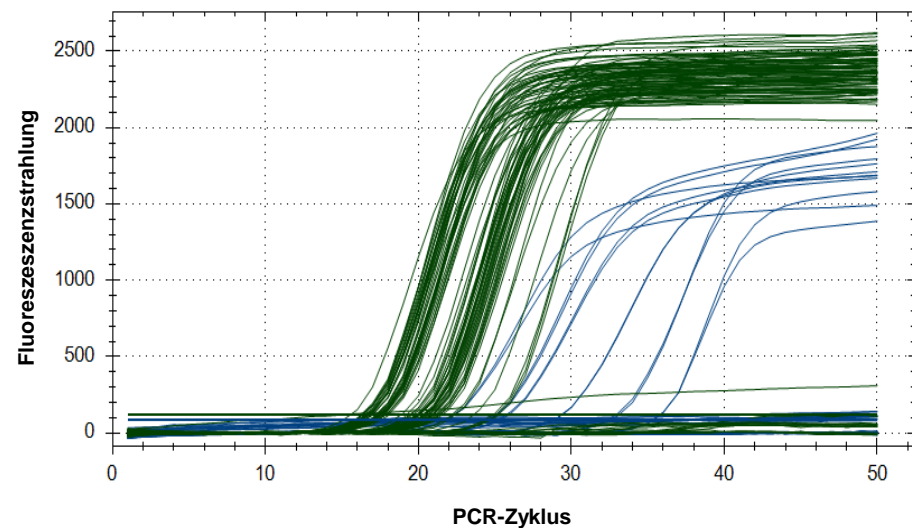
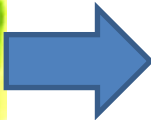
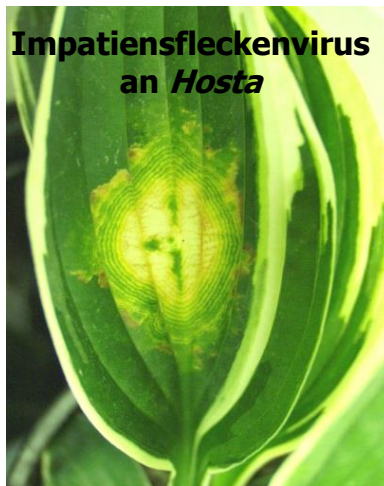


Real-time PCR

Die Real-Time PCR wird in vielen Bereichen der Forschung und Diagnose eingesetzt.

Bei der Real-Time PCR wird die Erbsubstanz (DNA oder RNA) eines Erregers nachgewiesen.

Sie ist an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) eine Routinemethode beim Nachweis von Pflanzenkrankheiten.

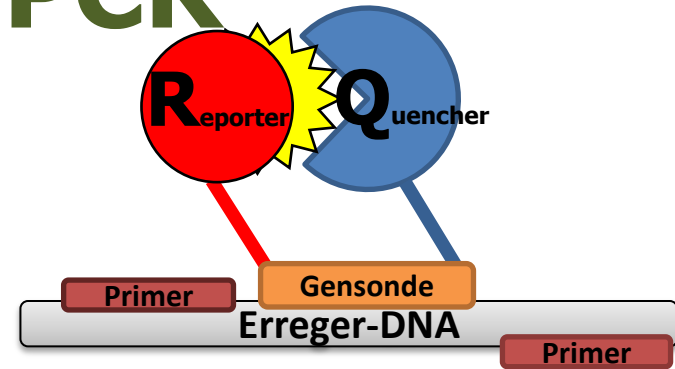


Real-time PCR

In aller Kürze

Erregerspezifische Taqman®-Gensonde und Primer (PCR-Starter) binden gezielt an einen bestimmten Bereich der DNA des nachzuweisenden Schaderregers.

Die Gensonde trägt einen fluoreszierenden „Reporterfarbstoff“ und einen „Quencher“, der zunächst, bedingt durch die räumliche Nähe, die Strahlung des Reporters abfängt.



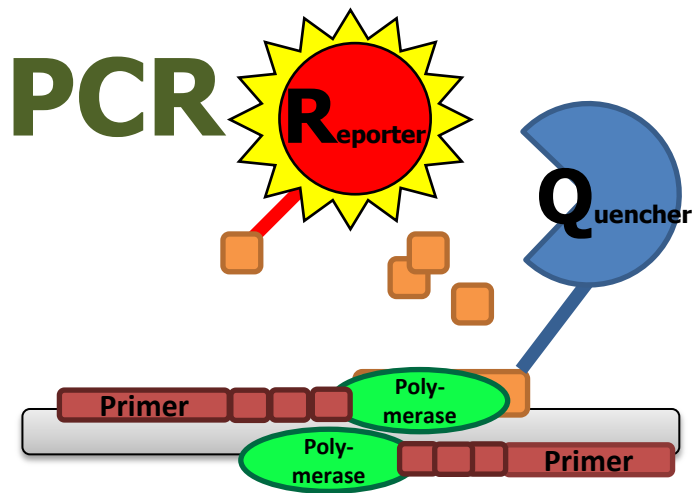
Real-time PCR

In aller Kürze

Erregerspezifische Taqman®-Gensonde und Primer (PCR-Starter) binden gezielt an einen bestimmten Bereich der DNA des nachzuweisenden Schaderregers.

Die Gensonde trägt einen fluoreszierenden „Reporterfarbstoff“ und einen „Quencher“, der zunächst, bedingt durch die räumliche Nähe, die Strahlung des Reporters abfängt.

Dann setzt das Enzym Polymerase an den Primern an und fügt DNA-Bausteine an. Dabei wird gleichzeitig die Gensonde nach und nach abgebaut. Der Reporter wird dabei vom Quencher getrennt: Der Quencher kann die Strahlung des Reporters nicht mehr abfangen → Fluoreszenzstrahlung wird frei.



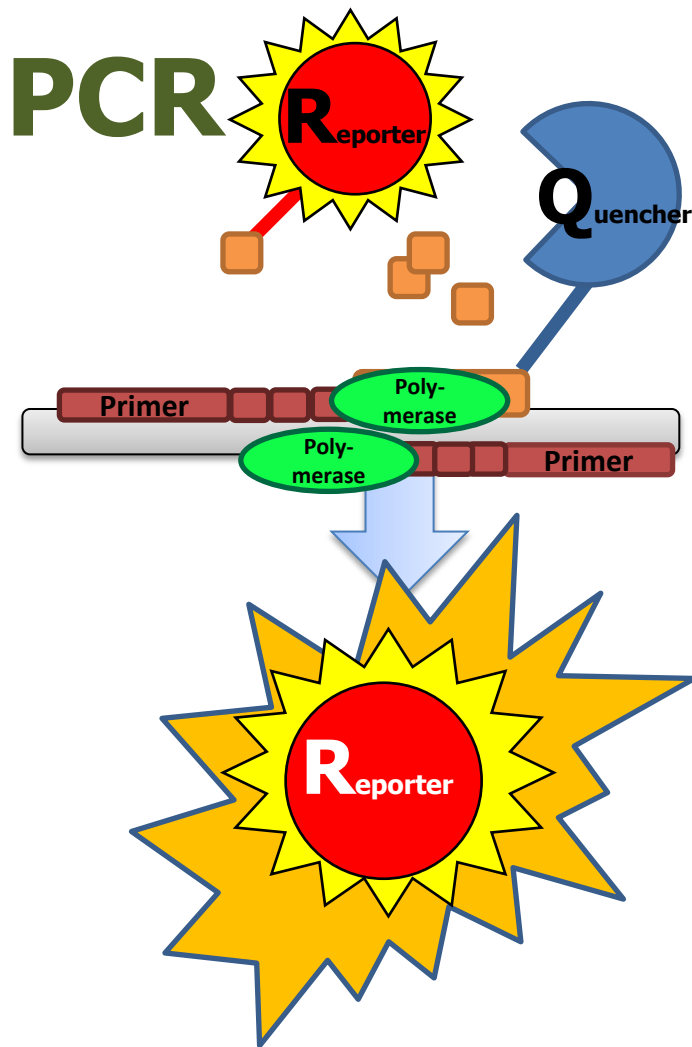
Real-time PCR

In aller Kürze

Erregerspezifische Taqman®-Gensonde und Primer (PCR-Starter) binden gezielt an einen bestimmten Bereich der DNA des nachzuweisenden Schaderregers.

Die Gensonde trägt einen fluoreszierenden „Reporterfarbstoff“ und einen „Quencher“, der zunächst, bedingt durch die räumliche Nähe, die Strahlung des Reporters abfängt.

Dann setzt das Enzym Polymerase an den Primern an und fügt DNA-Bausteine an. Dabei wird gleichzeitig die Gensonde nach und nach abgebaut. Der Reporter wird dabei vom Quencher getrennt: Der Quencher kann die Strahlung des Reporters nicht mehr abfangen → Fluoreszenzstrahlung wird frei.



Real-time PCR

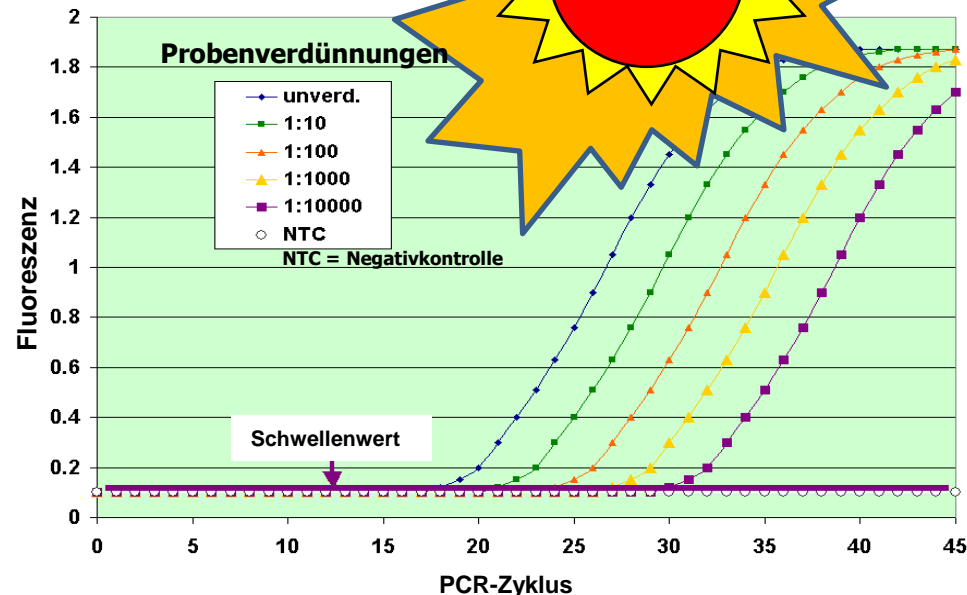
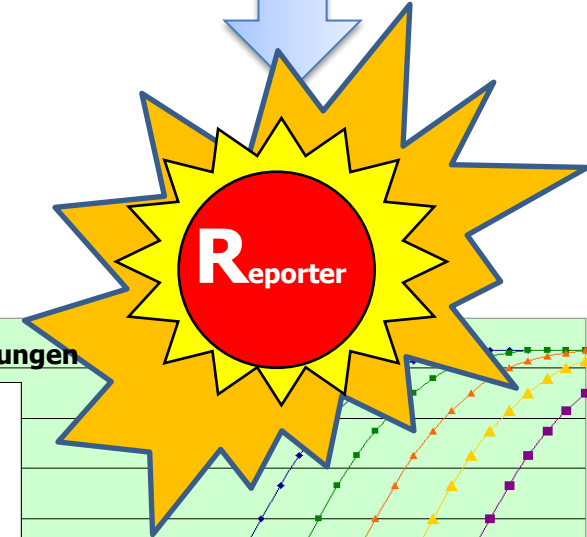
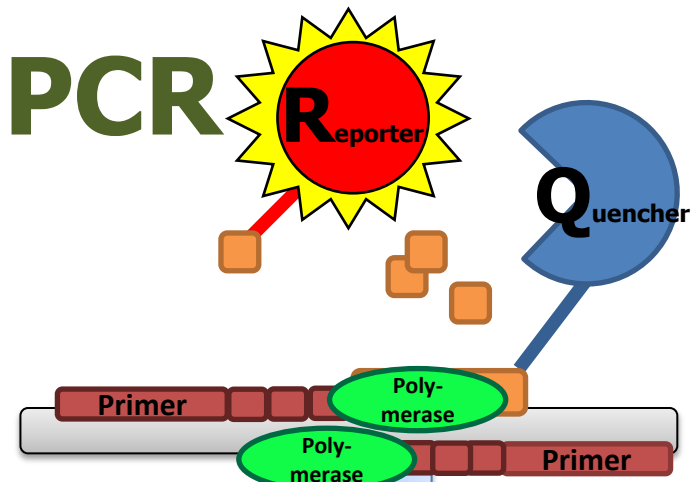
In aller Kürze

Erregerspezifische Taqman®-Gensonde und Primer (PCR-Starter) binden gezielt an einen bestimmten Bereich der DNA des nachzuweisenden Schaderregers.

Die Gensonde trägt einen fluoreszierenden „Reporterfarbstoff“ und einen „Quencher“, der zunächst, bedingt durch die räumliche Nähe, die Strahlung des Reporters abfängt.

Dann setzt das Enzym Polymerase an den Primern an und fügt DNA-Bausteine an. Dabei wird gleichzeitig die Gensonde nach und nach abgebaut. Der Reporter wird dabei vom Quencher getrennt: Der Quencher kann die Strahlung des Reporters nicht mehr abfangen → Fluoreszenzstrahlung wird frei.

Die Fluoreszenzstrahlung zeigt die Anwesenheit des Schaderregers an. Je früher die Strahlung messbar ist, desto höher ist die Schaderregerkonzentration in der Probe. Die Freisetzung der Strahlung wird in „Echtzeit“ („Real-Time“) verfolgt, über eine spezielle Geräteausstattung und Software gemessen und aufgezeichnet.



Real-time PCR

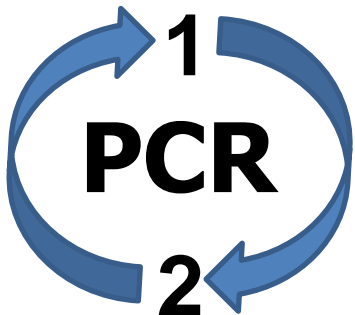
Ablauf

Die TaqMan®-Real-time PCR erfolgt meist in 2 Schritten, die 30 bis 45 Mal wiederholt werden.

- 1) Denaturierung bei ca. 95 °C: Die beiden DNA-Stränge werden voneinander getrennt.
- 2) Anheften (= Annealing) von Primern und Gensonde an den erregerspezifischen DNA-Bereich und Kopieren dieses Bereichs durch das Enzym „Polymerase“ bei ca. 60 °C. Am Ende von Schritt 2 liegt eine Verdopplung der Zahl der ursprünglich vorhandenen DNA-Abschnitte vor.

Durch das Wiederholen von Schritt 1 und 2 (= „Polymerase-Kettenreaktion“, PCR) kommt es zur millionenfachen Vermehrung der erregertypischen DNA-Abschnitte.

Da im Idealfall bei jeder Wiederholung eines PCR-Zyklus eine Verdoppelung der DNA-Abschnitte stattfindet, kommt es im Idealfall nach 30-45 Wiederholungen zu einer 2^{30} bis 2^{45} -fachen Anreicherung der ursprünglich vorhandenen DNA-Abschnitte.



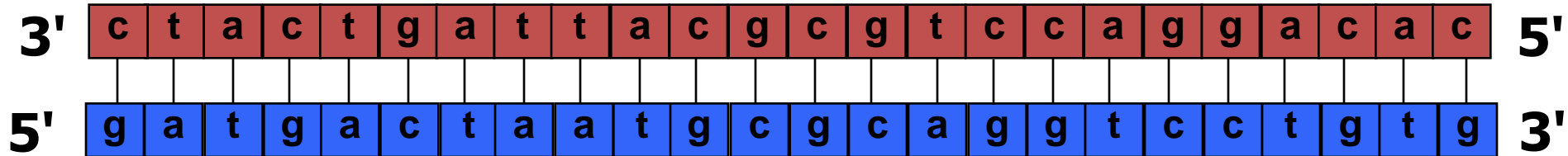
Real-time PCR

Schematische Darstellung

Vor der PCR

DNA-Doppelstrang

Zusammenhalt durch
Wasserstoffbrückenbindungen



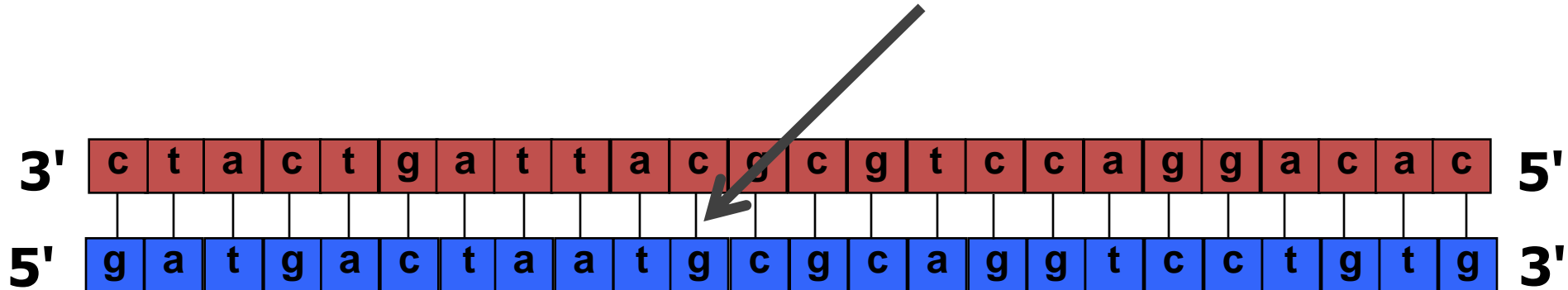
Real-time PCR

Schematische Darstellung

Vor der PCR

DNA-Doppelstrang

Zusammenhalt durch
Wasserstoffbrückenbindungen



Real-time PCR

Denaturierung
95 °C

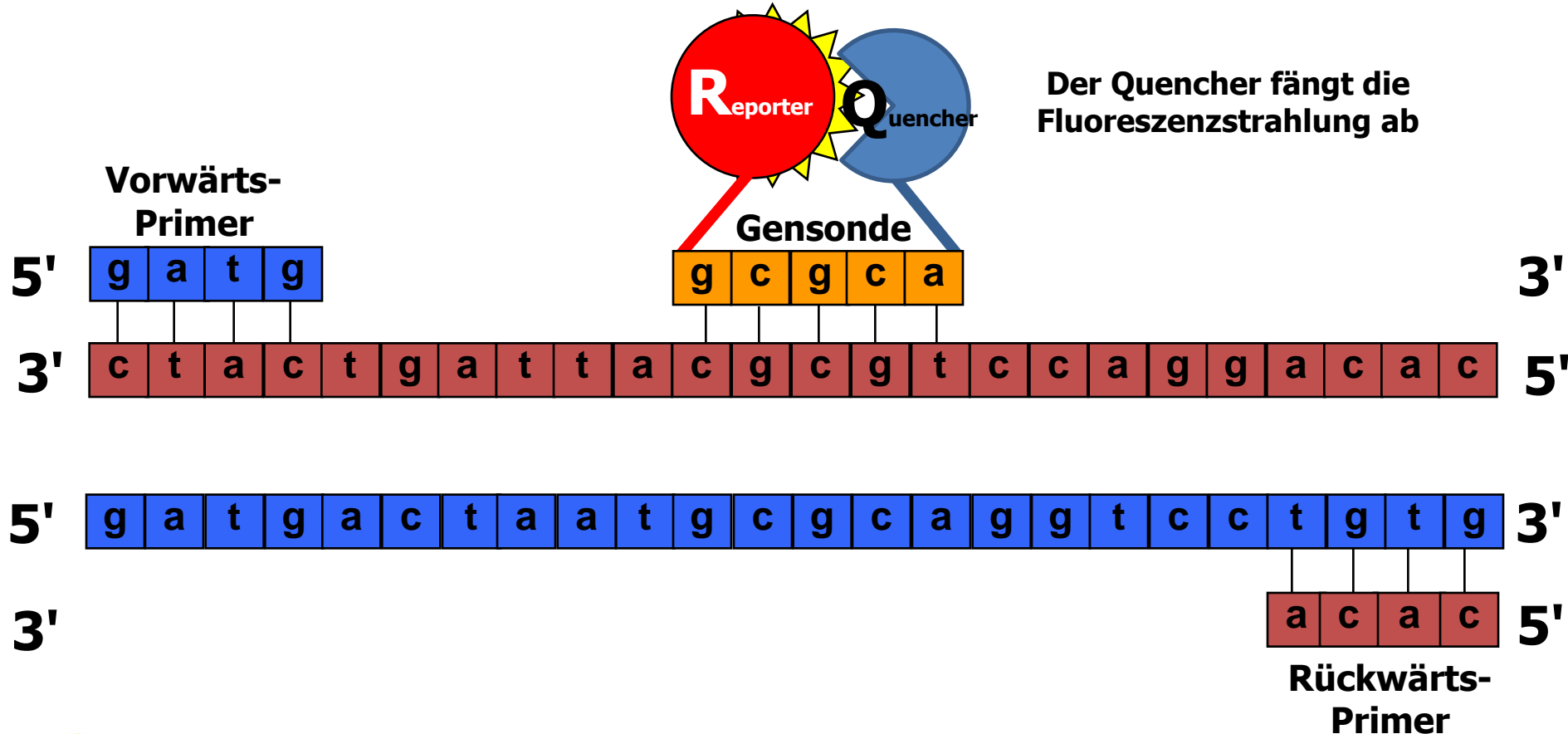
Durch Hitzeeinwirkung lösen sich die
Wasserstoffbrückenbindungen
zwischen den beiden DNA-Strängen
→ die DNA-Stränge werden
voneinander getrennt

3' c t a c t g a t t a c g c g t c c a g g a c a c 5'

5' g a t g a c t a a t g c g c a g g t c c t g t g 3'

Real-time PCR

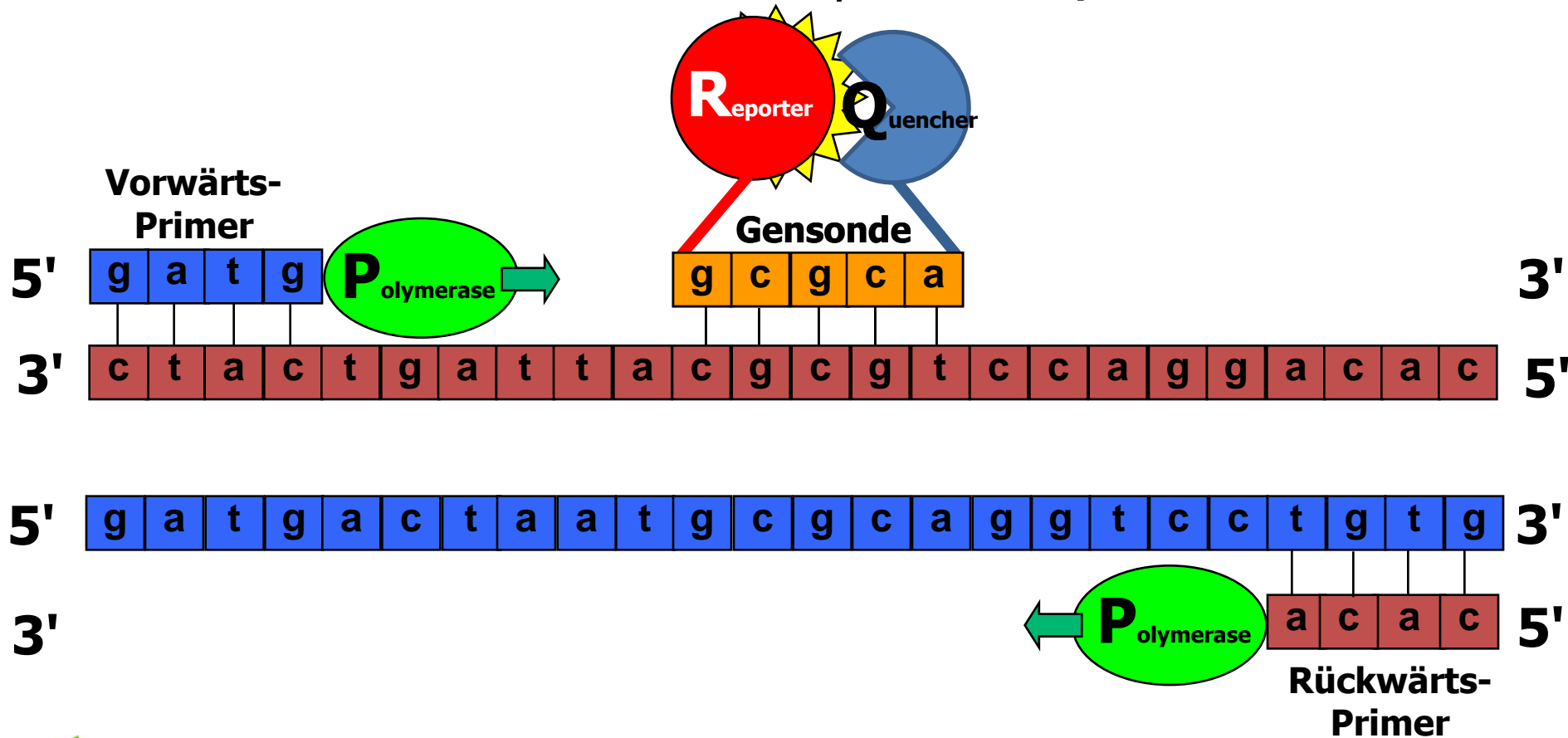
Die beiden Primer und die Gensonde lagern sich an erregerspezifische DNA-Bereiche, ca. 60 °C



Real-time PCR

DNA-Synthese

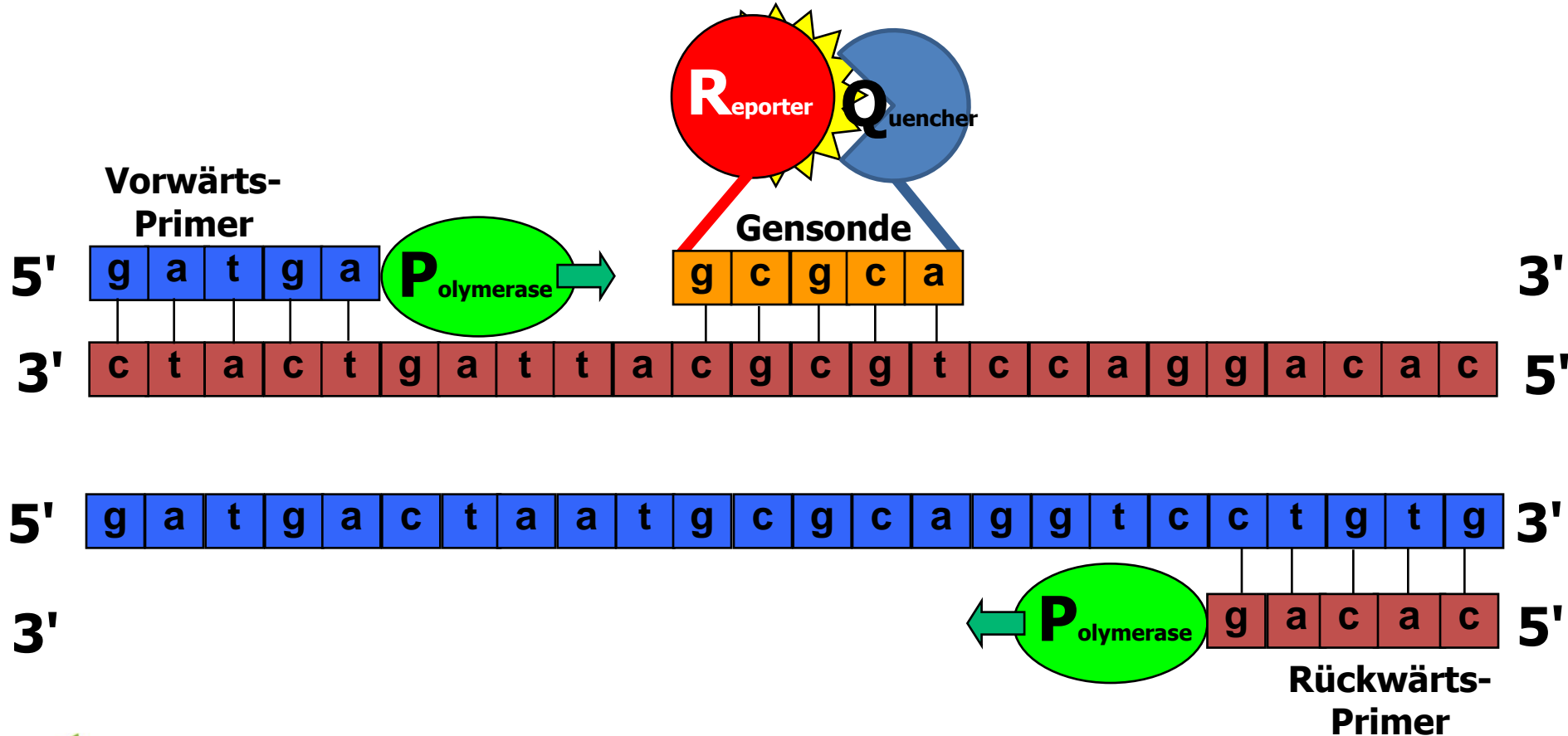
Die Polymerase setzt sich an die Primer und fügt DNA-Bausteine an, ca. 60 °C / 1 min



Real-time PCR

DNA-Synthese

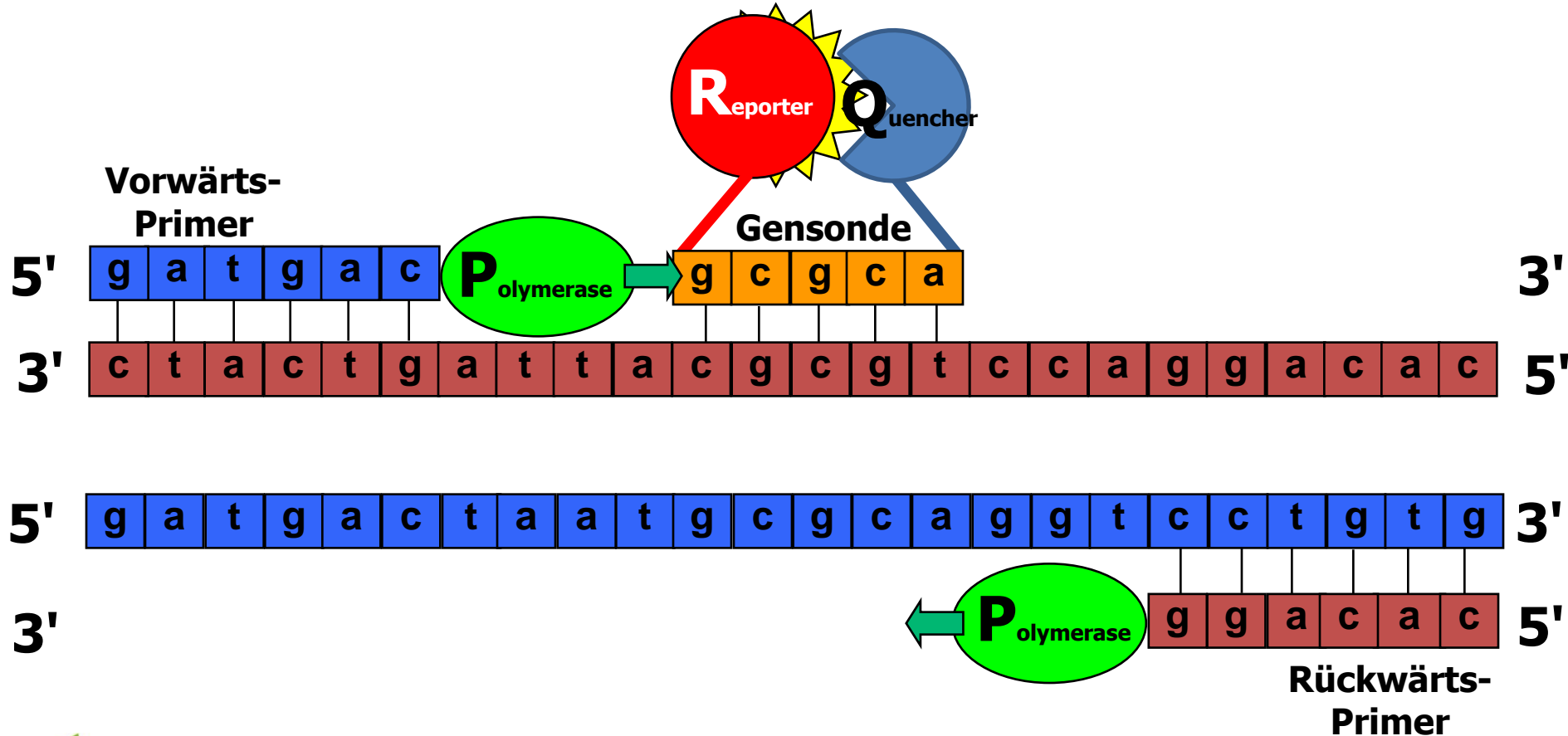
Die Polymerase setzt sich an die Primer und fügt DNA-Bausteine an, ca. 60 °C / 1 min



Real-time PCR

DNA-Synthese

Die Polymerase setzt sich an die Primer und fügt DNA-Bausteine an, ca. 60 °C / 1 min

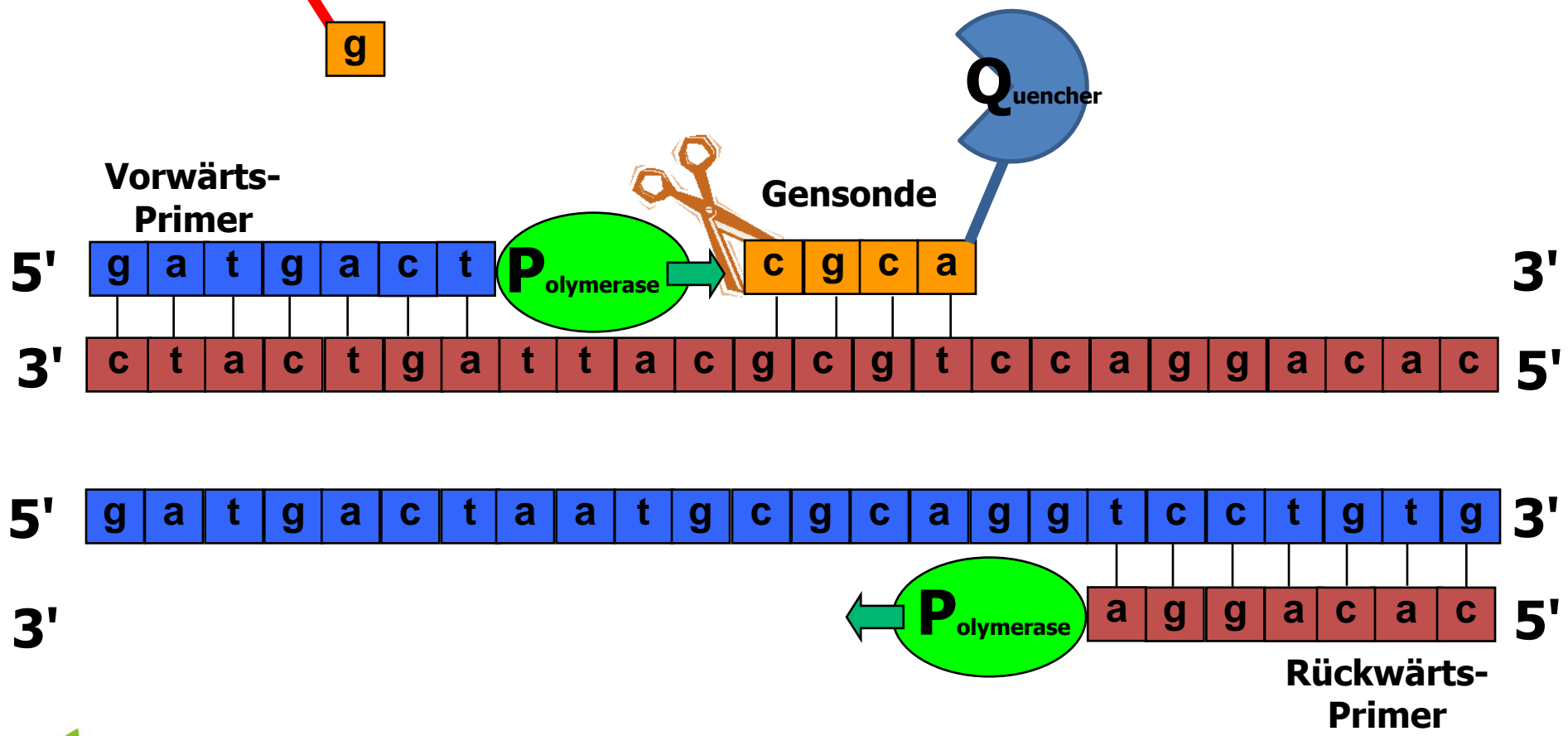


Fluoreszenzstrahlung = Messsignal



Real-time PCR

Die Gensonde wird abgebaut → Reporter und Quencher werden getrennt → Fluoreszenzstrahlung wird frei

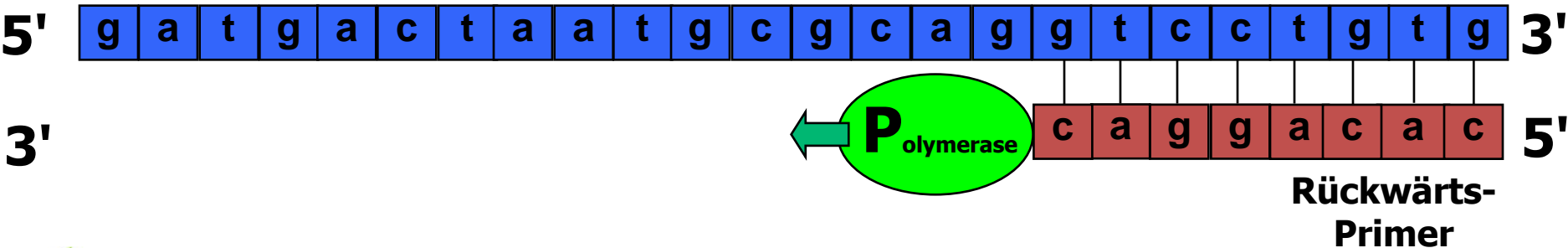
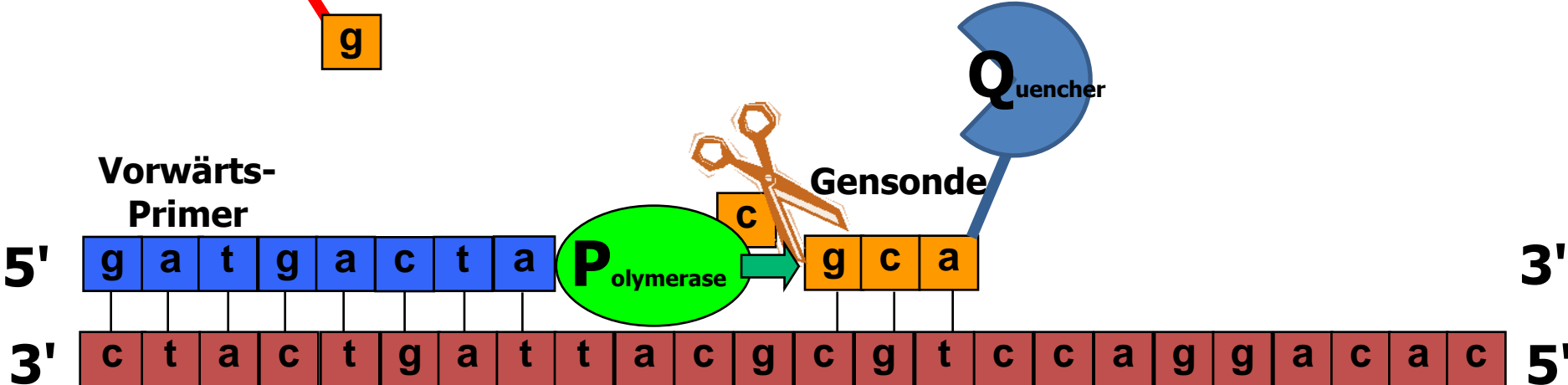


Fluoreszenzstrahlung = Messsignal



Real-time PCR

Die Gensonde wird abgebaut → Reporter und Quencher werden getrennt → Fluoreszenzstrahlung wird frei

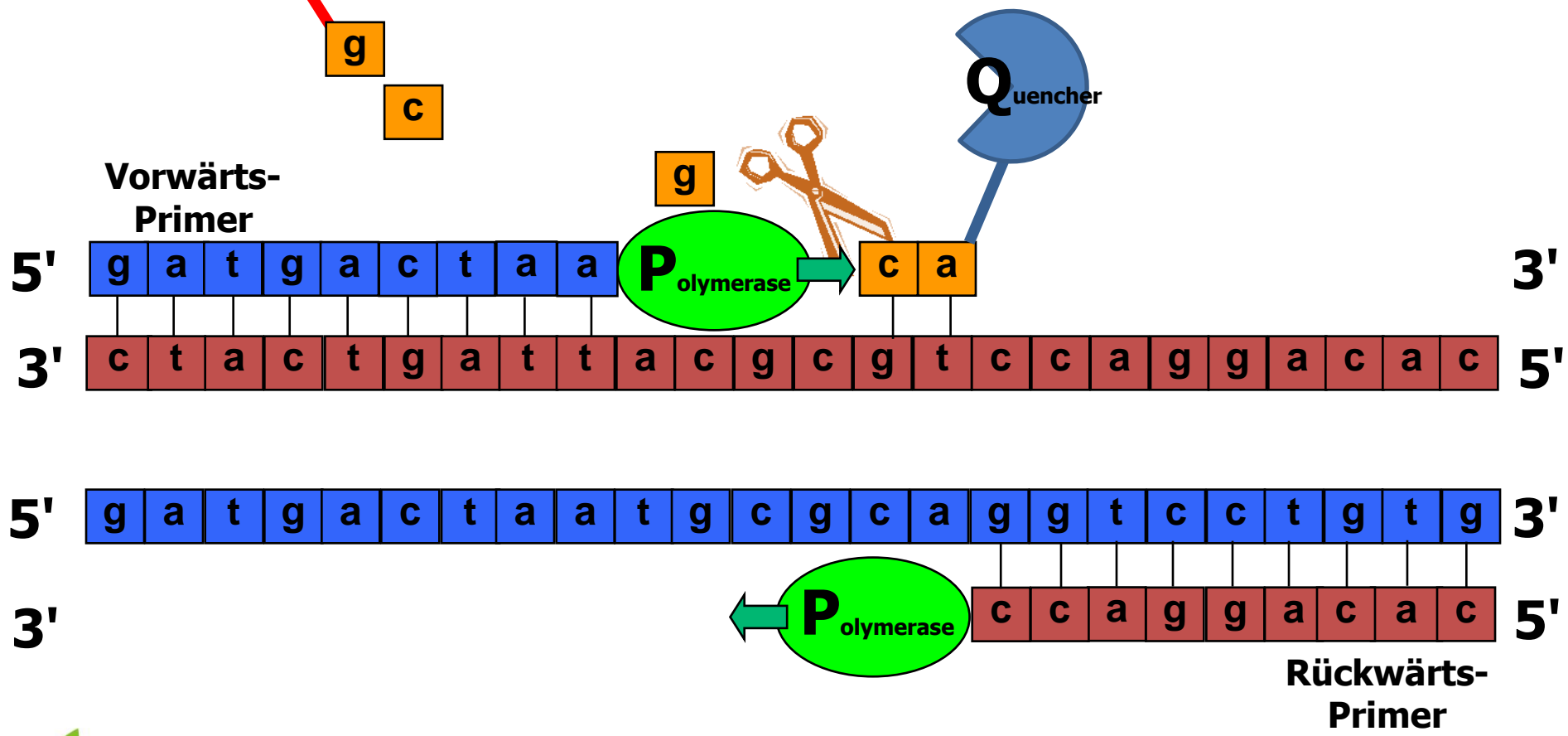


Fluoreszenzstrahlung = Messsignal



Real-time PCR

Die Gensonde wird abgebaut → Reporter und Quencher werden getrennt → Fluoreszenzstrahlung wird frei

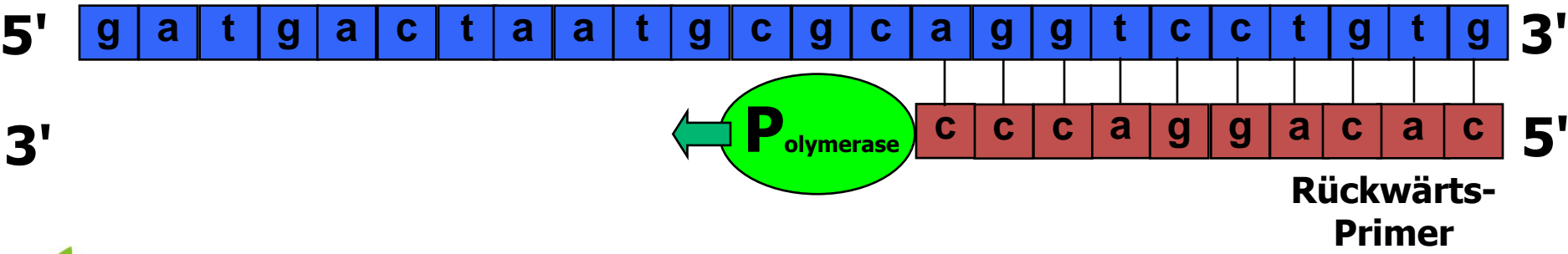
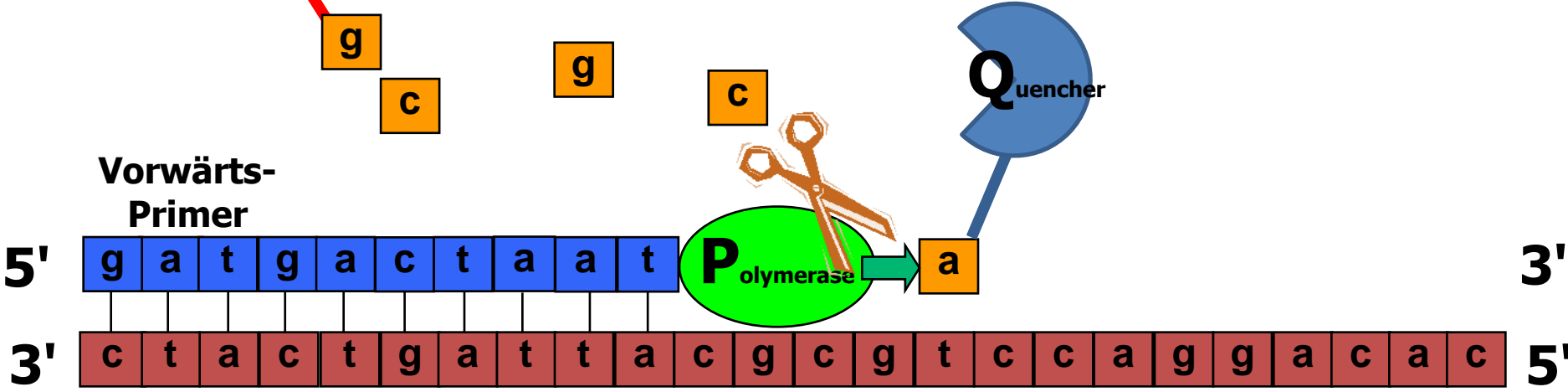


Fluoreszenzstrahlung = Messsignal



Real-time PCR

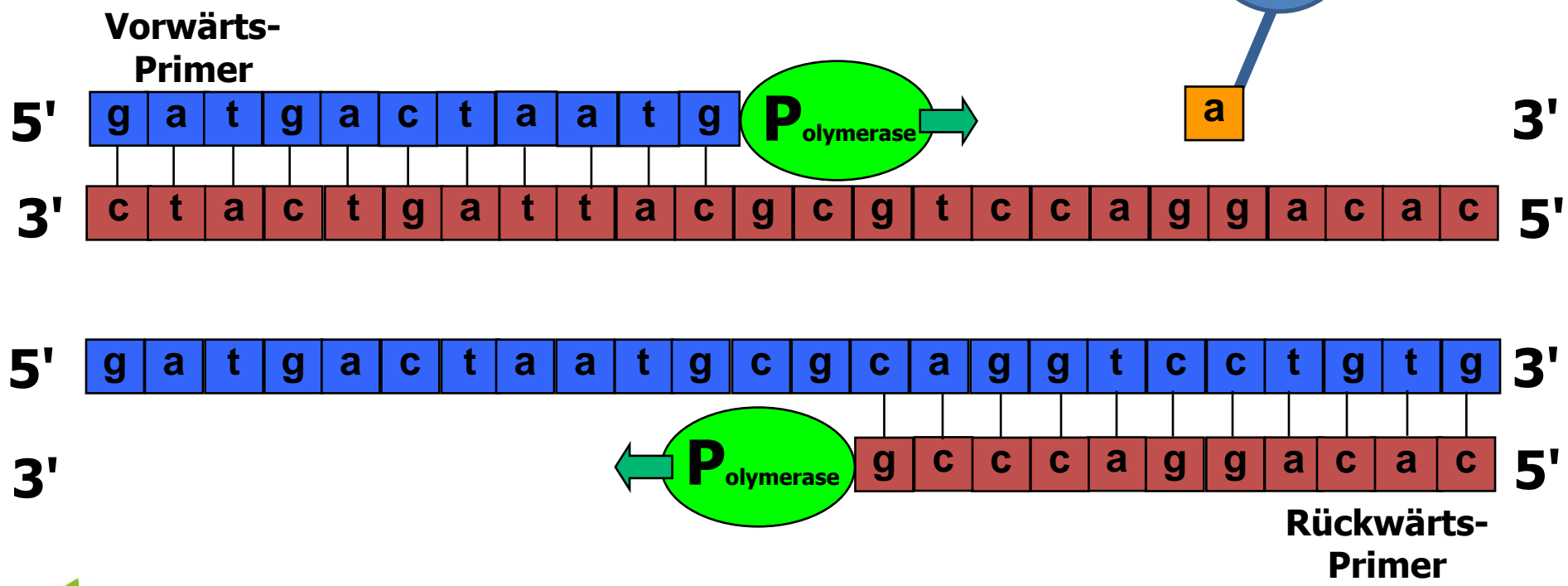
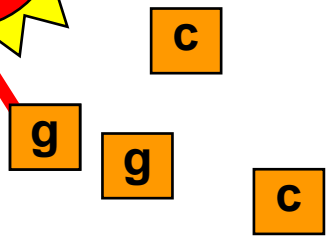
Die Gensonde wird abgebaut → Reporter und Quencher werden getrennt → Fluoreszenzstrahlung wird frei



Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

Real-time PCR

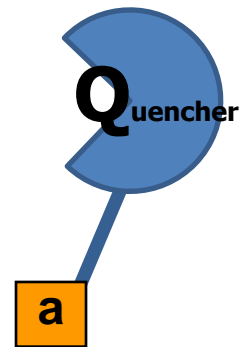
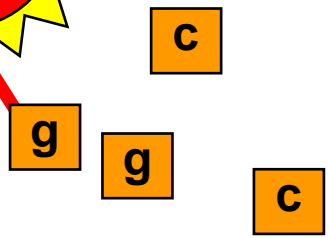
Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



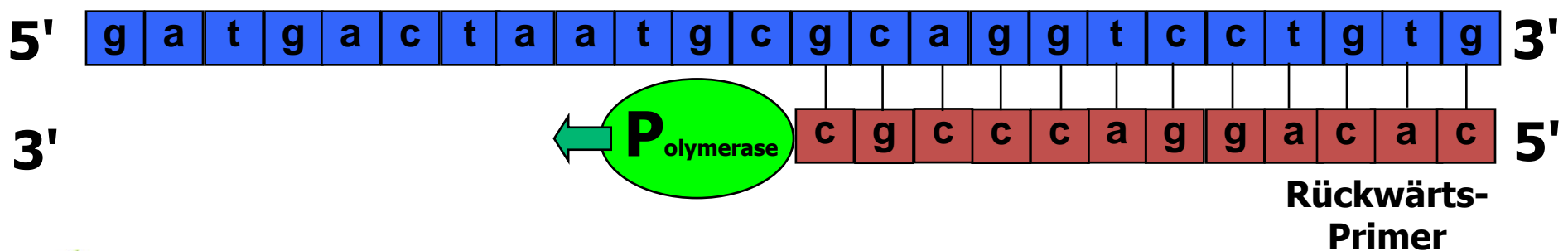
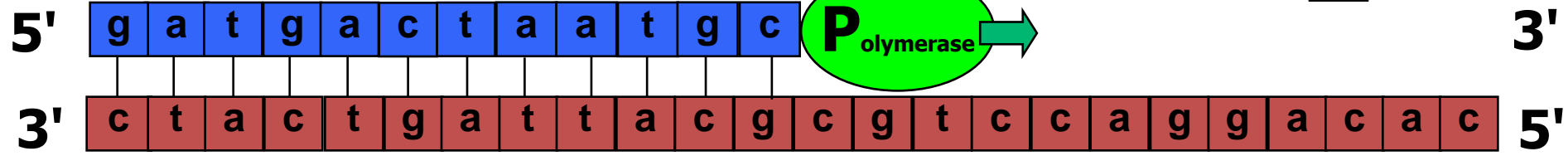
Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

Real-time PCR

Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



Vorwärts-Primer



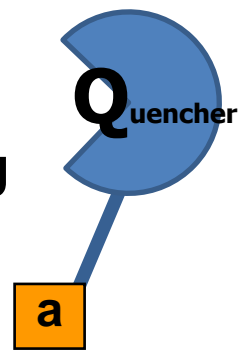
Rückwärts-Primer

Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

Real-time PCR



Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



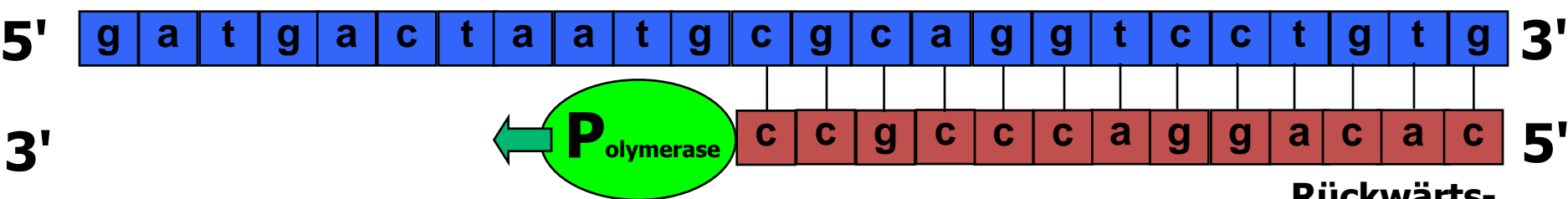
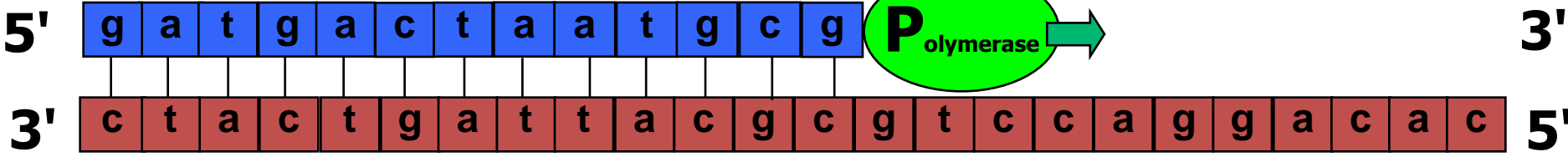
c

g

g

c

Vorwärts-Primer



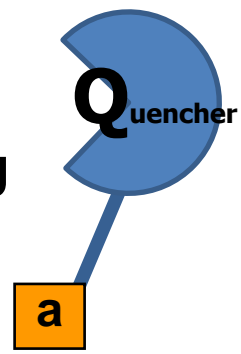
Rückwärts-Primer

Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

Real-time PCR



Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



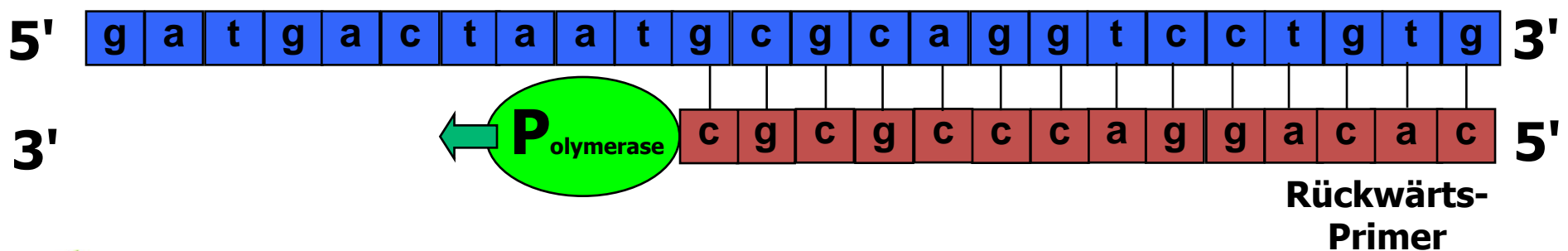
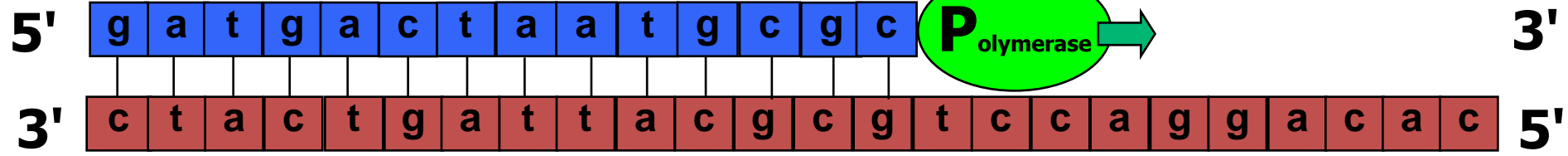
c

g

g

c

Vorwärts-Primer

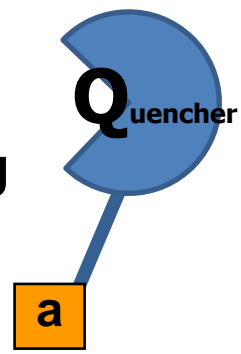


Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

Real-time PCR



Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



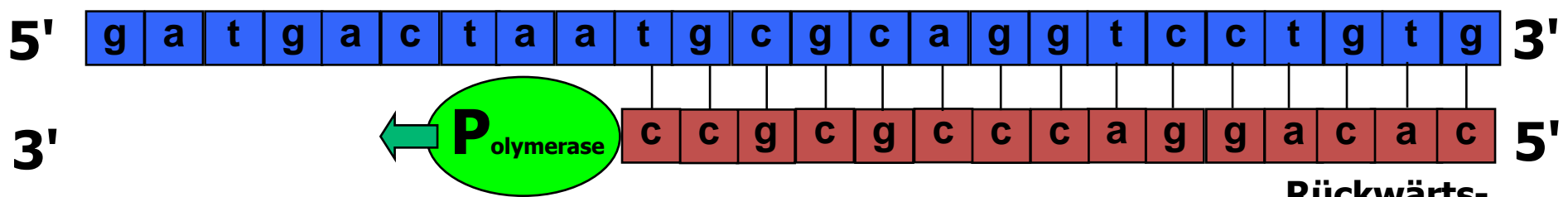
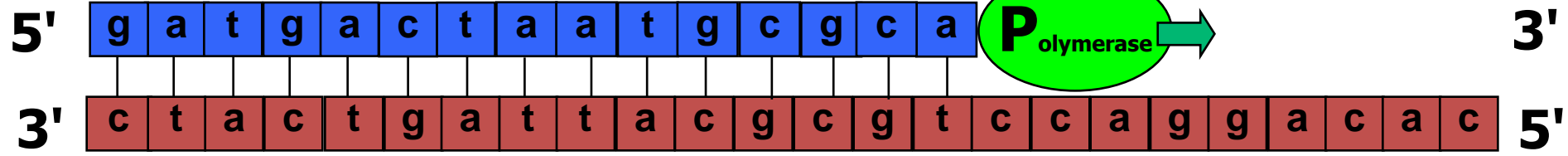
c

g

g

c

Vorwärts-Primer



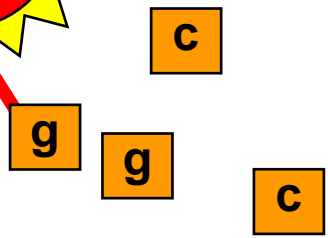
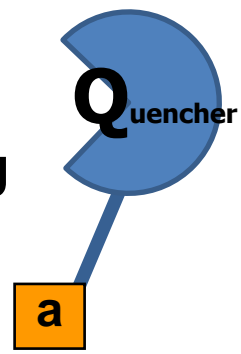
Rückwärts-Primer

Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

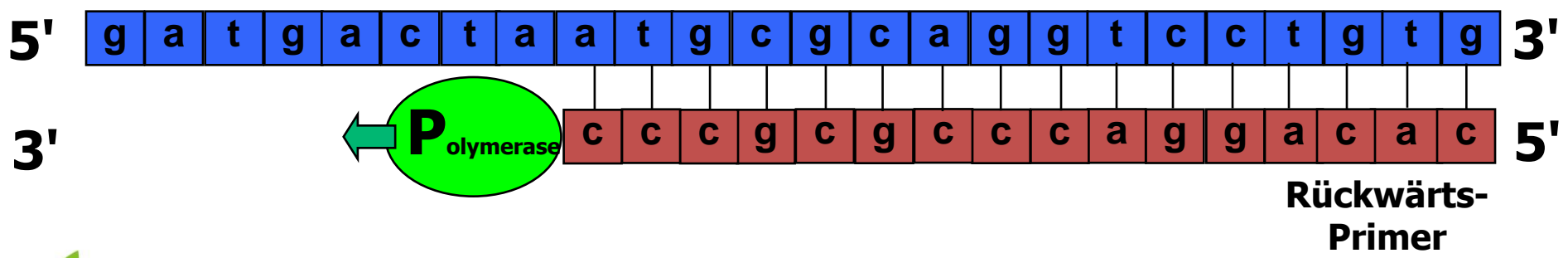
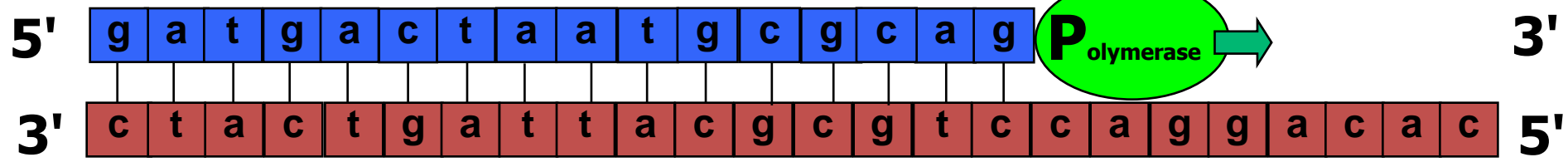
Real-time PCR



Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



Vorwärts-Primer

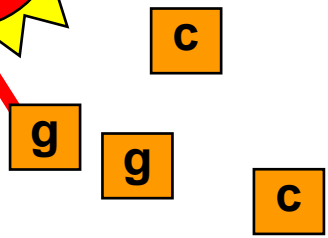
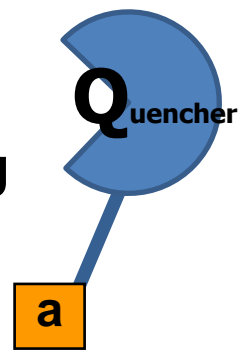


Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

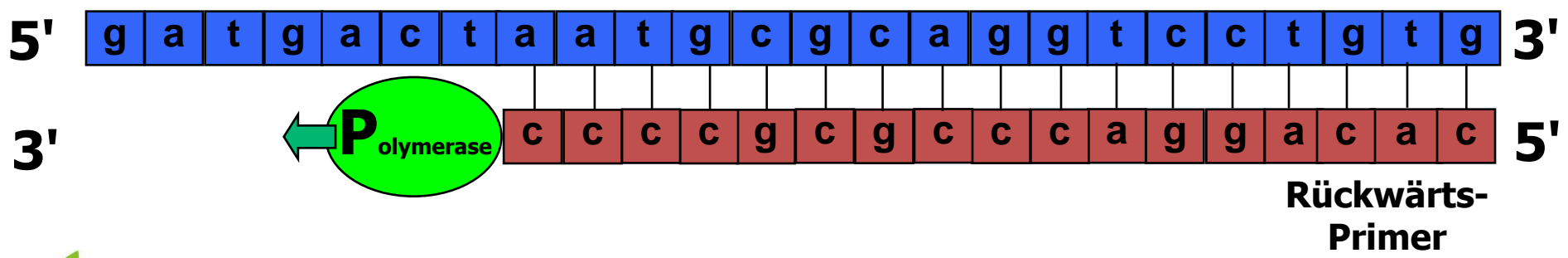
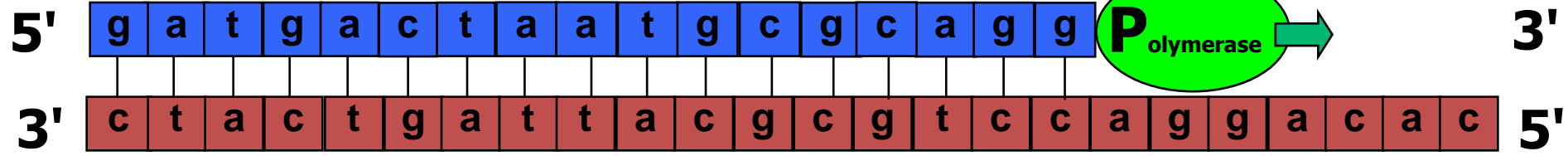
Real-time PCR



Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



Vorwärts-Primer

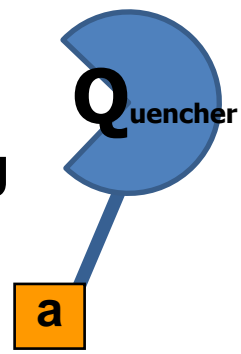


Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

Real-time PCR



Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



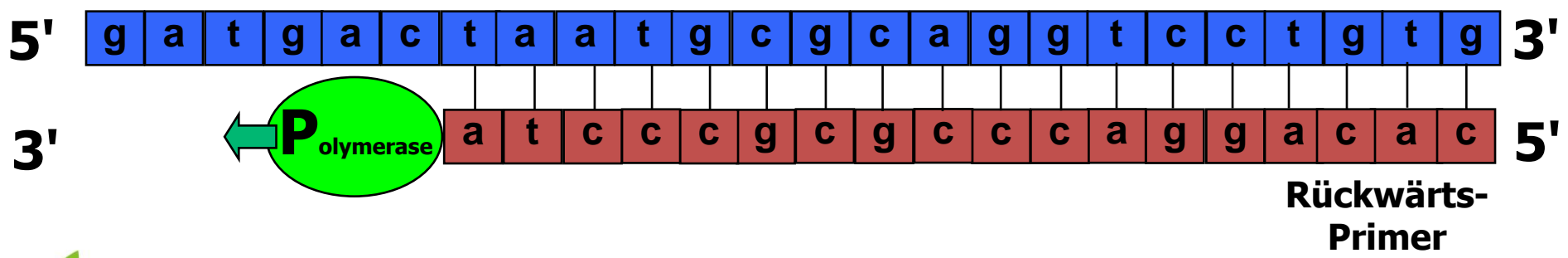
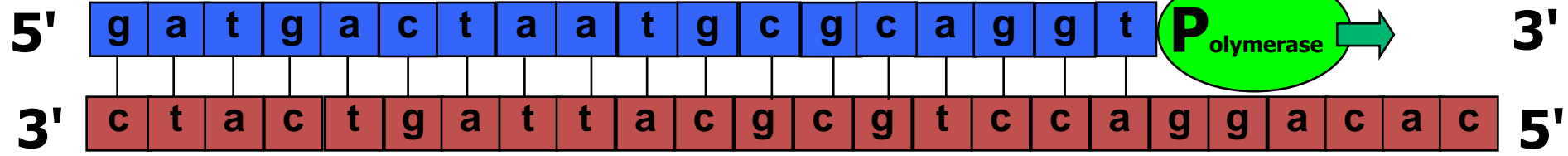
c

g

g

c

Vorwärts-Primer

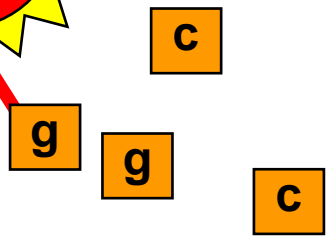
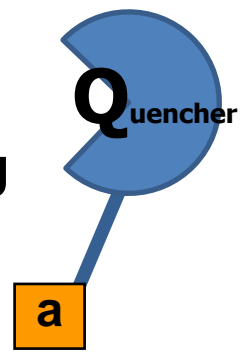


Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

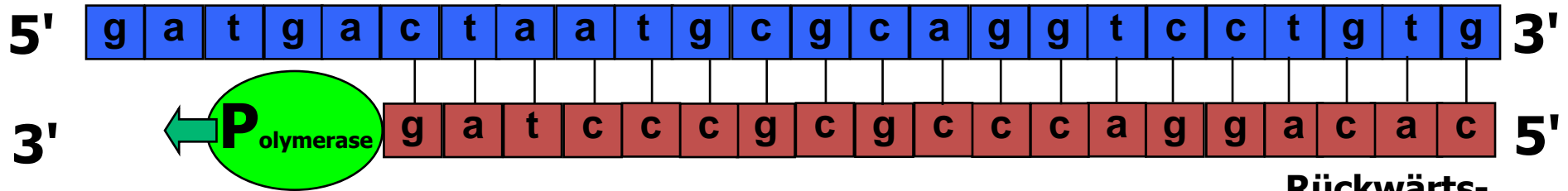
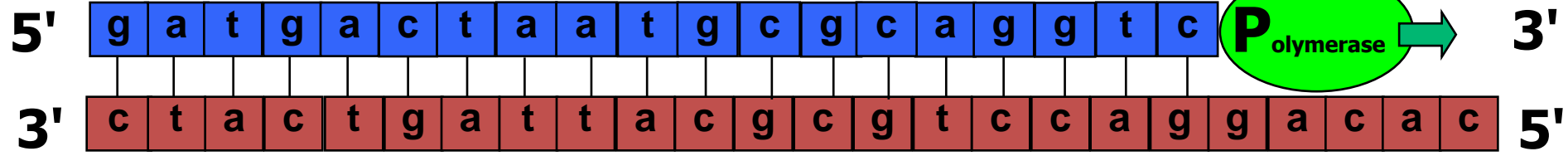


Real-time PCR

Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



Vorwärts-Primer



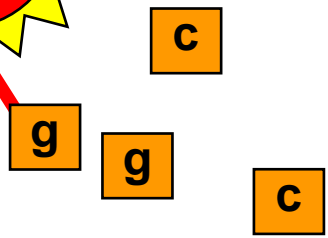
Rückwärts-Primer

Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

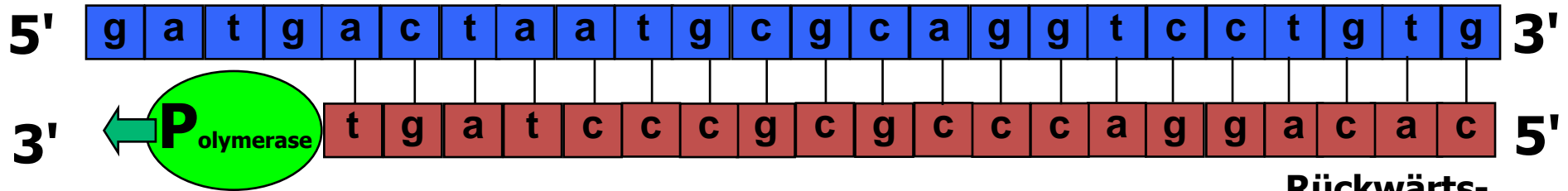
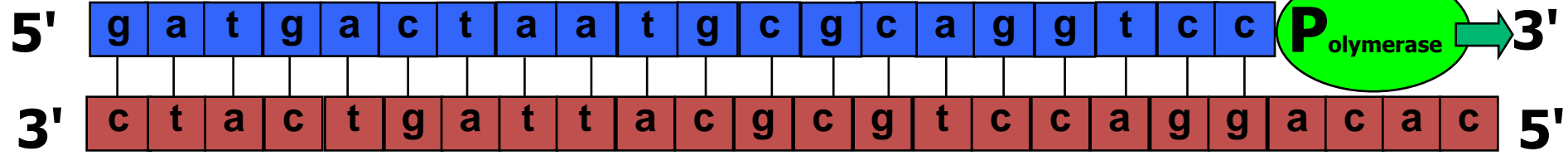


Real-time PCR

Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



Vorwärts-Primer



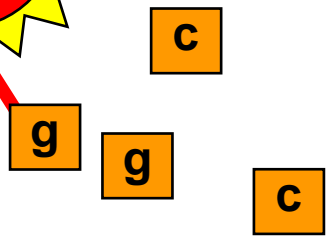
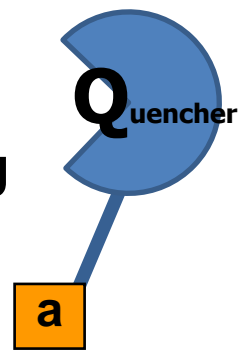
Rückwärts-Primer

Fluoreszenzstrahlung = Messsignal

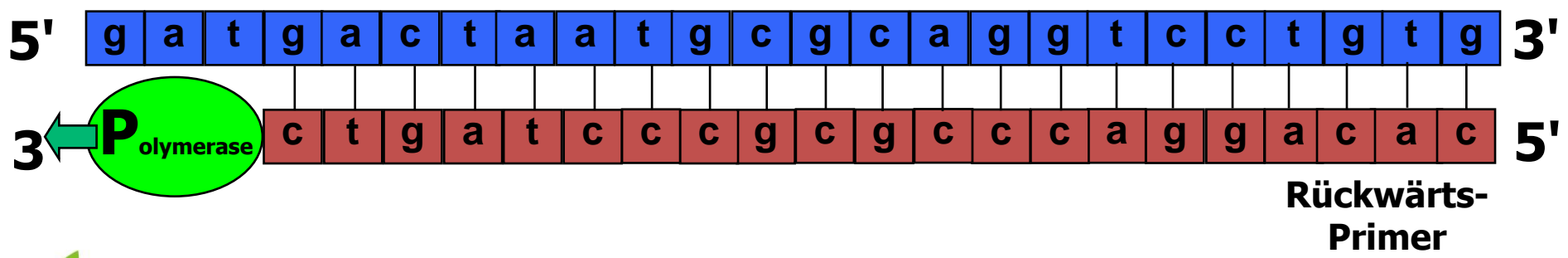
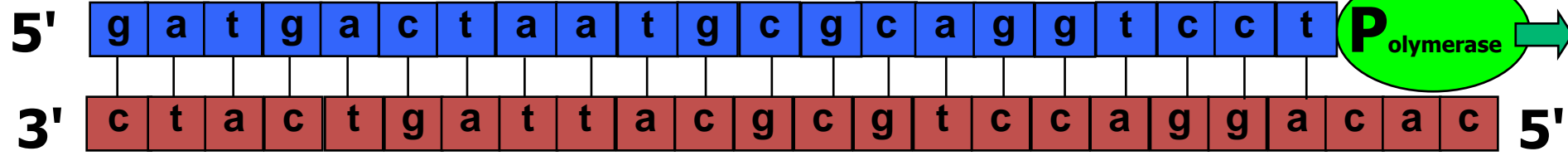


Real-time PCR

Die Polymerase verlängert den DNA-Strang bis zum Ende des Stranges



Vorwärts-Primer

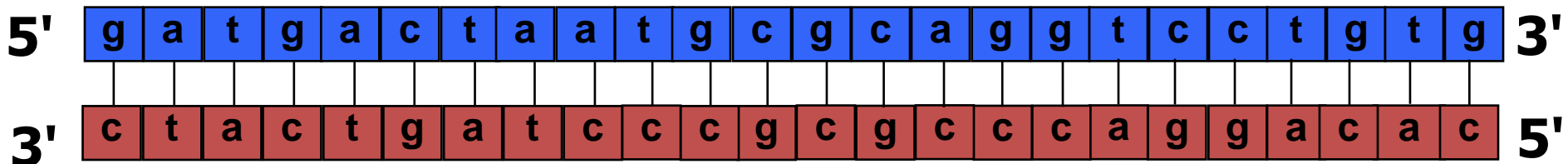
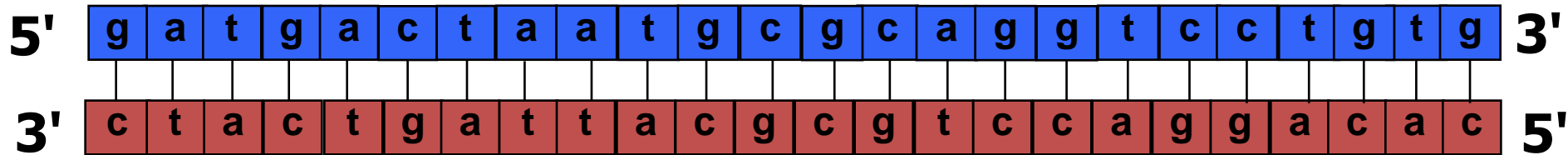


Rückwärts-Primer

Real-time PCR

Am Ende des 1. PCR-Zyklus:

2 identische
DNA-Doppelstränge



Real-time PCR

2. PCR-Zyklus

Erneute Denaturierung und Trennung der DNA-Stränge
95 °C

5' g a t g a c t a a t g c g c a g g t c c t g t g 3'

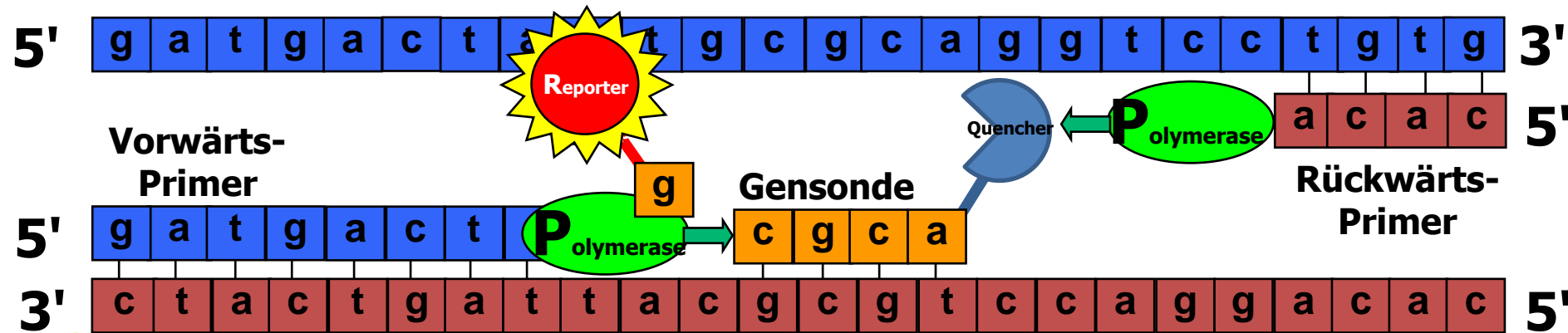
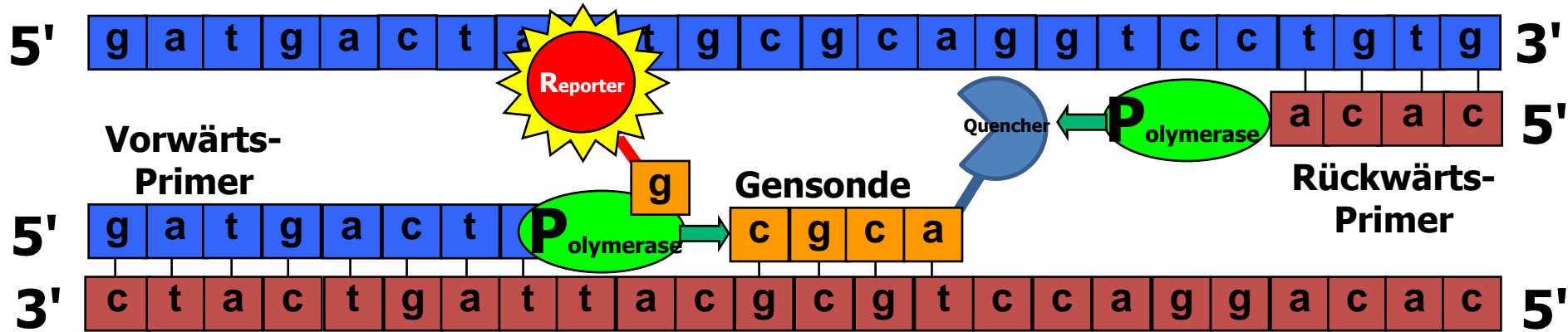
3' c t a c t g a t t a c g c g t c c a g g a c a c 5'

5' g a t g a c t a a t g c g c a g g t c c t g t g 3'

3' c t a c t g a t c c c g c g c c c a g g a c a c 5'

Real-time PCR

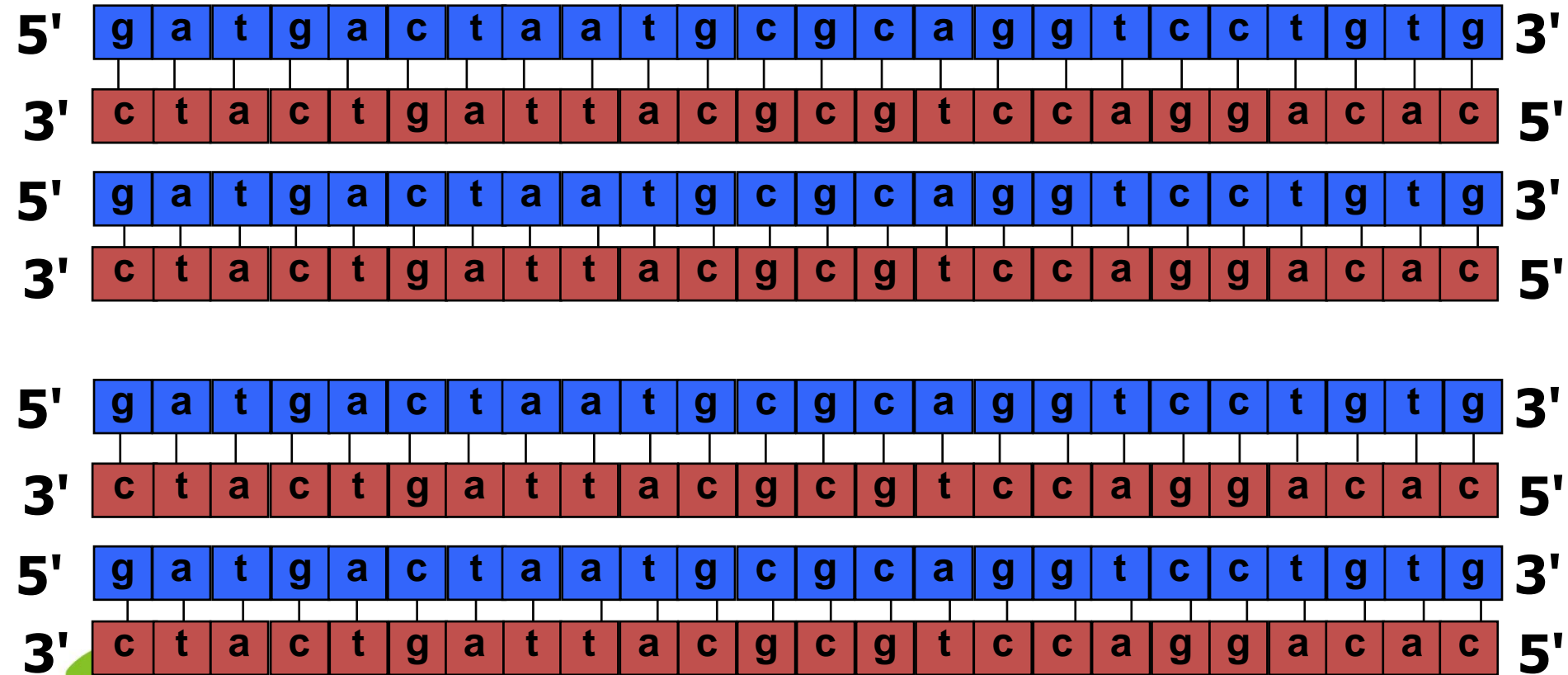
Erneute Primer-, Sondenanlagerung und Polymeraseaktivität, Fluoreszenzstrahlung



Real-time PCR

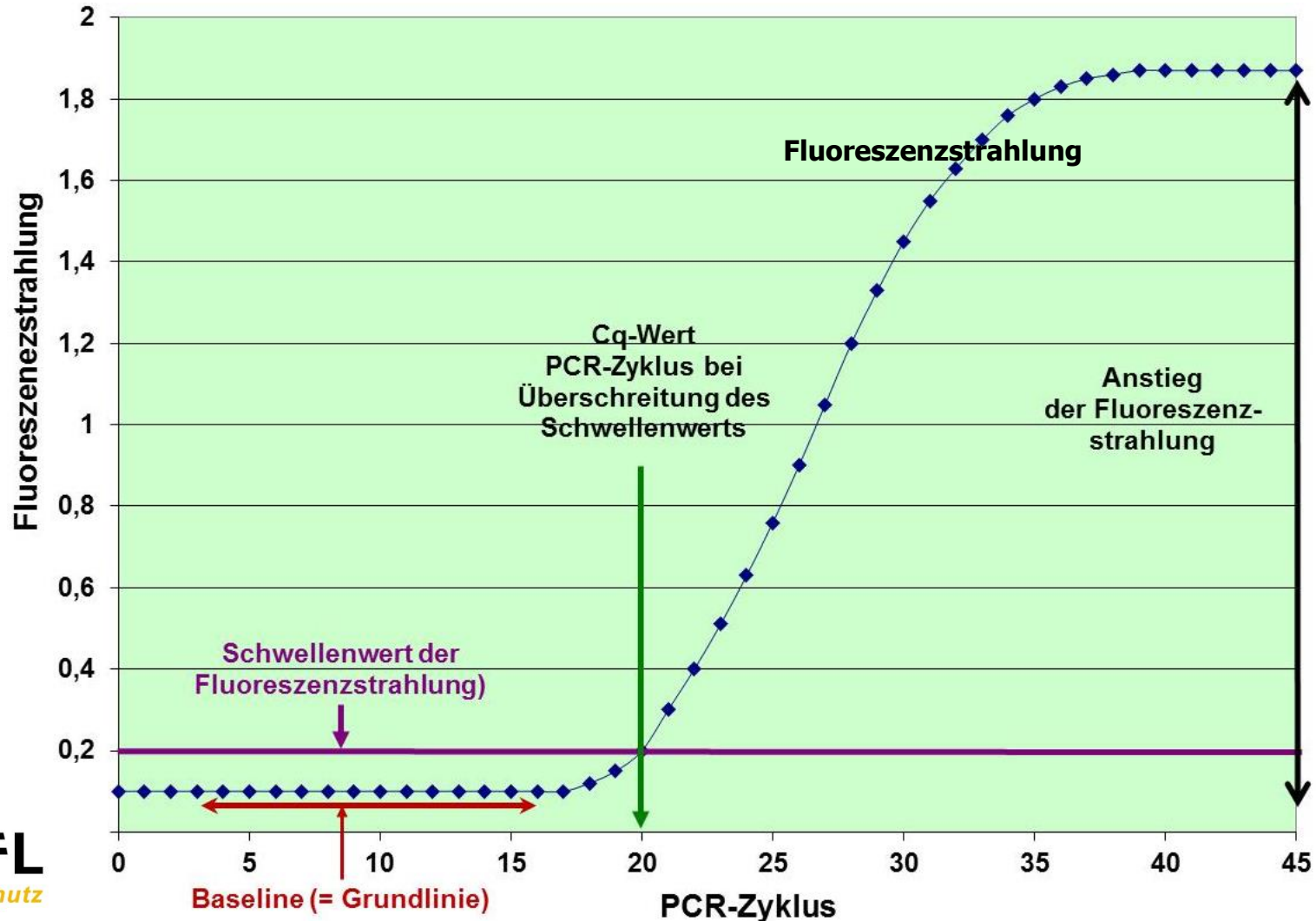
Nach dem 2. Zyklus: 4 identische DNA-Doppelstränge ...

... Nach n Zyklen: 2^n identische DNA-Doppelstränge



Real-time PCR

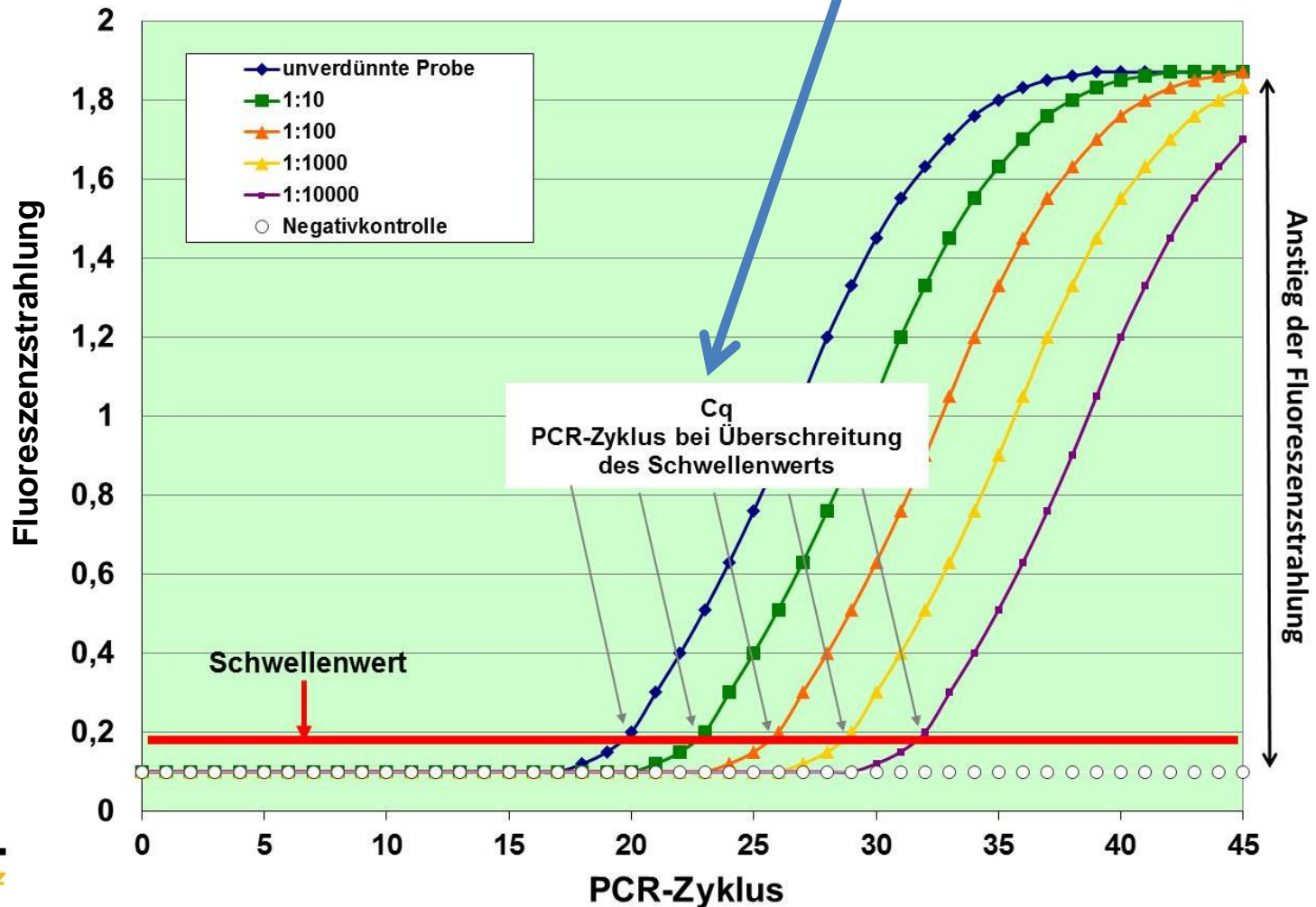
Durch weiteren Abbau der Gensonde während der Real-time PCR kommt es bei Anwesenheit des Schaderregers zu einer kontinuierlichen Freisetzung von Fluoreszenzstrahlung



Real-time PCR

Die Fluoreszenzstrahlung ist abhängig von der Erregerkonzentration:
Je mehr Erreger → desto früher steigt die Strahlung an.

Maß für die Erregerkonzentration ist der C_q-Wert = PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzstrahlung den Schwellenwert übersteigt



Real-time PCR

Mengenbestimmung:

Durch Vergleich der Cq-Werte der Proben mit denen von Standards bekannter Erregerkonzentration kann die Erregerkonzentration in der Probe berechnet werden

Effizienz der Real-time PCR = E

Im Idealfall: E = 100 %: Verdoppelung der Zahl der DNA-Stränge bei jedem PCR-Zyklus = Amplifikationsfaktor von 2

Der Amplifikationsfaktor lässt sich aus der Steigung der Standardgeraden („slope“) berechnen: Amplifikationsfaktor = $10^{-1/\text{Steigung}}$

Eine Steigung von annähernd -3,32 entspricht bei dezimalen Probenverdünnungen einem Amplifikationsfaktor von 2 und einer idealen Effizienz von 100 %:

E = 100 % = ideale Effizienz

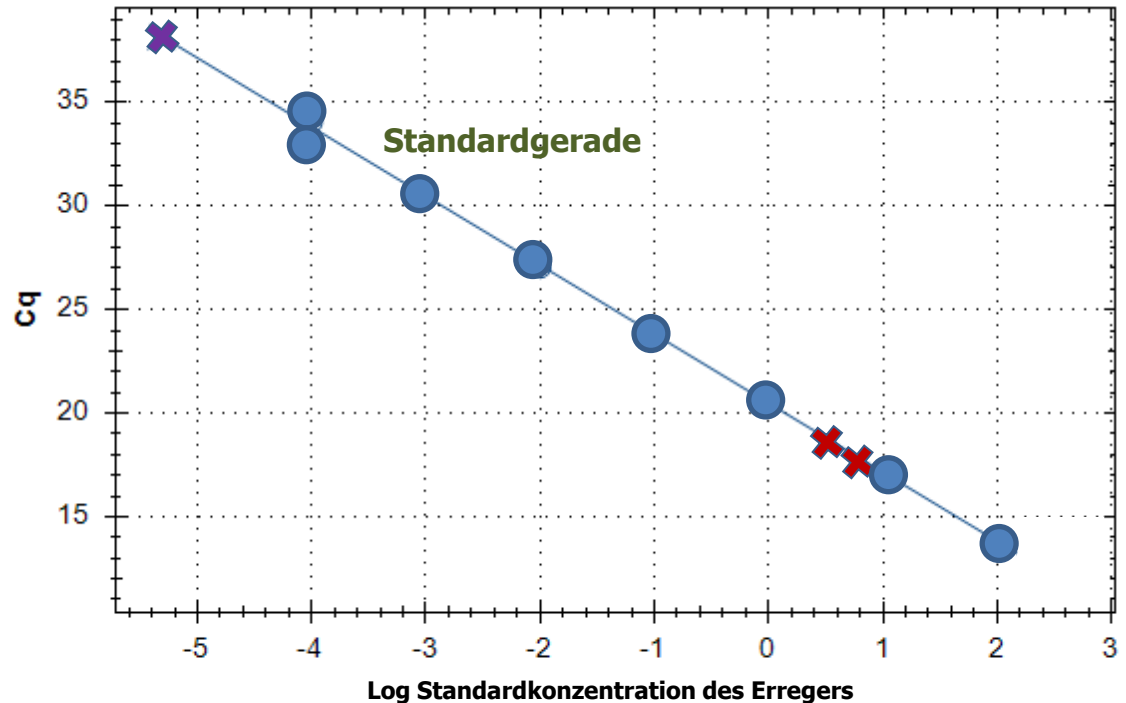
E > 100 % = mögliche PCR-Hemmung

E < 100 % = reduzierte Effizienz

Bestimmtheitsmaß = R²

Gibt an, wie gut die Korrelation zwischen den ermittelten Cq-Werten und der Erregerkonzentration ist: Maximalwert = 1

Standard Curve



E = 99,4 % ; R² = 0,992; Steigung = -3,336

✗ Probe

● Standard

✗ **Probe außerhalb des Standardbereichs**

(korrekte Mengenbestimmung nur innerhalb des Standardbereichs)

Real-time PCR

Vorteile

- ❖ **Hohe Spezifität durch Einsatz von erregerspezifischen Primern und Gensonde**
- ❖ **Hohe Sensitivität = Nachweis geringster Erregermengen durch millionenfache DNA-Vervielfältigung**
- ❖ **Robuster und stabiler Nachweis durch kurze PCR-Produkte**
- ❖ **Exakte Quantifizierung**
 - ✓ Durch Mengenbestimmung in einer frühen Phase der PCR, wenn die größte Abhängigkeit des Messwerts von der Erregerkonzentration gegeben ist
 - ✓ Über weiten Bereich lineare Abhängigkeit von der Erregerkonzentration
 - ✓ Durch Vergleich mit Proben (Standards) bekannter Konzentration
 - ✓ Mengenbestimmung nur im linearen Bereich der Standardkurve
- ❖ **Multiplexfähigkeit**
 - ✓ Mehrere Erreger werden gleichzeitig in einem PCR-Ansatz detektiert
 - ✓ Ausschluss falsch negativer PCR-Ergebnisse durch interne Kontrolle auf Pflanzen-DNA im selben PCR-Ansatz
- ❖ **Erkennen von PCR-Hemmungen**
 - ✓ Cq-Wert-Differenzen von geringer als -3,3 bei dezimalen Probenverdünnungen weisen auf PCR-Hemmung hin
- ❖ **Keine nachfolgenden Analysen - keine Elektrophorese**
 - ✓ Geringerer Zeitbedarf
 - ✓ Geringere Kontaminationsgefahr