkürzung für ein Gemisch aus Desoxynukleosidtriphosphaten (dGTP, dCTP, dATP, dTTP). „d“ steht für desoxy-, „N“ für Nukleosid, „T“ für -tri-, „P“ für -Phosphat.

**Enzym** Ein Protein, das hocheffizient und spezifisch als biologischer Katalysator wirkt. (Weber 1997, S. 182)

Enzyme sind in allen Zellen enthalten. Sie beschleunigen bestimmte biochemische Reaktionen, ohne selbst verbraucht zu werden (z. B. Synthese oder Abbau). Der Name eines Enzyms endet oft auf „-ase“ (z. B. Polymerase, Proteinase)

**Extension (Elongation)** Ein Schritt bei der PCR, in dem eine Verlängerung des Primers durch komplementären Einbau von Nukleotiden durch ein Enzym stattfindet. Es werden Adenin zu Thymin, Guanin zu Cytosin dazugebaut.

**Fluoreszenz** Eigenschaft eines Stoffes zu leuchten, welche bei der Real-time PCR verwendet wird.

Lichtemission (ein Leuchten) der Moleküle, die vorher durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wurden.

**FRET** **Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer**, ein physikalischer Prozess, bei dem die Energie eines durch Licht angeregten Farbstoffes (Donor) auf einen zweiten Farbstoff (Akzeptor) übertragen wird. Nur dann findet Lichtemission (Lichtstrahlung) statt.

Solche Farbstoff-Paare können für die Sonden (Hybridisierungssonden) bei der Real-time PCR verwendet werden.

**Gelelektrophorese** Eine Methode zur Analyse der DNA-Fragmente in einer Probe (DNA-Isolat). DNA-Fragmente werden unter dem Einfluss des elektrischen Feldes der Größe nach getrennt. Kleinere Fragmente wandern schneller durch das Gel, größere Fragmente wandern langsamer. Als Medium für die Trennung wird am häufigsten Agarose benutzt. Diese Methode wird für solche Proben verwendet, die DNA-Fragmente in der Größe von etwa 50–2000 bp (0,05–2 kb) enthalten.

**Gen** Ist ein DNA-Abschnitt mit einer Reihenfolge (Sequenz) von Nukleotiden (Basen), auf dem meistens die Information für ein Protein verschlüsselt ist. Ein Gen ist eine physikalische und funktionelle Einheit des Erbgutmaterials.

**Genom** Das gesamte genetische Material einer Zelle oder eines Organismus (Hentze 1990, S. 233). Alle Gene, die sich auf dem DNA-Strang befinden.

**Hybridisierungs-Sonden** Zwei Sonden (Donor und Akzeptor), die bei der Real-time PCR eingesetzt werden. Jede Sonde ist ein Oligonukleotid, das mit einem Farbstoff markiert ist. Zum Beispiel Farbstoff-Fluoreszein beim Donor und Farbstoff-LC®Red640 beim Akzeptor.

Während der Annealing-Phase der PCR lagern sie sich sehr nah zu einander an ihre komplementäre Sequenz innerhalb des PCR-Produkts an. Nach der Anregung durch Licht mit einer bestimmten Wellenlänge, entsteht Lichtemission durch FRET. Dadurch kann das PCR-Produkt detektiert werden.

**kb** Abkürzung für Kilobasen, 1000 Basenpaare. Diese Einheit (kb) verwendet man, um die Größe von DNA-Fragmenten anzugeben.

**Komplementär** (frz. complémentaire) ergänzend, zu einander passend. Eine Art mit der die Basen in den Nukleinsäuren die Bindungen miteinander eingehen. Adenin mit Thymin oder Uracil, Guanin mit Cytosin.

**Lanes** [lɛɪns] Vertikale Bahnen, die man auf dem Gel nach einer Gelelektrophorese sieht. Die Lanes enthalten die Banden, horizontale Striche. Jede Bande enthält DNA-Fragmente gleicher Länge.

**Microarray-Technologie** [ˌmɪkrəˈrɛɪ] Auf einem Chip (4×4 mm) basierende Methode. Der Chip enthält über 100 Bindungsstellen, die bestimmten Genen entsprechen. Falls ein Gen in der Probe vorhanden ist, wird es durch einen Punkt dargestellt.

**Multiplex PCR** PCR, bei der mindestens 2 verschiedene Gene nachgewiesen werden können.

Der Reagenzien-Mix für eine Multiplex-PCR enthält mehrere verschiedene Primer-Paare.

**Mutation** Bleibende Veränderung des genetischen Materials (Hentze 1990, S. 240). Diese Veränderung betrifft die Basenreihenfolge in der Primärstruktur der DNA. Eine Veränderung der Basenreihenfolge geschieht durch Entfernen bzw. Hinzufügen eines oder mehrerer Nukleotide. Mutationen können vererbbar sein oder spontan entstehen. Auch die Veränderung einer einzigen Base kann für den Organismus gravierende Folgen haben.

**Nukleosid** Ein Molekül bestehend aus Zucker (Ribose oder Desoxyribose) und einer von fünf Basen (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin, Uracil).

**Nukleotid** Ein Molekül bestehend aus Zucker (Ribose oder Desoxyribose), einer von fünf Basen (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin, Uracil) und einem Phosphatrest (Monophosphat, Diphosphat oder Triphosphat).

**Nukleinsäure** Ein Polymer, das aus Monomeren (Nukleotiden) besteht.

**Oligonukleotid** Natürlich oder chemisch synthetisierte Kette von Nukleotiden (Mononukleotide), die über eine Phosphatbrücke miteinander verbunden sind (Hentze 1990, S. 241). Am häufigsten werden Oligonukleotide mit 20–40 Nukleotiden synthetisiert.

**PCR** engl. **P**olymerase **c**hain **r**eaction = Polymerase-Kettenreaktion.

Eine „in vitro-Methode“ (außerhalb von Lebewesen), für die enzymatische Vervielfältigung der spezifischen DNA-Fragmenten, deren Sequenz (Nukleotid-Reihenfolge) bekannt ist (vgl. Brand 1992, S. 185)

**PFGE Pulsfeldgelelektrophorese** Eine Methode zur Analyse der DNA-Fragmente in einer Probe (Zellsuspension). DNA-Fragmente werden unter dem Einfluss des rhythmisch pulsierenden elektrischen Feldes der Größe nach getrennt. Kleinere Fragmente wandern schneller durch das Gel, größere Fragmente wandern langsamer. Als Medium für diese Trennung wird ein spezielles PFGE-Agarose-Gel benutzt. Diese Methode wird für Proben verwendet, die DNA-Fragmente in der Größe von etwa 20–2000 **kb** enthalten, also viel größere Fragmente als bei der üblichen Gelelektrophorese mit homogenem elektrischem Feld.

PFGE wird z. B. bei Ausbruchsabklärungen verwendet, um die Ansteckungsquelle bei mehreren gleichzeitig erkrankten Patienten herauszufinden.

**Phosphat** Ein Anion  $\text{PO}_4^{3-}$ , also ein negativ geladenes Teilchen, das aus der Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) entstanden ist.

**Polymerase** In allen Lebewesen vorkommendes Enzym, das die Anbindung von Nucleotiden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) an den DNA-Einzelstrang ermöglicht.

**Primer** ['præməʃ] Einzelsträngiges Oligonucleotid, das sich komplementär an den DNA-Einzelstrang anlagert und von der Polymerase verlängert wird. Der Primer, der Startmolekül genannt wird, besitzt eine freie 3'-OH-Gruppe an die die Polymerase die dNTPs anbindet.

**Quencher** [kwɛn(t)ʃəʃ,] „Löschler“ Molekül, das die Anregungsenergie (Anregung der Teilchen durch Lichtstrahlung) von dem Nachbarmolekül (Reporter-Farbstoff) strahlungslos übernimmt. Sobald Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt werden, kann der Quencher keine Anregungsenergie mehr übernehmen und der Reporter-Farbstoff emittiert Fluoreszenzlicht (er leuchtet).

**Resistenz** Widerstandsfähigkeit.

Vererbare Eigenschaft bei Bakterien, die ihnen unter Einfluss von Antibiotika und anderen chemischen Einflüssen das Überleben ermöglicht. Resistenz-Gene befinden sich oft auf Plasmiden (kleine ringförmige DNA-Doppelstränge).

**Robustheit einer Methode** Eine Methode ist ausreichend robust für den Einsatz im Routinelabor, wenn unabhängig von unterschiedlichen Variablen (Operator, Chargen der Reagenzien, Gerät) immer gleiche Ergebnisse erzielt werden.

**Sequenz** Reihenfolge der Nucleotide auf einem DNA-Strang.

Zum Beispiel eine kurze Sequenz mit fünf Nucleotiden: „acctg“ oder „ACCTG“. Die Groß- und Kleinbuchstaben werden gleichermaßen für die Beschreibung der Sequenz benutzt.

**Sequenzierung** Ein Verfahren, mit dem man die Reihenfolge (Sequenz) von Nucleotiden auf einem DNA-Strang bestimmen und dadurch die Information über ein oder mehrere Gene erhalten kann. Im Falle der Sequenzierung des ganzen Genoms eines Lebewesens, entschlüsselt man den genetischen Code. Die Methode wird auf einem Sequenzer durchgeführt, der mit einem Computer ver-

bunden ist. Als Ergebnis erscheint am Computer-Bildschirm eine lange Reihe an Peaks, die den Buchstaben (Nukleotiden) zugeordnet werden.

**Sensitivität einer Methode** Die Methode ist sensitiv, wenn schon eine sehr geringe Menge an gesuchtem Parameter, z. B. „*stx*“ Gen bei *E. coli*, eindeutig nachweisbar ist.

**Spezifität einer Methode** Eine Methode ist spezifisch in Bezug auf einen gesuchten Parameter, wenn sie keine falsch positiven Ergebnisse liefert. Das bedeutet, dass das Produkt nur dann entsteht, wenn das gesuchte Merkmal vorhanden ist. Sonst bildet sich kein PCR-Produkt und die Probe ist negativ.

**TaqMan<sup>®</sup> Sonde** Sonde, die aus einem Oligonukleotid und zwei Farbstoffen (z. B. TAMRA als Quencher und 6-FAM<sup>™</sup> als Reporter) besteht. Solange der Reporter und der Quencher sich in unmittelbare Nähe zu einander befinden, unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz von dem Reporter-Farbstoff. Bei der Amplifikation (PCR-Schritt) wird der Reporter-Farbstoff von dem Quencher getrennt, dadurch wird die Fluoreszenzunterdrückung aufgehoben und der Reporter-Farbstoff kann Fluoreszenzlicht emittieren.

---

# Literatur

- Brand, K. (1992). *Taschenlexikon der Biochemie und Molekularbiologie* (1. Aufl.). Heidelberg: Quelle & Meyer Verlag.
- Czerwenka, K. (2003). *Einführung in die Molekularbiologie* (1. Aufl.). Wien: Wilhelm Mau-drich Verlag.
- Hetzke, M., Kulozik, A., & Bartram, C. (1990). *Einführung in die Medizinische Molekular-biologie: Grundlagen, Klinik, Perspektiven* (1. Aufl.). Berlin: Springer.
- Perelle, S., et al. (2004). Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Eschari-chia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7. *Molecular and Cel-lular Probes*, 18, 185–192.
- Reischl, U., et al. (2002). Real-time fluorescence PCR assays for detection and characteri-zation of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7), 2555–2565.
- Scheutz F, et al. (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxin and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 2951–2963.
- Weber, H., et al. (1997). *Wörterbuch der Mikrobiologie* (1. Aufl.). Jena: Gustav Fischer Verlag.