

**Bayerische Landesanstalt
für Landwirtschaft**

Institut für Pflanzenschutz
Luitgardis Seigner

Schaderregernachweis mit der
Polymerase-Kettenreaktion
(PCR)

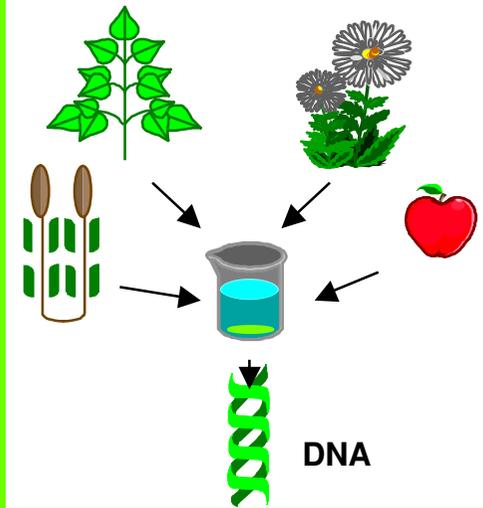
Schaderregernachweis mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode, die zum Nachweis phytopathogener Pilze, Bakterien, Viren und Viroide eingesetzt werden kann.

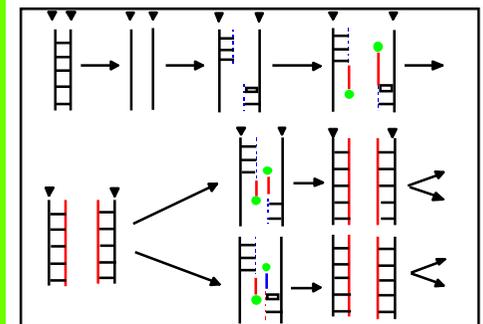
Für den Nachweis werden folgende Schritte durchgeführt:

- Die Erbsubstanz (DNA) des Erregers wird aus den Pflanzen isoliert.
- Dann wird die PCR im Reagenzglas durchgeführt. Dabei werden für einen Erreger charakteristische Abschnitte seiner Erbsubstanz millionenfach kopiert und somit vermehrt.
- Die Endprodukte der PCR werden dann über Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Tritt ein typisches Signal auf dem Elektrophoresegel auf, liegt Befall mit dem Erreger vor.

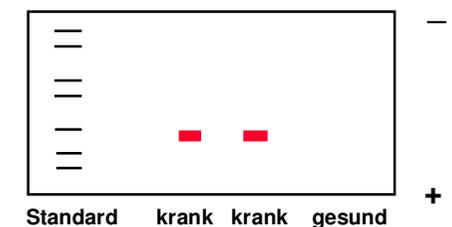
DNA-Extraktion



PCR



Elektrophorese



**Die Vorteile der
Polymerase-Kettenreaktion**

 **hohe Sensitivität**

 **hohe Spezifität**

 **Schnelligkeit**

**Die Prinzipien der
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mit der **PCR** wird die **DNA** (= Erbmateriale) eines Erregers nachgewiesen.

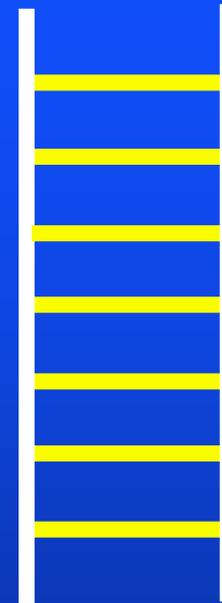
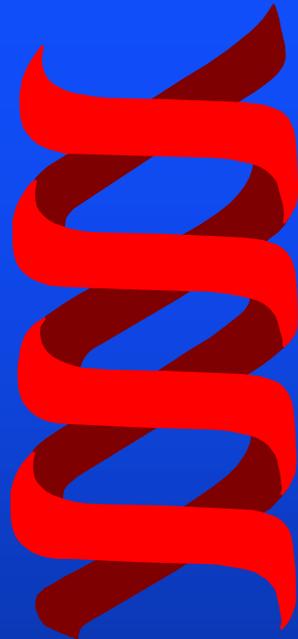
Sie beruht auf den **3** Teilschritten

- *Denaturierung*
- *Primeranlageung*
- *Polymerisation*

DNA

Ausgangsmaterial für die PCR

DNA
Doppelhelix



vereinfachte
Darstellung

Die **DNA** ist der Träger der Erbinformation bei allen Lebewesen.

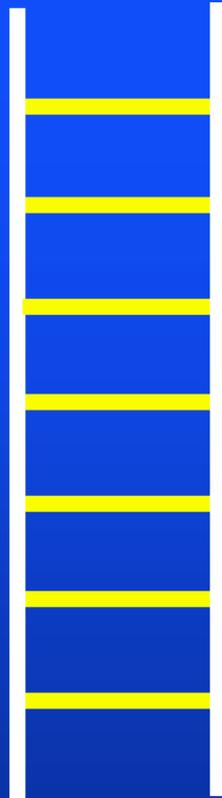
Sie liegt als Doppelstrang im Zellkern vor und wird von **Wasserstoffbrückenbindungen** zusammengehalten.

In folgenden Einzelschritten wird das
Erbmaterial (DNA) des Erregers
im Reagenzglas
millionenfach vermehrt

1. Denaturierung

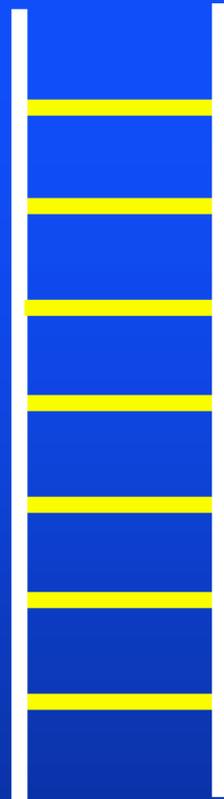
90 - 95 °C

DNA-
Doppelstrang



1. Denaturierung 90 - 95 °C

DNA-
Doppelstrang



Hitze
→

DNA-Einzel-
stränge

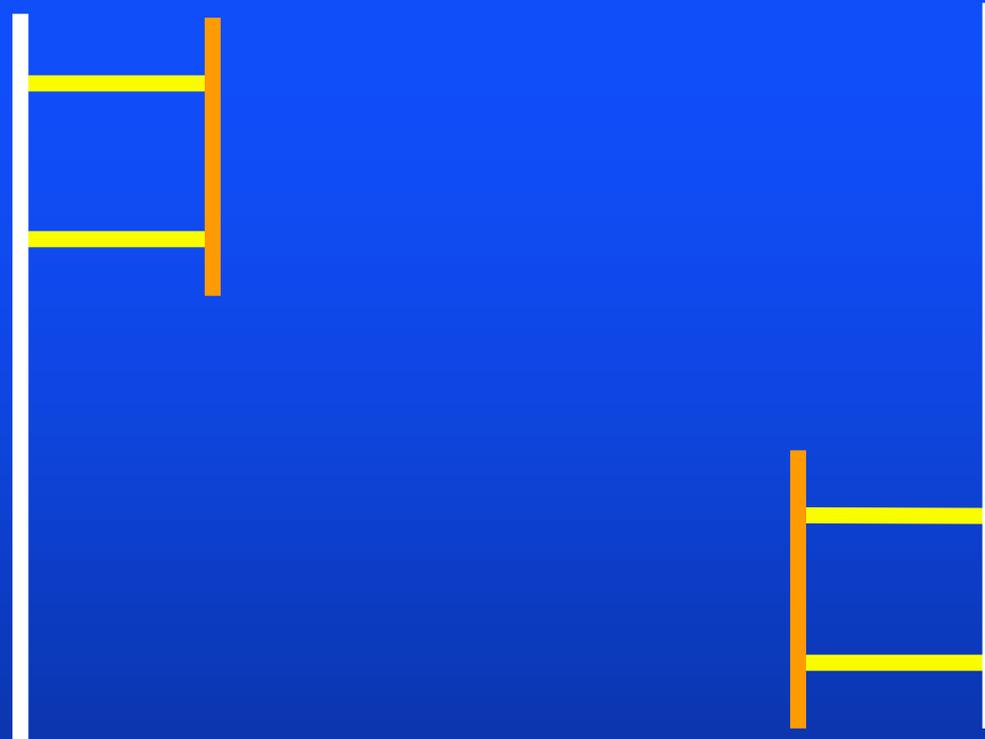
Durch Erhitzen werden die
Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den
DNA-Strängen gelöst.

2. Primer-Anlagerung 55-65 °C



Primer sind kurze Startermoleküle der PCR.
Sie sind spezifisch für einen bestimmten Erreger und ...

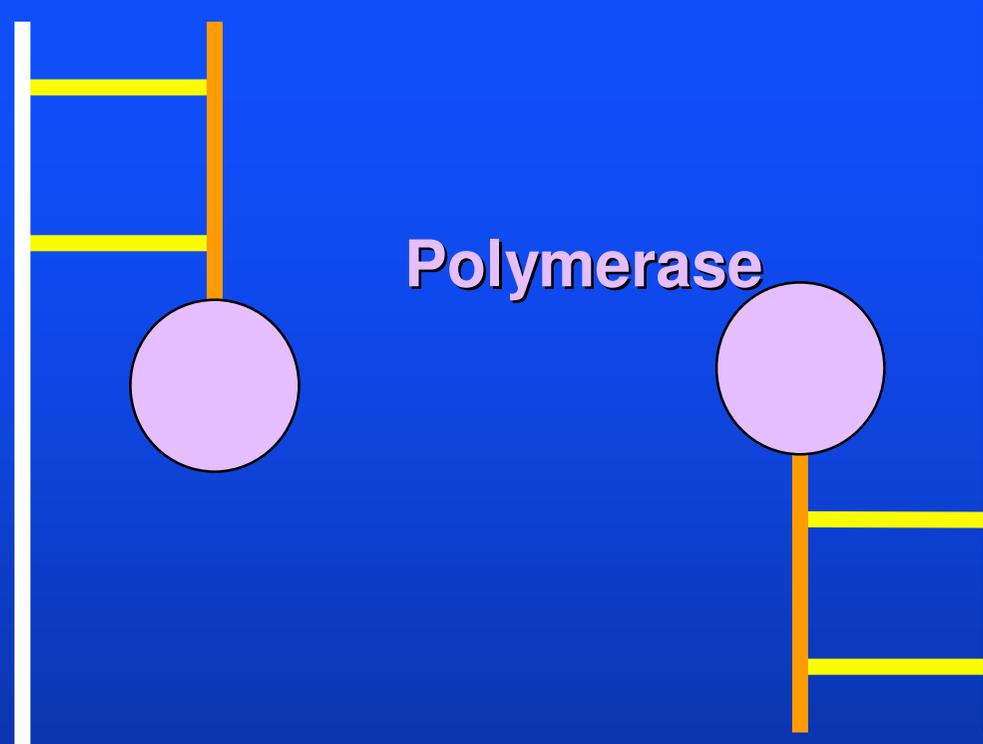
2. Primer-Anlagerung 55-65 °C



... lagern sich bei einer bestimmten Temperatur an definierte Bereiche der DNA-Einzelstränge an („Annealing“).

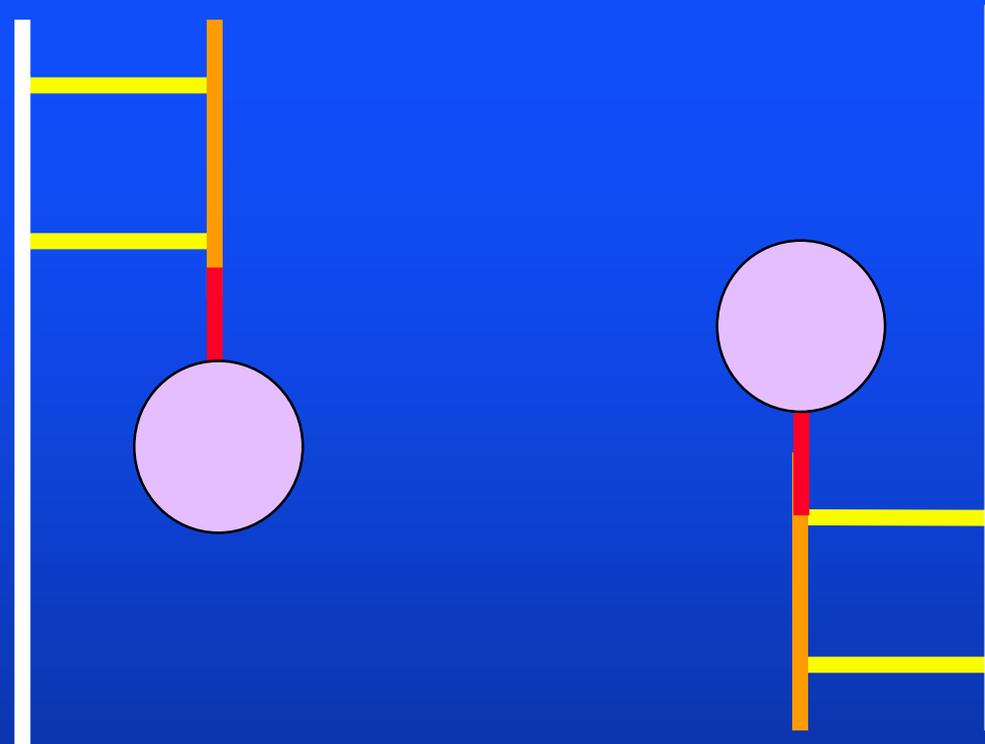
3. Polymerisation

72 °C



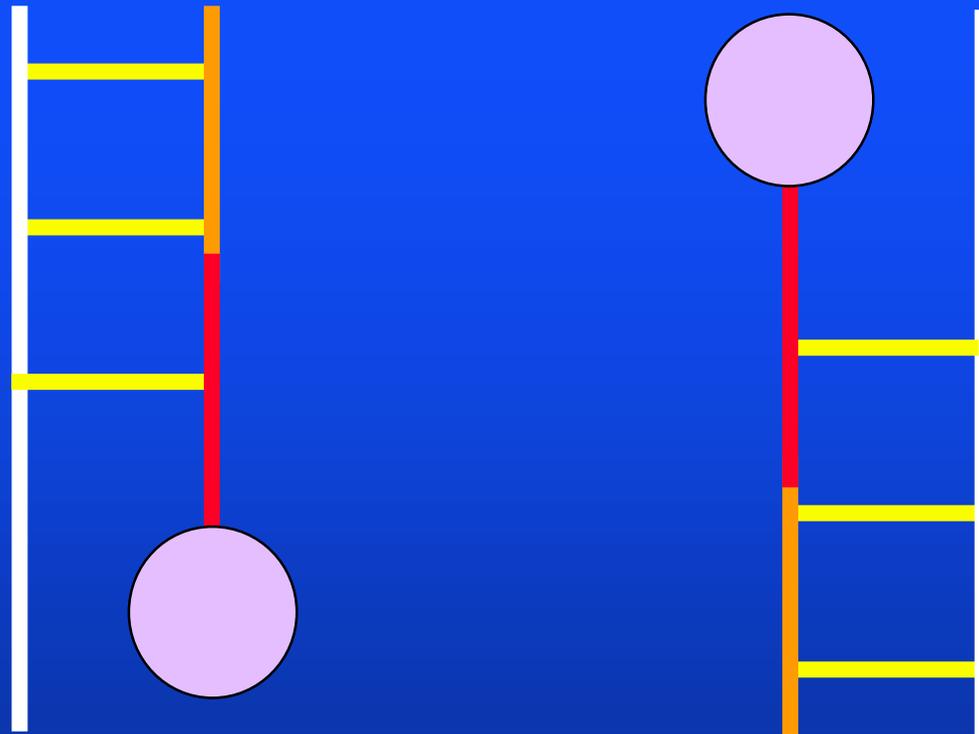
Ein Enzym, die sog. Polymerase, setzt an den **Primern (Startermoleküle)** an und ...

3. Polymerisation 72 °C



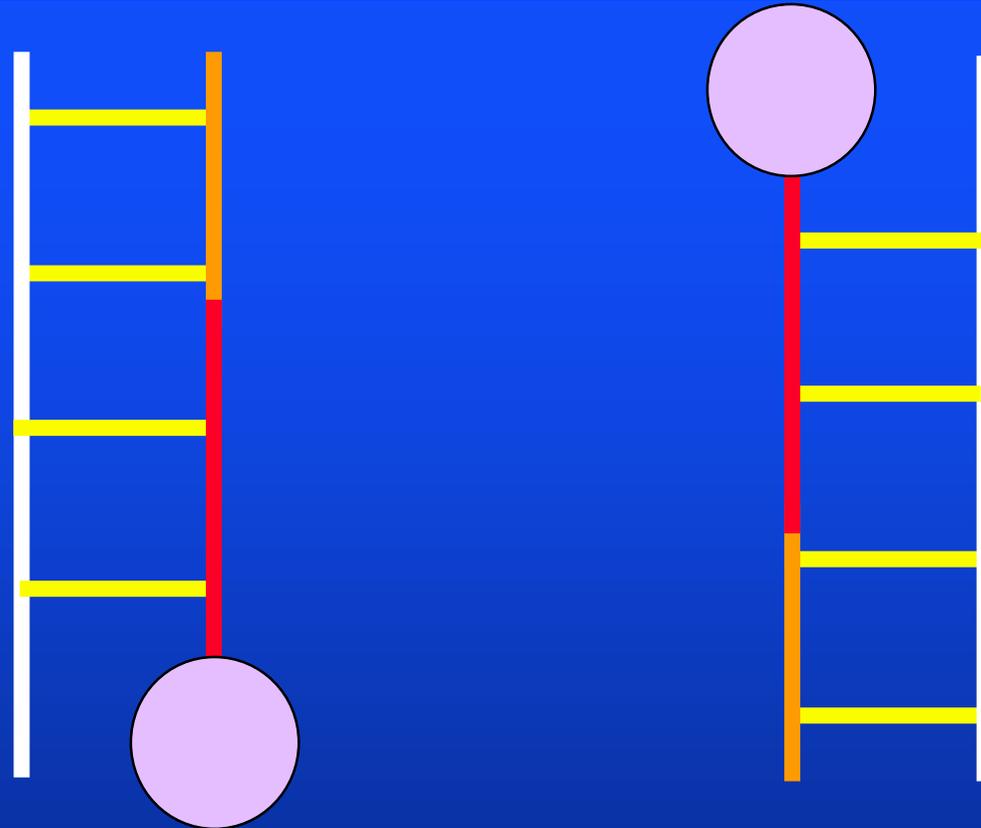
... und **verlängert** die **Primer**.

3. Polymerisation 72 °C



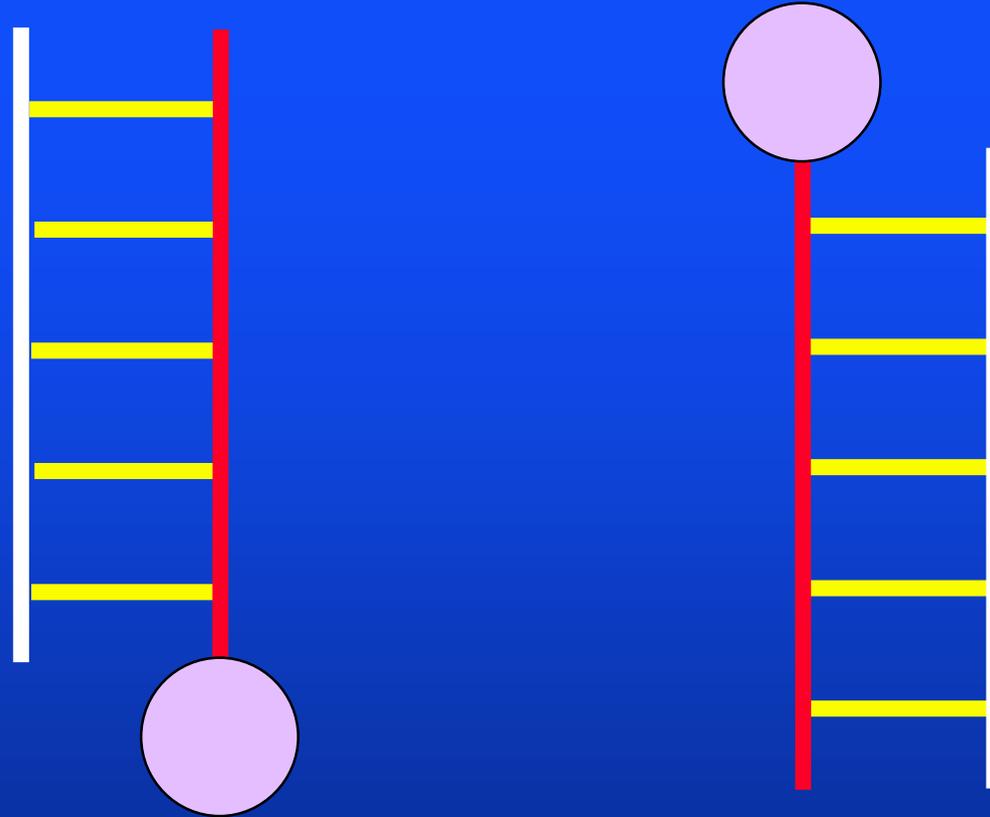
Dadurch entstehen **neue DNA-Stränge**, ...

3. Polymerisation 72 °C



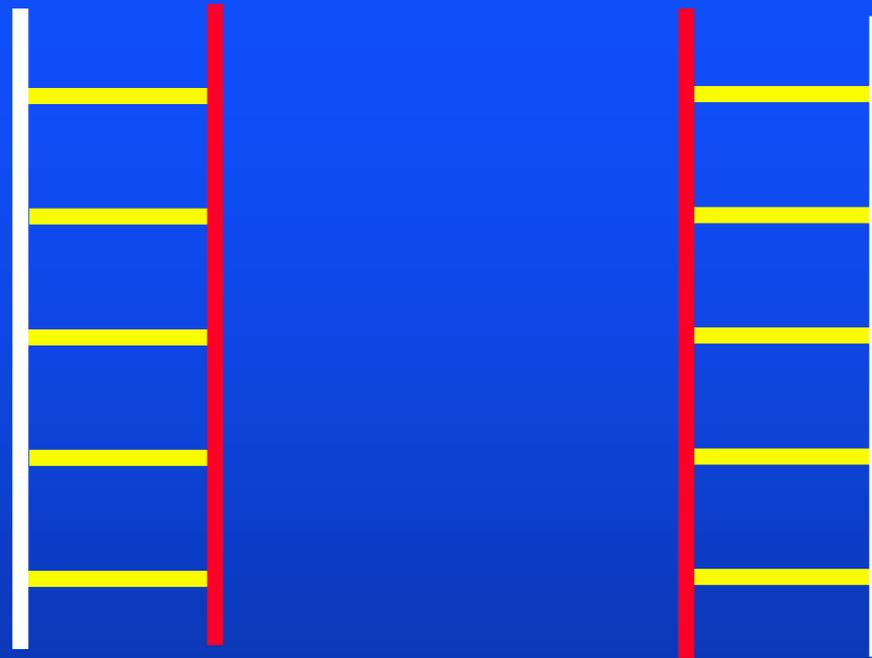
Dadurch entstehen **neue DNA-Stränge**, ...

3. Polymerisation 72 °C



... die exakte **Kopien** der ursprünglichen DNA sind.

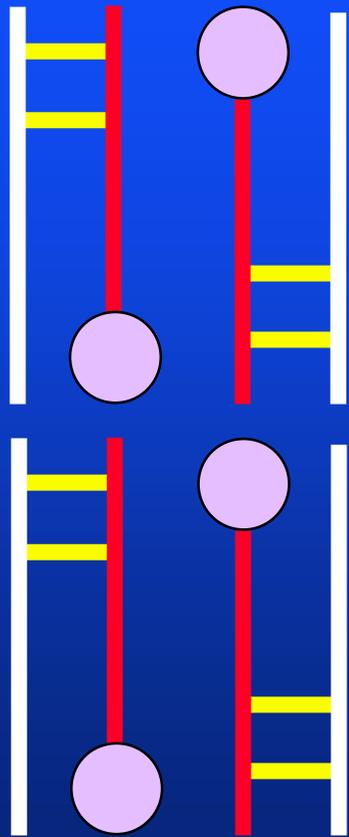
Nach dem 1. Zyklus



Nach dem 1. Zyklus hat sich die Anzahl der DNA-Stränge verdoppelt.

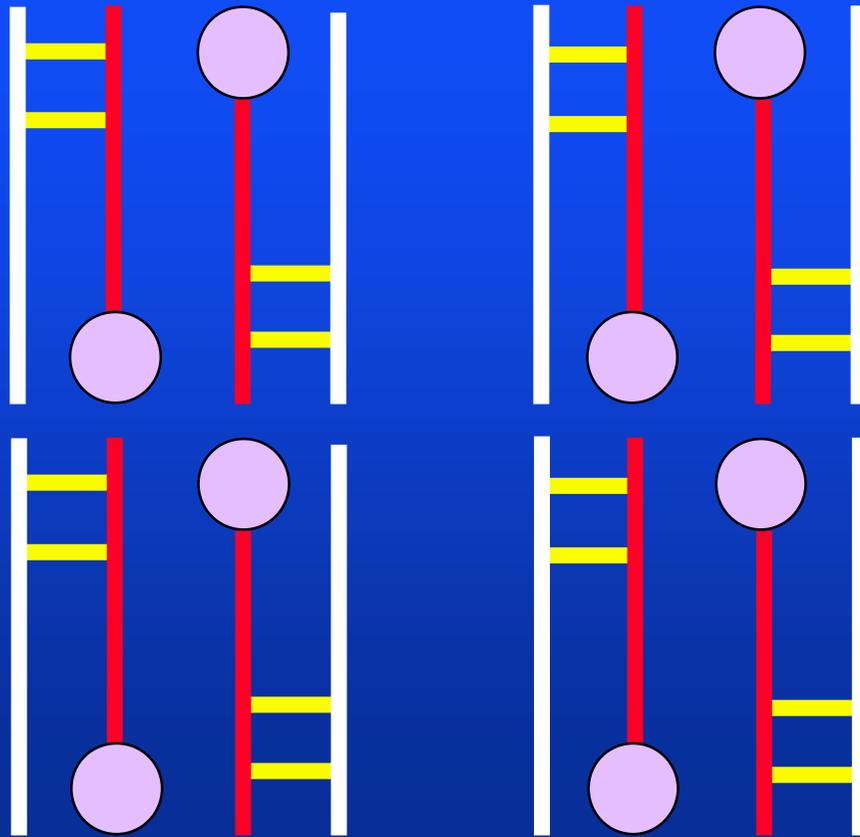
| alter DNA-Strang | neuer DNA-Strang

1. Wiederholung der Einzelschritte



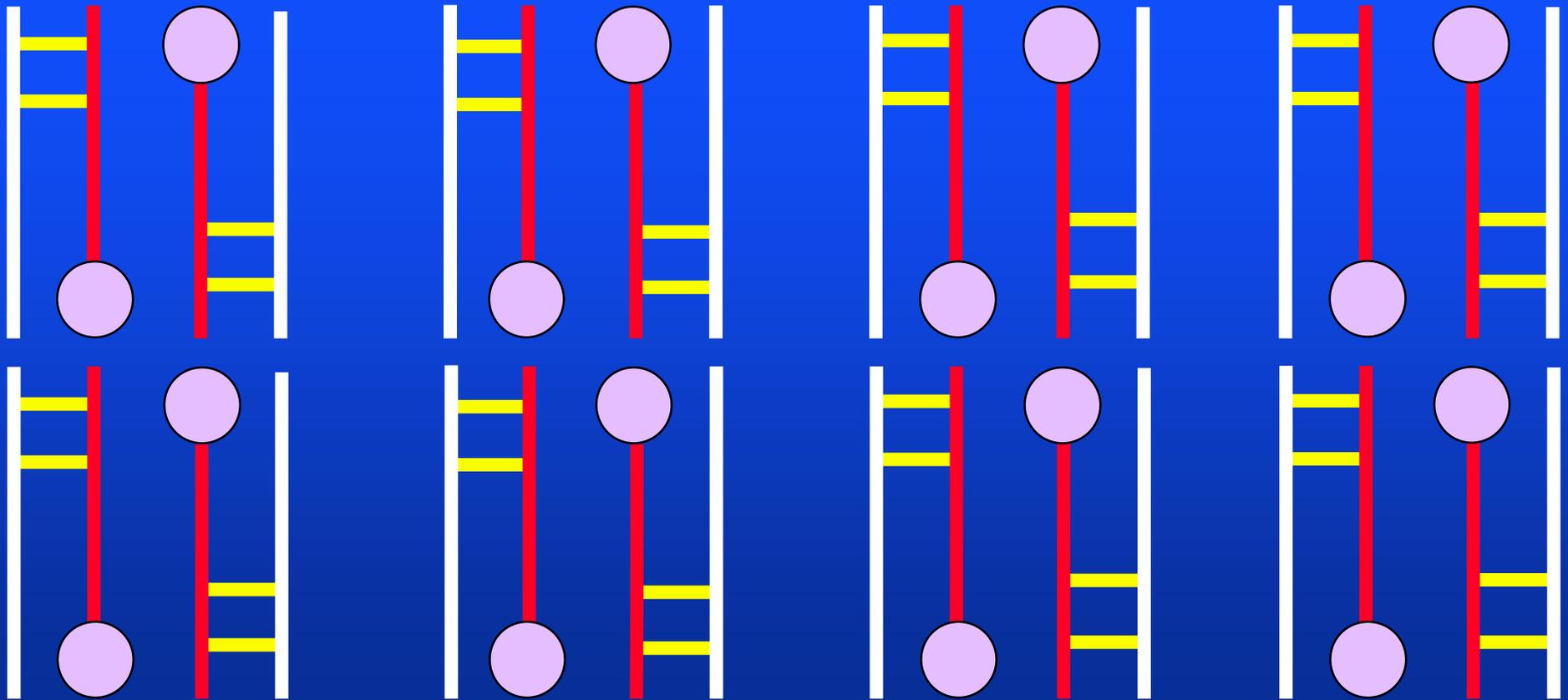
2. Zyklus

2. Wiederholung der Einzelschritte



3. Zyklus

**30-50(n)-malige Wiederholung der
Einzelschritte
= *Polymerase-Kettenreaktion***

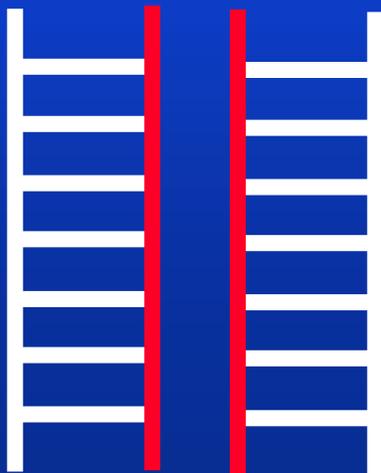
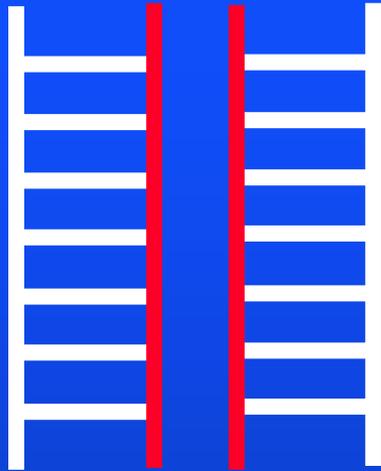


Nach dem 1. Zyklus



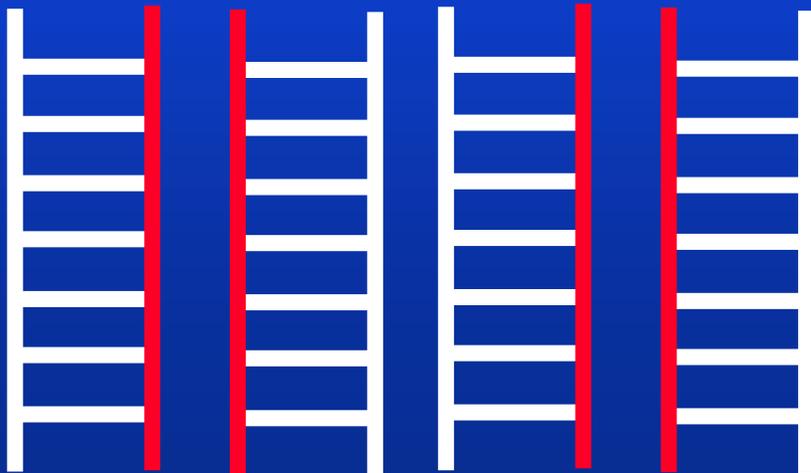
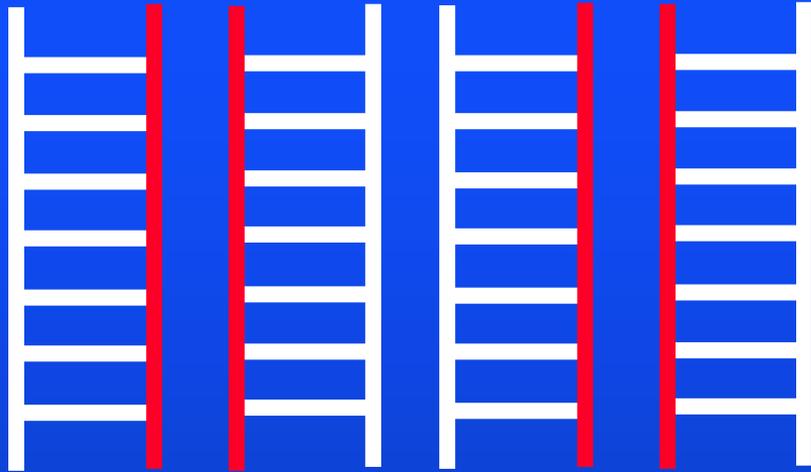
2 DNA-Doppelstränge

Nach 2. Zyklus



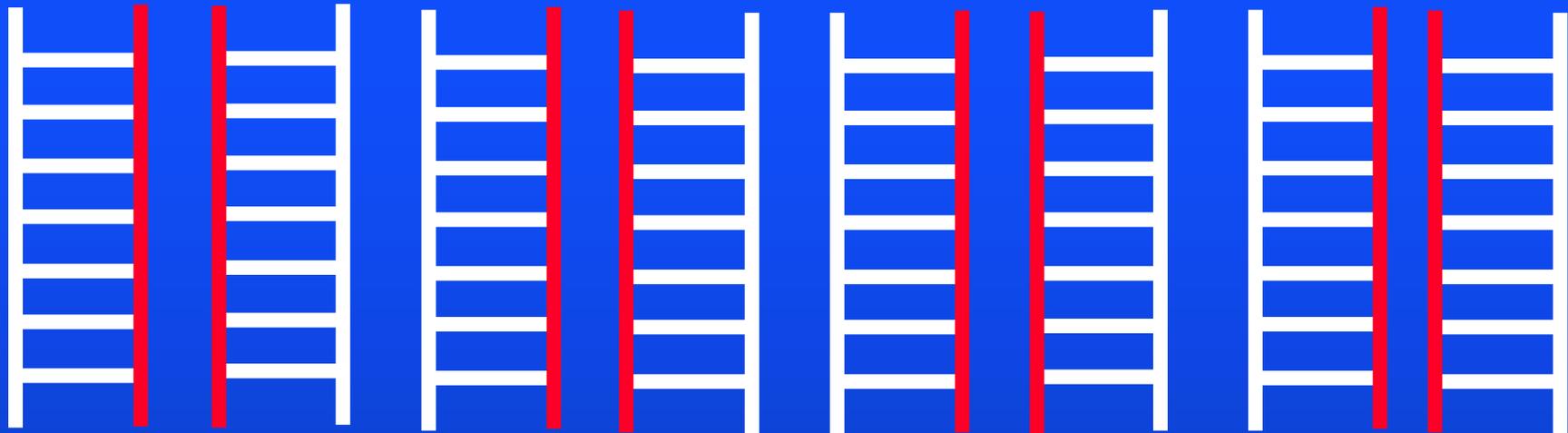
4 DNA-Doppelstränge

Nach 3. Zyklus

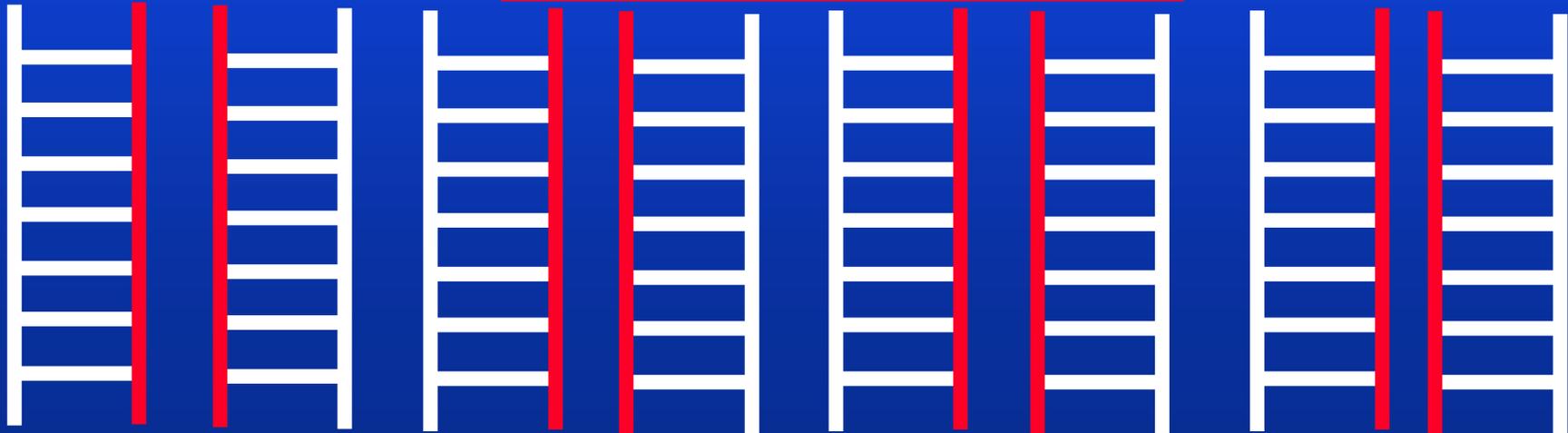


8 DNA-Doppelstränge

Nach dem n-ten Zyklus



2ⁿ DNA-Doppelstränge



Durch die vielfache Wiederholung der einzelnen Teilschritte sind durch die

Polymerase-Kettenreaktion

so viele DNA-Stränge gebildet worden,

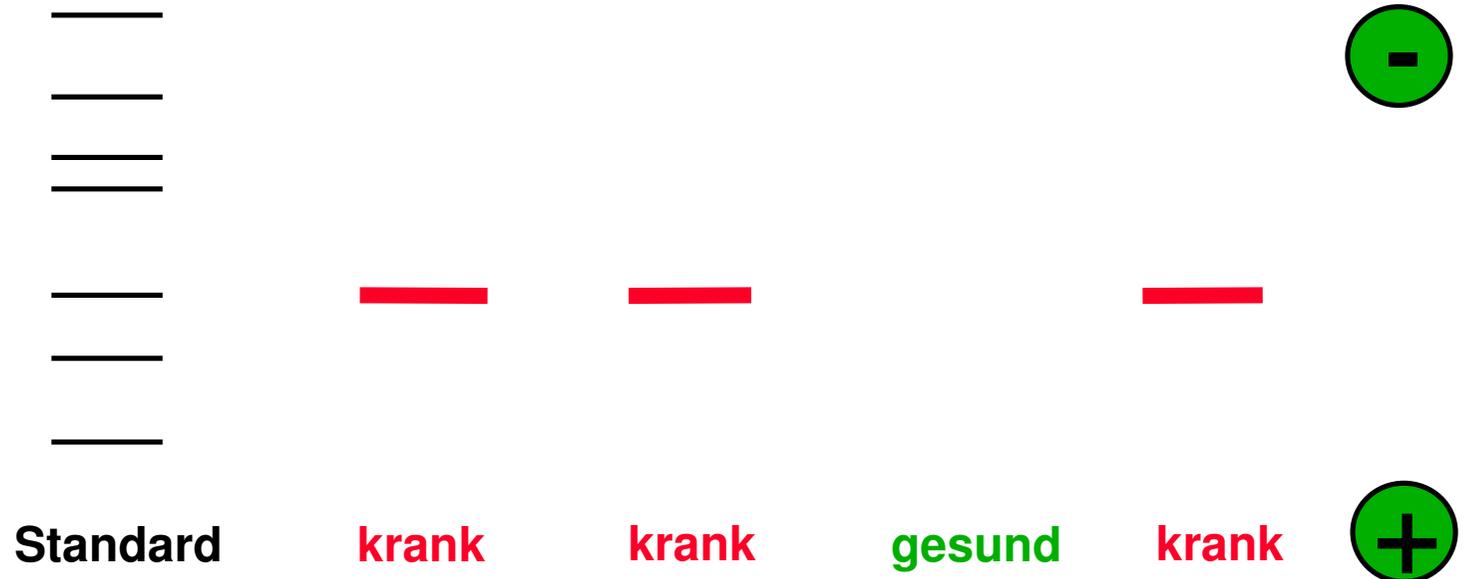
dass sie über

Gelelektrophorese

nachgewiesen werden können.

Bei Auftreten der
erregerspezifischen Bande
auf dem Elektrophoresegel ist der
Erreger nachgewiesen.

Schema eines Elektrophoresegels



Digitales Bild eines Elektrophoresegels

