

Grundlagen der Polymerase- Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)



Agenda

Grundlagen der PCR, Teil I

Grundlagen der PCR, Teil II

Grundlagen der PCR, Teil III

Grundlagen der Molekularbiologie

Definition der PCR

Phasen der PCR

Definition der Echtzeit-PCR

Qualitative Echtzeit-PCR

Quantitative Echtzeit-PCR

Definition der Schmelztemperatur

Schmelzkurvenanalyse

Lernziele

Die allgemeine Zielsetzung dieses Moduls ist, Ihnen eine Erklärung der im GeneXpert verwendeten PCR-Verfahren zu geben.

Am Ende der Schulung haben Sie folgende Kenntnisse erworben:

- Die am PCR-Vorgang beteiligten Elemente aufführen
- Den PCR-Vorgang erklären und die PCR-Schritte beschreiben
- Den Begriff „RT-PCR“ definieren (2 mögliche Bedeutungen)
- Die RT-PCR-Kurven beschreiben und den Ct-Wert definieren
- Erklären, wie eine Quantifizierung mit RT-PCR durchgeführt werden kann
- Die Schmelztemperatur definieren
- Erklären, wie die Schmelzkurvenanalyse die Identifikation einer antimikrobiellen Resistenz ermöglicht

Grundlagen der Polymerase- Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) – I



Grundlagen der Molekularbiologie

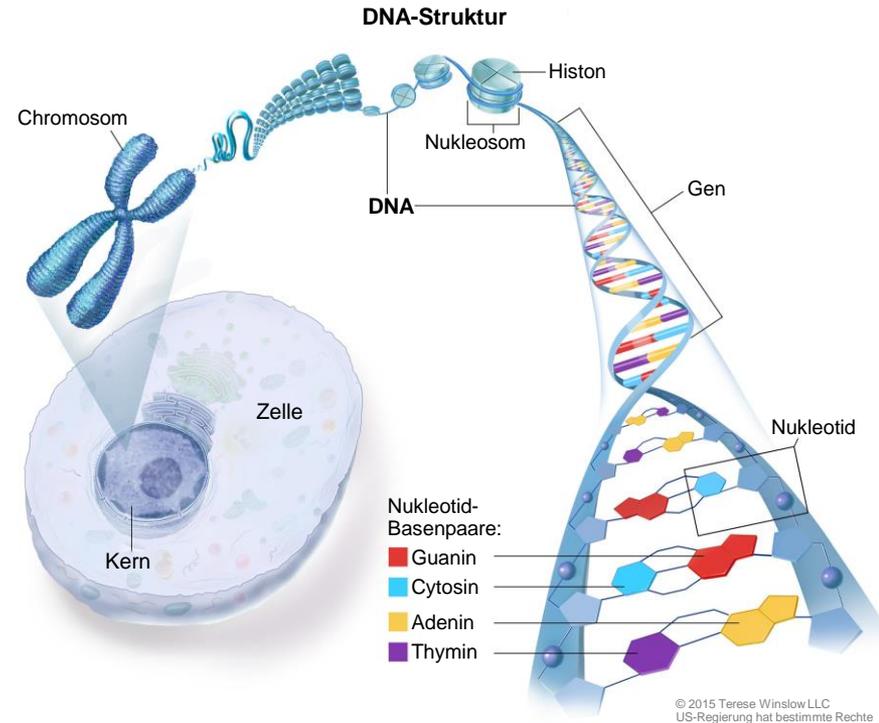
Kurze Auffrischung



Grundlagen der Molekularbiologie

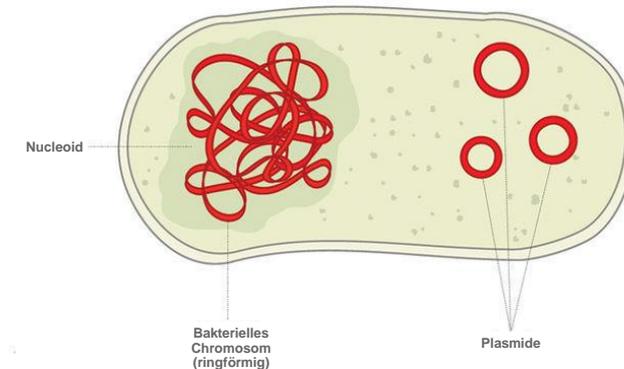
Genetische Informationen sind in DNA enthalten

- DNA ist als Doppelhelix aufgebaut
- DNA kodiert genetische Informationen (anderes Gen, andere Informationen)
- DNA ist als lange Kette organisiert, die man Chromosomen nennt
- Beim Menschen enthält der Zellkern 23 Chromosomenpaare



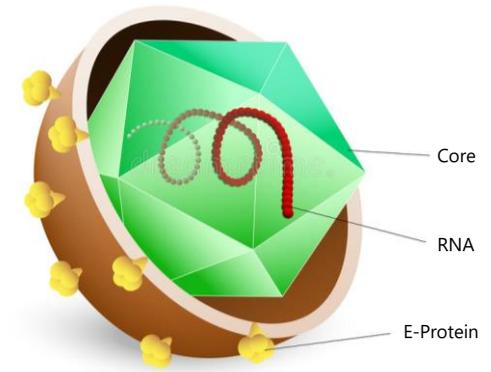
Genetisches Material in Bakterien

- Genetische Informationen in Bakterien sind in DNA kodiert.
- Bei den meisten Bakterien besteht das Genom aus einem einzigen, ringförmigen DNA-Molekül, das sich in einer Region befindet, die man Nucleoid nennt (keine Membranhülle).
- Extrachromosomale genetische Elemente wie Plasmide und Bakteriophagen bestimmen häufig die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen, die Produktion von Virulenzfaktoren oder sonstige Funktionen.



Genetisches Material in Viren

- Ein Virus ist ein kleiner Parasit, der sich nicht autonom vermehren kann. Er ist auf die Mechanismen der Wirtszelle angewiesen.
- Virale Genome kommen in verschiedenen Formen vor: RNA oder DNA, einzel- oder doppelsträngig, linear, ringförmig oder sogar segmentiert



Beispiel: Hepatitis-C-Virus



Bausteine der DNA

DNA besteht aus 4 Nukleotiden:

- A = Adenin
- T = Thymin
- C = Cytosin
- G = Guanin

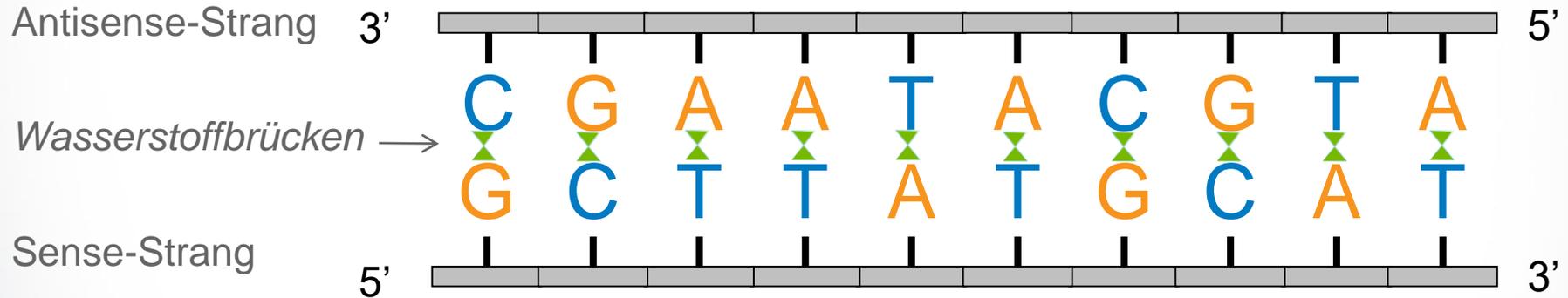


Die 4 Basen sind miteinander verknüpft und bilden so eine Sequenz (einen einzelnen DNA-Strang).



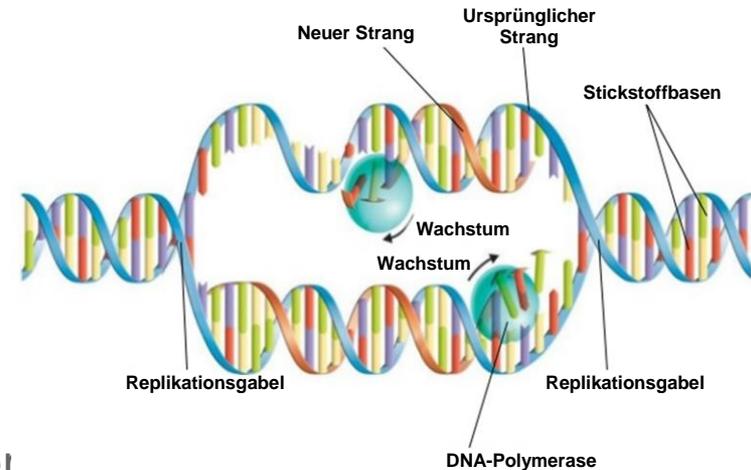
Grundlagen der Molekularbiologie

In den meisten Fällen ist die DNA doppelsträngig, wobei die beiden Stränge in einer bestimmten Weise „gepaart“ sind:



DNA-Replikation

- Neue DNA wird von Enzymen produziert, die man **DNA-Polymerasen** nennt. Sie können DNA nur in der Richtung von 5' nach 3' synthetisieren.
- Ein weiteres Enzym namens Primase produziert einen RNA-**Primer**, um die Polymerase zu initiieren.
- Sobald der RNA-Primer vorhanden ist, verlängert (elongiert) die DNA-Polymerase ihn, d. h. es werden nacheinander Nukleotide angefügt, um einen neuen, zum ursprünglichen Strang komplementären DNA-Strang zu erzeugen.



Copyright Pearson Prentice Hall

Definition der PCR

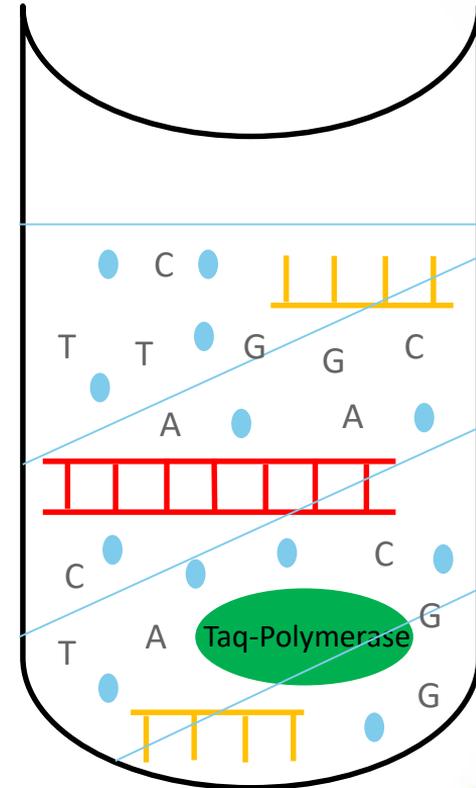


Was ist PCR?

1. PCR (**Polymerase Chain Reaction**) ist eine **Kettenreaktion**, die zahlreiche Kopien einer bestimmten, in der Probe vorliegenden DNA-Sequenz erzeugt.
2. Die DNA-Amplifikation geschieht durch **wiederholte Thermozyklen**.
3. Die Anzahl der Kopien der bestimmten Sequenz **verdoppelt** sich mit jedem Zyklus.
4. Nach vierzig Zyklen werden aus einer einzigen Kopie ungefähr 2 Billionen.

Komponenten einer PCR-Reaktion

- **DNA-Vorlage** (virales, bakterielles oder humanes Gen)
- **dNTPs** (ein Gemisch aller vier zum Aufbau von neuen DNA-Strängen erforderlicher Nukleotide: A, T, C, G)
- **Primer** (Oligonukleotide aus etwa 20 Nukleotiden, die ein Annealing zur Ziel-DNA durchlaufen)
- **Polymerase** (natürlich thermostabile Taq-Polymerase, die bei einer optimalen Temperatur von etwa 70 °C funktionsfähig ist)
- **Puffer** (Mg²⁺, Tris-HCl, Triton: bietet der Polymerase optimale Arbeitsbedingungen)

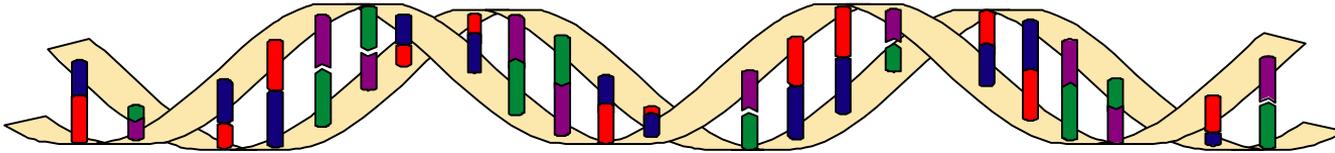


Phasen der PCR



Erste Phase eines PCR-Zyklus – Denaturierung

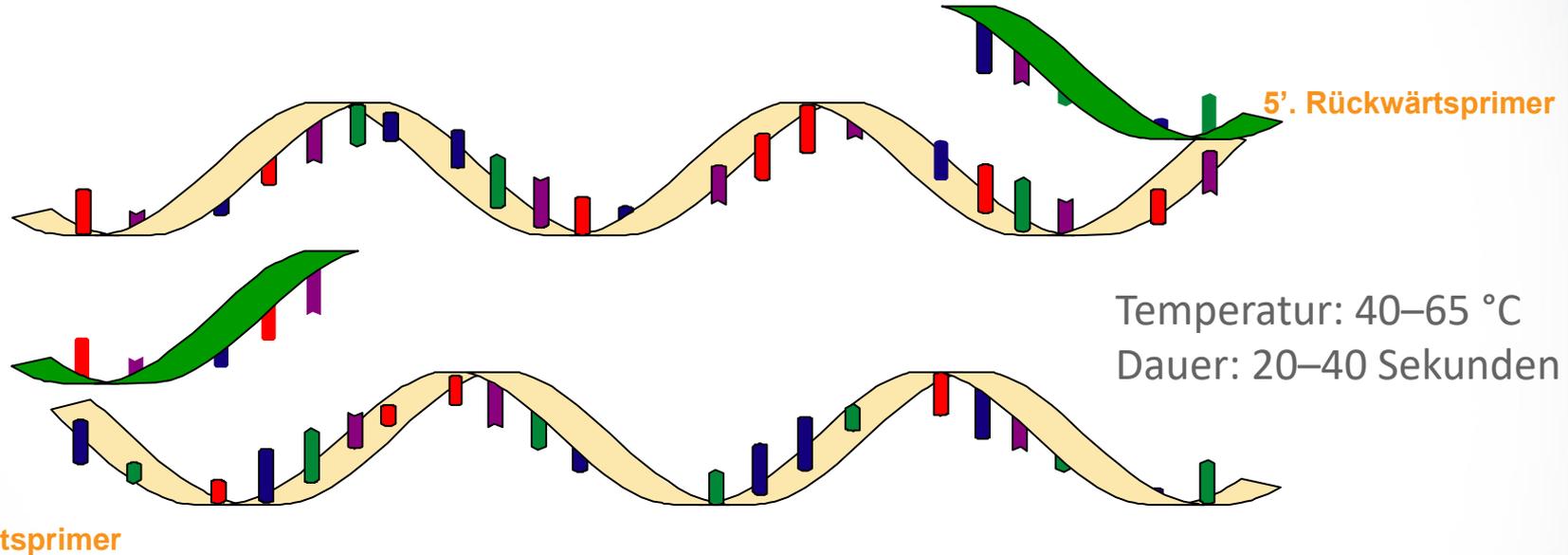
Trennung der DNA-Stränge



- 90–95 °C
- 20–30 Sek.

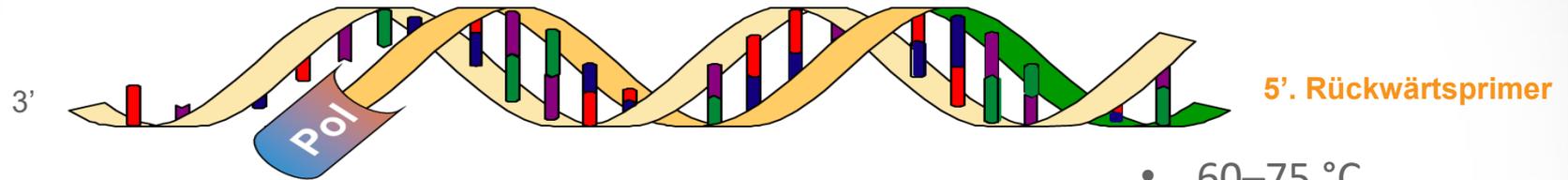
Zweite Phase eines PCR-Zyklus – Annealing

Bindung spezifischer Primer



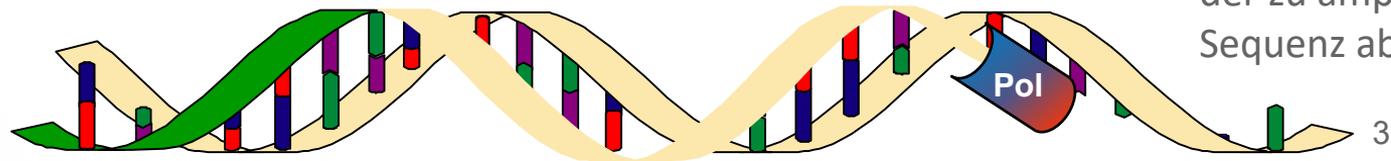
Dritte Phase eines PCR-Zyklus – Elongation

DNA-Strang-Synthese

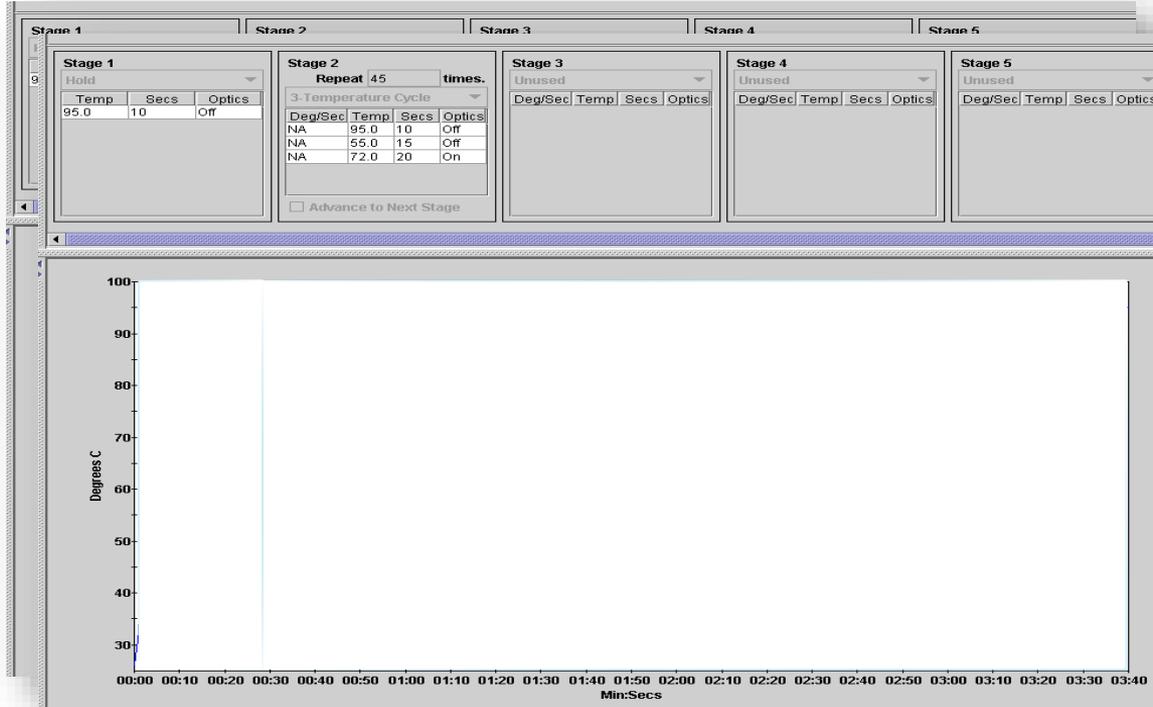


- 60–75 °C

Dauer hängt von der Größe
der zu amplifizierenden
Sequenz ab



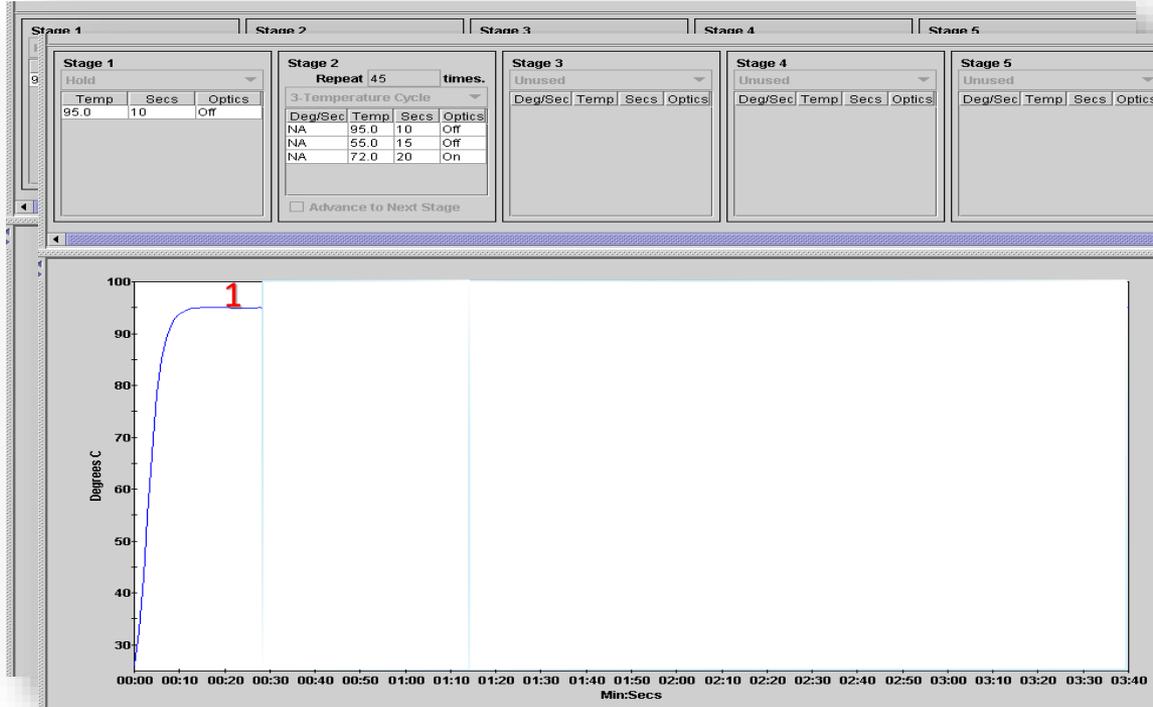
Thermoprofil der PCR-Zyklen



1. Denaturierung

Hinweis: Eine PCR besteht normalerweise aus 30 bis 40 Zyklen.

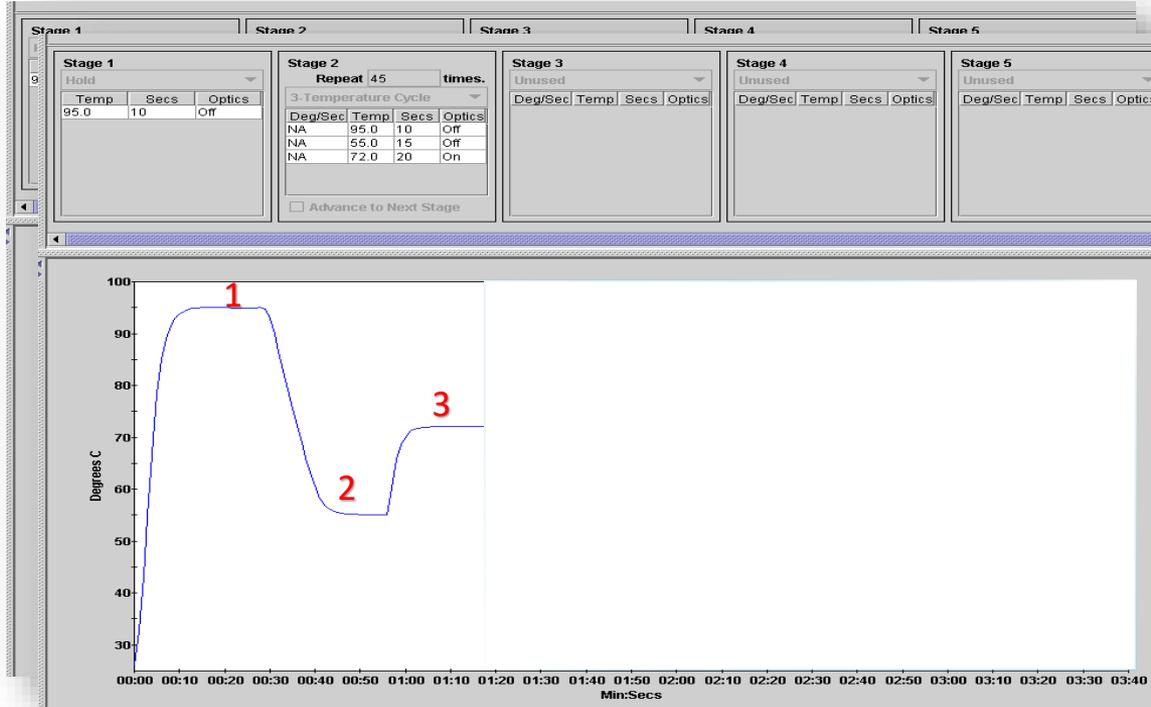
Thermoprofil der PCR-Zyklen



2. Annealing

Hinweis: Eine PCR besteht normalerweise aus 30 bis 40 Zyklen.

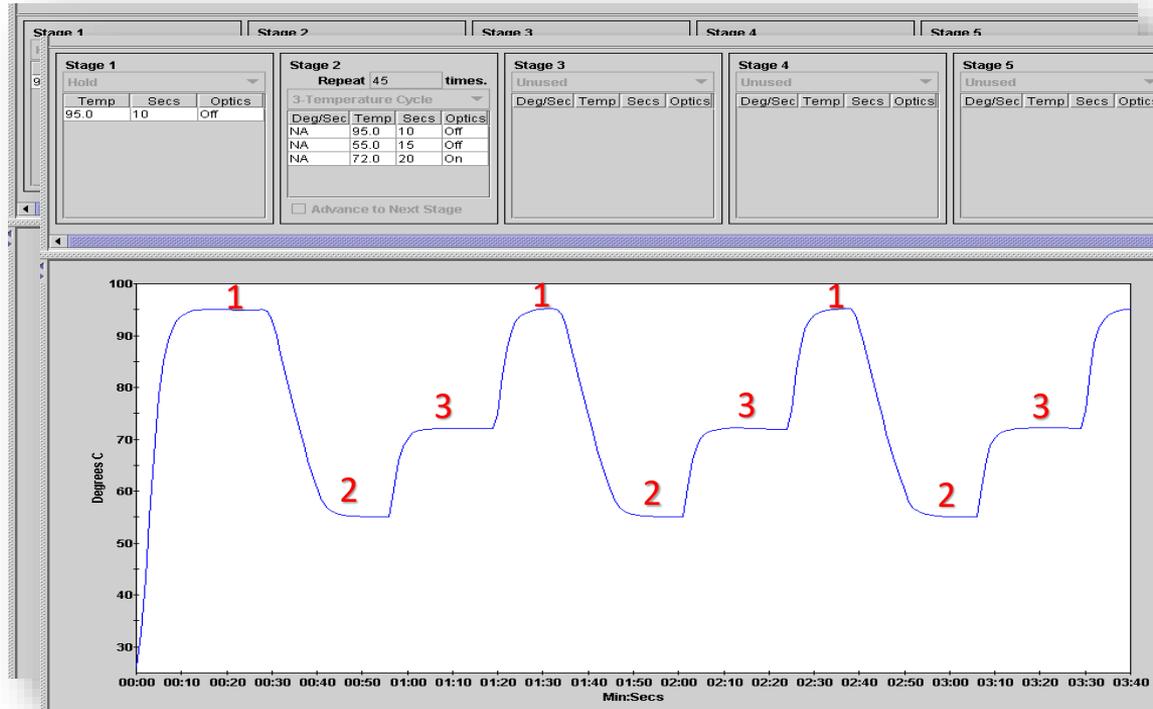
Thermoprofil der PCR-Zyklen



3. Elongation

Hinweis: Eine PCR besteht normalerweise aus 30 bis 40 Zyklen.

Thermoprofil der PCR-Zyklen



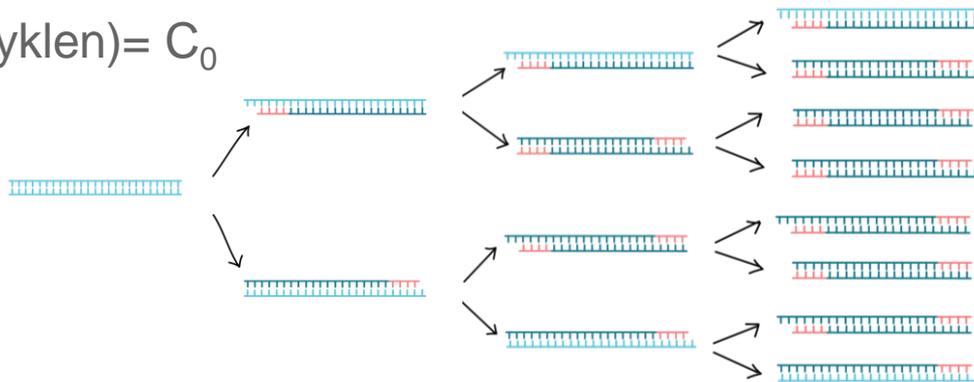
1. Denaturierung
2. Annealing
3. Elongation

Hinweis: Eine PCR besteht normalerweise aus 30 bis 40 Zyklen.

Anzahl der in der PCR erzeugten DNA-Kopien

– **Theoretisch** verdoppelt sich die Kopienanzahl der Ziel-DNA in jedem Zyklus. Das entspricht einem PCR-Effizienzfaktor von $E = 2$.

- Ausgangskonzentration (0 Zyklen) = C_0
- Nach einem Zyklus: $C_0 \times 2$
- Nach 2 Zyklen: $C_0 \times 4$
- Nach 3 Zyklen: $C_0 \times 8$
- **Nach n Zyklen: $C_0 \times 2^n$**



– **In der Praxis** lässt sich diese Replikationsrate nicht unbegrenzt einhalten, sodass aus der Verdopplung zunächst weniger als eine Verdopplung wird und die Replikation schließlich ganz aufhört.

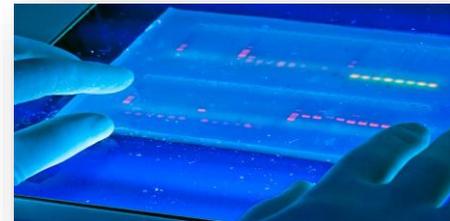
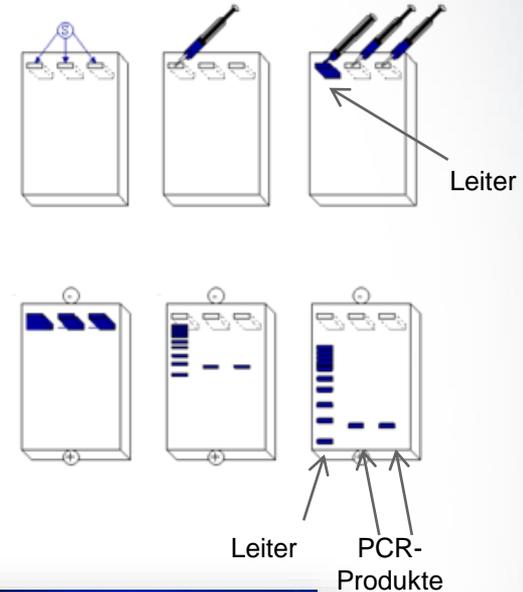
Die PCR-Effizienz beeinflussende Faktoren

- Testdesign (Hersteller)
 - Design der Primer/Sonden
 - Typ der DNA-Polymerase
 - Qualität der Reagenzien
 - Master-Mix
 - Bedingungen beim PCR-Cycling: Temperatur und Dauer der Phasen
- Vorbereitung der Analyse (Laborkraft)
 - Qualität der **Reagenzien** aufgrund der **Transport- und Lagerbedingungen**
 - Qualität der **Proben**: Anwesenheit von **PCR-Hemmsubstanzen**

Nachweis der Produkte am Endpunkt

Bei der klassischen PCR erfolgt der Nachweis am Endpunkt (Ende der PCR).

1. Ein Gemisch aus Fragmenten bekannter Größe (Leiter) wird als Referenz in ein Agarose-Gel geladen, um die Größe der PCR-Produkte zu berechnen.
2. Das PCR-Produkt wird ebenfalls in das Gel geladen.
3. Es wird ein elektrisches Feld angelegt, sodass negativ geladene Moleküle zum positiven Pol wandern.
4. Das PCR-Produkt wandert entsprechend seiner Größe.
5. Die DNA wird mit Ethidiumbromid gefärbt, das unter UV-Licht sichtbar ist.
6. Wenn die gesuchte Zielsequenz in der Probe vorhanden ist, ist ein PCR-Produkt der erwarteten Größe vorhanden.





Vielen Dank.

www.Cepheid.com

