

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten in dieser Arbeit visuell im Vergleich mit einem "Gewichts-Marker" von LifeTechnologies (Gibco Industries, Inc., LA, Cal., USA).

Nukleinsäure-Analytik - Bestimmung der ausgewählten STEC-Virulenzgene

Shiga-Toxin. Für den Nachweis der Shigatoxin-Typen wurden verschiedene Shiga-Toxin-PCRs mit den Primerpaaren SK1/SK2 für den Shigatoxin-Typ 1 sowie SK3/SK4 für den Shigatoxin-Typ 2 durchgeführt. Die Bedingungen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

hly_{EHEC}-PCR. Zur Bestimmung wurde eine PCR mit dem Primerpaar EHL Y1 und EHL Y5 etabliert, das zu dem Ergebnis in Tabelle 4 führte.

Nachweis der LEE-spezifischen Gene *eae* und *espB*. Um einen Nachweis der Anwesenheit eines LEE zu führen, wurde eine PCR mit dem Primerpaar ECW1-ECW2 durchgeführt, das im konservierten 5'-Ende des *eae*-Gens bindet. Der Nachweis der Virulenzgene wie auch die Herstellung der Sequenzierungsmatrix erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion im Thermocycler (Modell *TouchDown*). Der Amplifikationsansatz wurde mit einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt in dem folgende Substratmengen enthalten waren: „5 µl (9 ng) DNA-Template, von jedem Desoxy-Triphosphat eine Konzentration von 100µM, 50pmol von jedem Primer, 5 µl eines 10-fach konzentrierten Polymerasesynthesepuffers, 2,5 mM MgCl₂ und 2,5 U der Taq Polymerase (LifeTechnologies (Gibco Industries, Inc., LA, Cal., USA))“. Die Primersequenzen sind in Tabelle 2 und PCR-Bedingungen in Tabelle 3 dargestellt.

Nukleinsäure-Analytik - Bestimmung der Housekeeping-Gene *cadB*, *mdh*, *putP* sowie *trpC*

Gewinnung der DNA für die Sequenzierungen erfolgte gleichfalls mit verschiedenen Polymerasekettenreaktionen, wofür die Primer in Tabelle 2 und die Reaktionsbedingungen in Tabelle 3 aufgeführt sind.

Nachweis der LEE-spezifischen Gene *eae* und *espB*. Um einen Nachweis der Anwesenheit eines LEE zu führen, wurde eine PCR mit dem Primerpaar ECW1-ECW2 durchgeführt, das im konservierten 5'-Ende des *eae*-Gens bindet. Der Nachweis der Virulenzgene wie auch die Herstellung der Sequenzierungsmatrix erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion im Thermocycler (Modell *TouchDown*). Der Amplifikationsansatz wurde mit einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt in dem folgende Substratmengen enthalten waren: „5 µl (9 ng) DNA-Template, von jedem Desoxy-Triphosphat eine Konzentration von 100µM, 50pmol von jedem Primer, 5 µl eines 10-fach konzentrierten Polymerasesynthesepuffers, 2,5 mM MgCl₂ und 2,5 U der Taq Polymerase (LifeTechnologies (Gibco Industries, Inc., LA, Cal., USA))“. Die Primersequenzen sind in Tabelle 2 und PCR-Bedingungen in Tabelle 3 dargestellt.

Nukleinsäure-Analytik - Bestimmung der Housekeeping-Gene *cadB*, *mdh*, *putP* sowie *trpC*

Gewinnung der DNA für die Sequenzierungen erfolgte gleichfalls mit verschiedenen Polymerasekettenreaktionen, wofür die Primer in Tabelle 2 und die Reaktionsbedingungen in Tabelle 3 aufgeführt sind.