

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



# Agenda

Grundlagen der PCR,  
Teil I

Grundlagen der Molekularbiologie

Definition der PCR

Phasen der PCR

**Grundlagen der PCR,  
Teil II**

**Definition der Echtzeit-PCR**

**Qualitative Echtzeit-PCR**

**Quantitative Echtzeit-PCR**

Grundlagen der PCR,  
Teil III

Definition der Schmelztemperatur

Schmelzkurvenanalyse

# Echtzeit-PCR



# Echtzeit-PCR (Real-Time PCR, RT-PCR)

- Echtzeit-PCR ist eine normale PCR-Reaktion, bei der ein zusätzliches Oligonukleotid eingesetzt wird, das mit einem fluoreszierenden Molekül markiert ist. Dieses wird als Sonde bezeichnet.
- Die Sonde ist eine einzelsträngige DNA, die einer Zielsequenz entspricht.
- Die fluoreszierende Sonde gibt ein Fluoreszenzsignal ab, wenn sie mittels Hybridisierung aktiviert wird.
- Jede Kopie der Ziel-DNA aktiviert jeweils ein Sondenmolekül, sodass das Fluoreszenzsignal direkt proportional zur Anzahl der generierten Kopien der Ziel-DNA ist.
- Beispiele für Sonden, die für die Echtzeit-PCR eingesetzt werden: TaqMan, Molecular Beacon, Scorpion-Sonden usw.

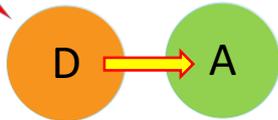


# FRET-Technologie:

- Der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) ist eine distanzabhängige Interaktion zwischen zwei Farbstoffmolekülen.
- Anregungsenergie wird von einem Donor-Molekül auf ein Akzeptor-Molekül übertragen, ohne dass ein Photon emittiert wird.
- Es gibt zahlreiche Anwendungsbereiche für den FRET, darunter die PCR.

D=Donor/Reporter  
A=Akzeptor/Quencher

Anregung



Nahe – Fluoreszenz wird absorbiert

Anregung



Entfernt – Fluoreszenz wird emittiert

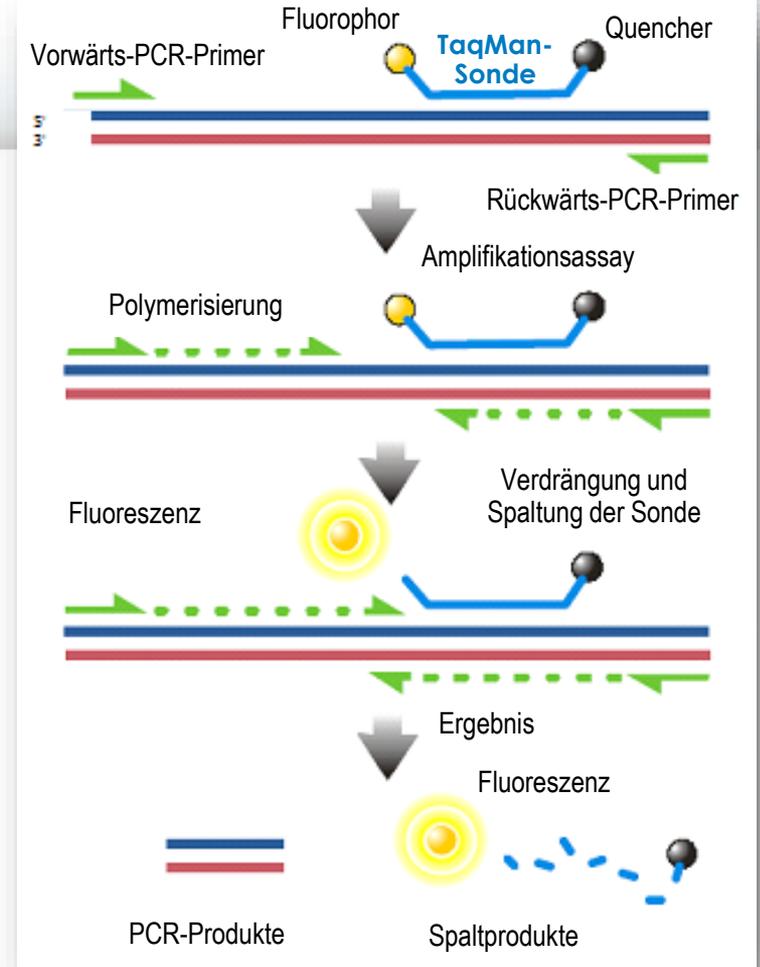
# TaqMan-Sonde

- Eine TaqMan-Sonde ist eine kurze Oligonukleotid-Sonde (15 bis 30 Basen lang), die mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende markiert ist.
- Solange Reporter und Quencher sich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, absorbiert der Quencher die vom Reporter stammende Fluoreszenz.
- Die Sonde ist gemäß DNA-Sequenz dafür konzipiert, sich mittels Annealing an die Zielsequenz zu binden.
- Während der Elongationsphase der PCR baut die Taq-Polymerase die Sonde ab.
- Damit werden Reporter und Quencher physisch voneinander getrennt, sodass die Fluoreszenz emittiert und gemessen werden kann.



1 freies  
Fluorophor/  
DNA-Amplikon

# TaqMan-Sonde



# TaqMan-Sonde



# TaqMan-Sonde



Vorwärtsprimer



# TaqMan-Sonde

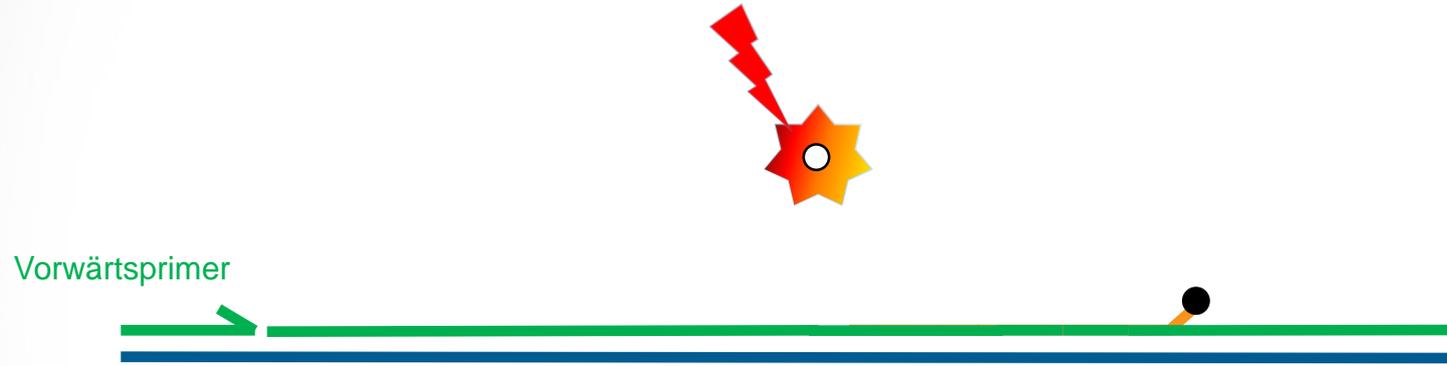
Vorwärtsprimer

Reporter

Quencher



# TaqMan-Sonde



# Molecular-Beacon-Sonde

- Eine Molecular-Beacon-Sonde ist ein haarnadelförmiges Molekül, das aus einem Fluorophor (Reporter) und einem Quencher besteht.
- Die Sondensequenz ist etwa 17–21 Basen lang. Die Stem-Sequenz sollte GC-reich sein (> 80 % der Gesamtsequenz), um ein stabiles, 5–8 Basen langes Duplex zu bilden.
- Frei in Lösung liegen die beiden Enden nahe beieinander, sodass die Fluoreszenz gelöscht wird (Quenching).
- In Anwesenheit der Ziel-DNA bindet sich die Sonde durch Annealing an die Zielsequenz und trennt Fluorophor und Quencher, sodass Fluoreszenz abgegeben wird.

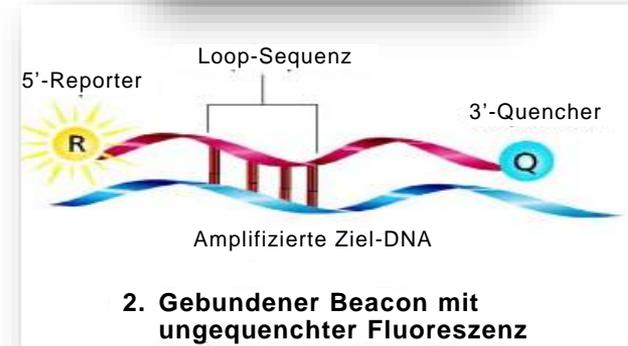
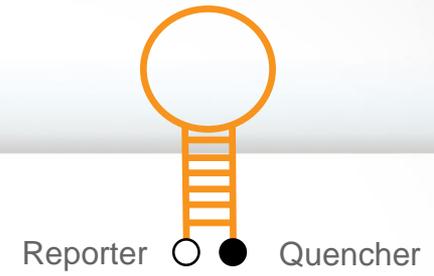


Bild: Sigma-Aldrich

# Molecular-Beacon-Sonde



# Molecular-Beacon-Sonde



# Molecular-Beacon-Sonde



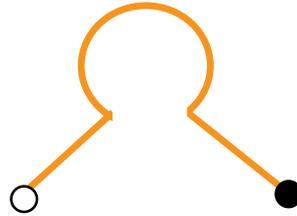
# Molecular-Beacon-Sonde



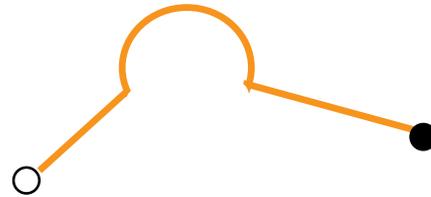
# Molecular-Beacon-Sonde



# Molecular-Beacon-Sonde



# Molecular-Beacon-Sonde



# Molecular-Beacon-Sonde

Vorwärtsprimer



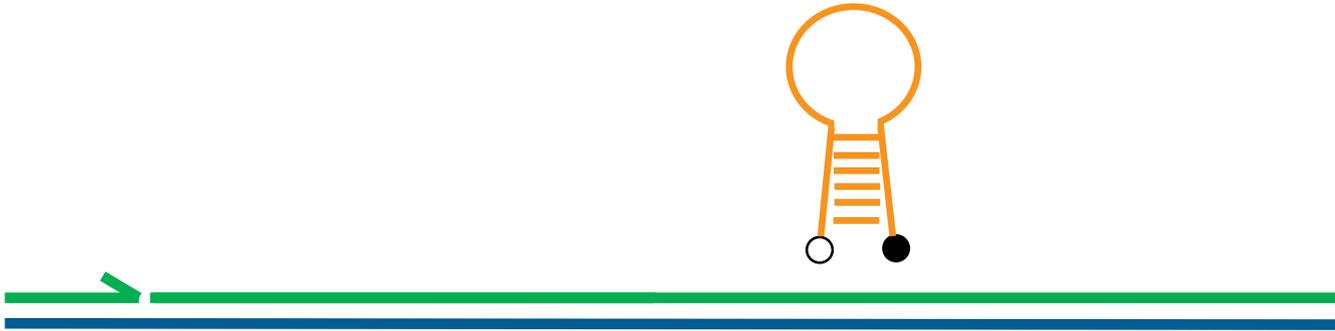
# Molecular-Beacon-Sonde



# Molecular-Beacon-Sonde



# Molecular-Beacon-Sonde

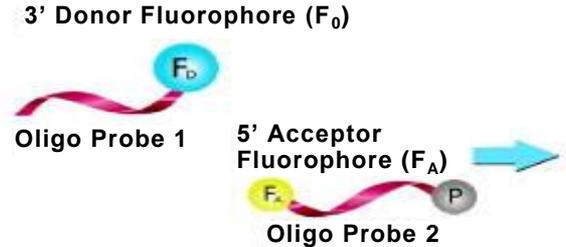


# Molecular-Beacon-Sonde



# FRET-Sonden

- FRET-Sonden sind ein Paar aus Oligonukleotiden mit einem Donor-Fluorophor und einem Akzeptor-Fluorophor.
- Der Donor wird vom Instrument angeregt und regt daraufhin den Akzeptor an, der Fluoreszenz emittiert. Das Instrument detektiert die Fluoreszenz.
- Wenn die Sonden frei in Lösung vorliegen, tritt dieses Phänomen wegen des Abstands nicht auf.
- Während der Annealingphase der PCR binden sich die Sonden nahe beieinander, sodass der Energietransfer stattfinden kann und die Fluoreszenz emittiert und gemessen werden kann.



1. Probes in solution emit low fluorescence

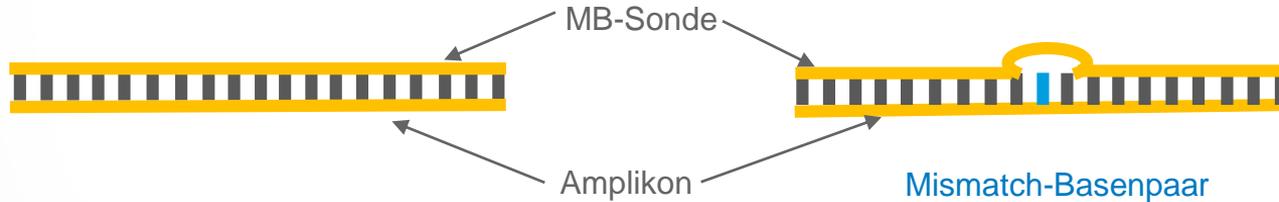


2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

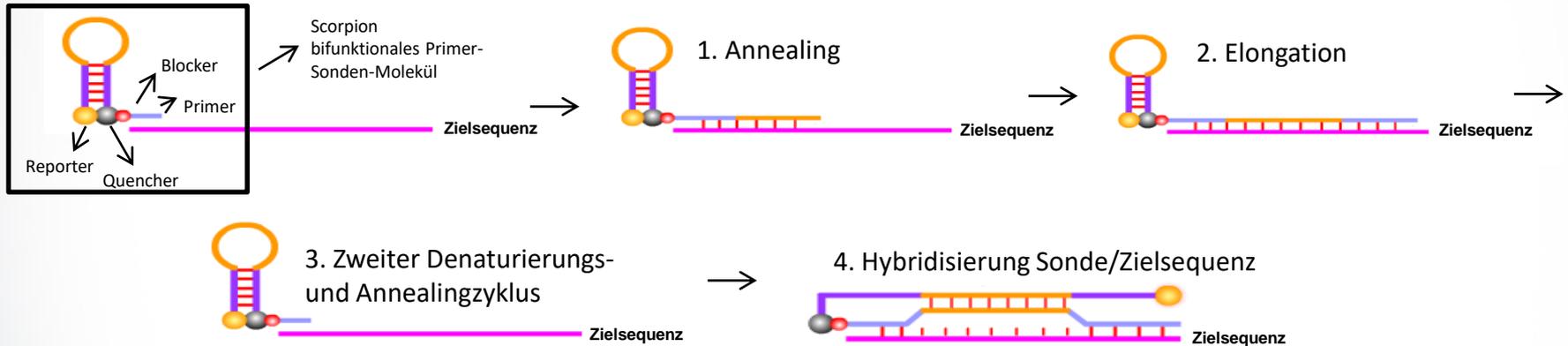
Bild: Sigma-Aldrich

# Ungenauer Molecular-Beacon

- Ungenauere Molecular-Beacons besitzen relativ lange Sonden-Sequenzen (etwa 30 bis 40 Basen lang), die mit Amplikonen vieler verschiedener Spezies hybridisieren können, trotz der Anwesenheit von **Mismatch-Basenpaaren**.



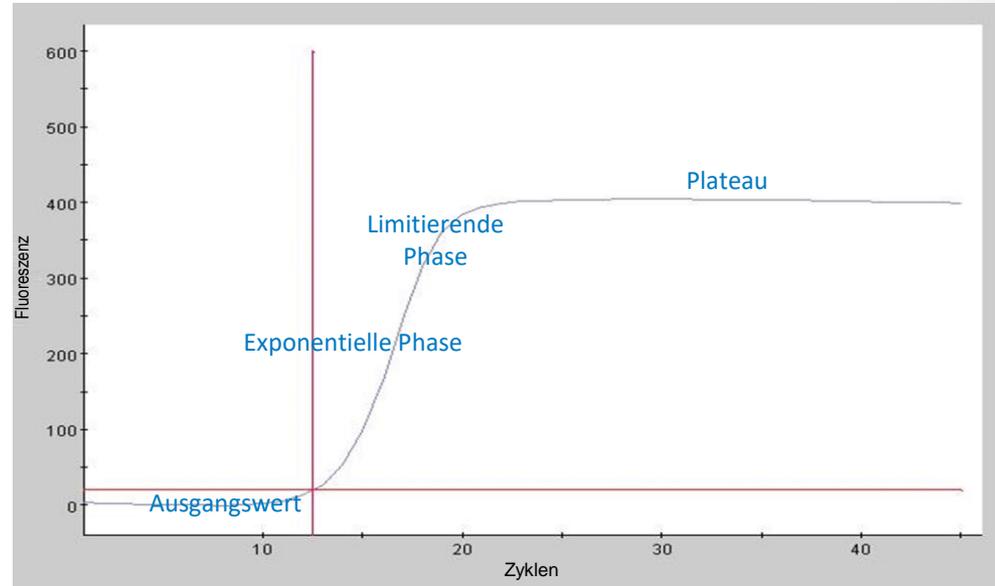
# Scorpion-Sonde



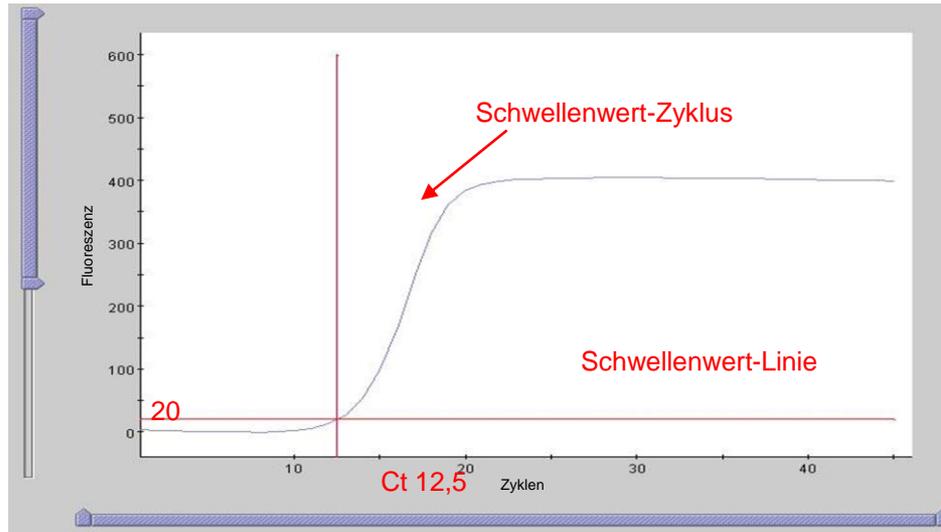
Die Sondensequenz sollte 17–27 Basen lang sein.

# Änderungen der Fluoreszenz während der PCR

- Die Amplifikationskurve besteht aus 4 Phasen:



# Definition des Ct – basiert auf dem Schwellenwert



- Schwellenwert-Zyklus (Ct): der erste Zyklus, bei dem ein festgelegter Fluoreszenz-Schwellenwert überschritten wird.
- Dieser Zykluswert muss nicht ganzzahlig sein.

# Gültigkeitskriterien einer PCR: Ct-Bereich und Endpunkt-Fluoreszenz

- Ct-Bereich
  - Der akzeptable Bereich für einen Ct-Wert
  - Limitiert durch  $Ct_{\min}$  und  $Ct_{\max}$
- Endpunkt-Fluoreszenz
  - Der Fluoreszenzwert am Ende der PCR (Plateau)

Bei Xpert Tests wird die Amplifikationskurve außerhalb des Bereichs nicht validiert; das Ergebnis kann dann nicht ausgegeben werden.

# Multiplex-PCR

- Unter Multiplex-PCR versteht man die Amplifikation von **mehreren DNA-Zielsequenzen** zur gleichen Zeit.
  - Jede Zielsequenz hat einen eigenen Satz Primer.
  - Jede Zielsequenz wird von einer eigenen Sonde nachgewiesen bzw. quantifiziert, die mit einem bestimmten Farbstoff markiert ist und bei einer bestimmten Fluoreszenzwellenlänge abgelesen wird.
- Beim Design einer Multiplex-PCR muss eine Konkurrenz zwischen den Zielsequenzen vermieden werden.

# Detektion von mehreren Farbstoffen – 6 Farbstoffe bis 2020

- Verschiedene Farbstoffe (Reporter) werden ausgesucht
- Sie werden angeregt bzw. emittieren bei ganz bestimmten Wellenlängen

Analyt	Reporter	Anregung (nm)	Emission (nm)
Zielsequenz 1	Farbstoff 1	375–405	420–480 
Zielsequenz 2	Farbstoff 2	450–495	510–535 
Zielsequenz 3	Farbstoff 3	500–550	565–590 
Zielsequenz 4	Farbstoff 4	630–650	665–685 
SPC	Farbstoff 6		> 700 
Zielsequenz 5	Farbstoff 5	555–590	606–650 

# Detektion von mehreren Farbstoffen – jetzt 10 Farbstoffe

- Verschiedene Farbstoffe (Reporter) werden ausgesucht
- Sie werden angeregt bzw. emittieren bei ganz bestimmten Wellenlängen

		Detektion im iCore			
Optische Kanäle im iCore		Blau + IR (420–477 nm + > 700 nm)	Grün + Tiefrot (510–535 nm + 660–680 nm)	Gelb (565–585 nm)	Rot (620–645 nm)
Anregung im iCore	UV (400 nm)	CF1			
	Blau (470 nm)		FAM	CF7 (FAM-CF3)	CF9
	Grün (520 nm)	CF10 (CF3-CF6)		A532 (CF3)	CF8 (CF3-CF4)
	Gelb (574-584 nm)				TxR (CF4)
	Rot (635 nm)	CF6	A647 (CF5)		

# Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR

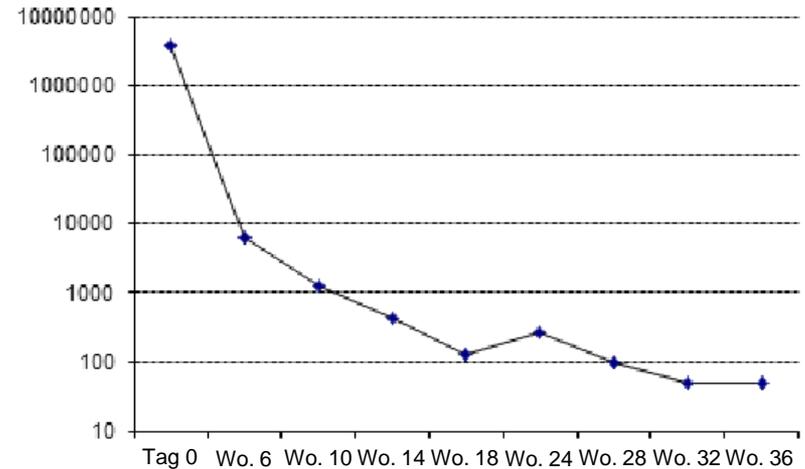


# Quantifizierung

- Absolute Quantifizierung: Angabe des Ergebnisses als Konzentration (Kopien/ml, IE/ml usw.):

Xpert HIV-1 VL und Xpert HCV

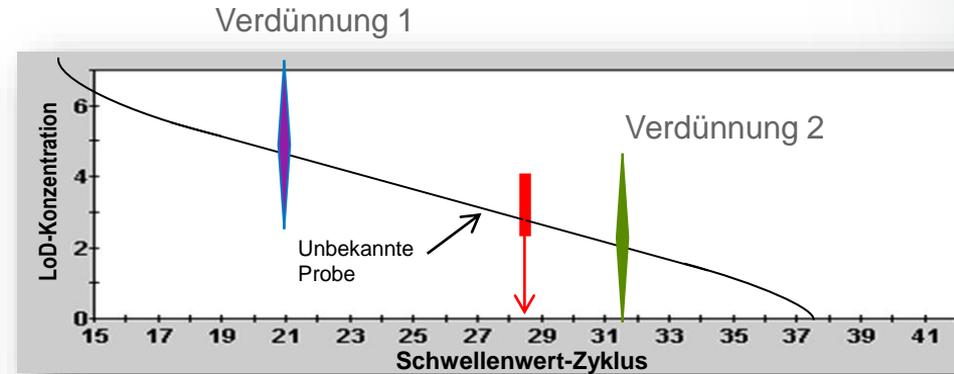
- Relative Quantifizierung: Angabe des Ergebnisses als Verhältnis:  
Xpert BCR-ABL



HIV-1 VL Abnahme der Viruslast unter ART  
(andere Methode als GeneXpert).  
Grafik: hivbook.com

# Absolute Quantifizierung mithilfe externer Standards

1. Es werden Verdünnungen einer Probe angesetzt, in der die Ziel-DNA in einer bekannten Konzentration enthalten ist.
2. Diese Verdünnungen werden jeweils in separaten Röhrchen zusammen mit der unbekannt Probe mitgeführt.
3. Für jede Verdünnung wird der Ct-Wert ausgegeben.
4. Es wird eine Standardkurve gezeichnet: Ct gegenüber Konzentration
5. Anhand des Ct-Werts der unbekannt Probe kann ihre Konzentration aus der Standardkurve extrapoliert werden.



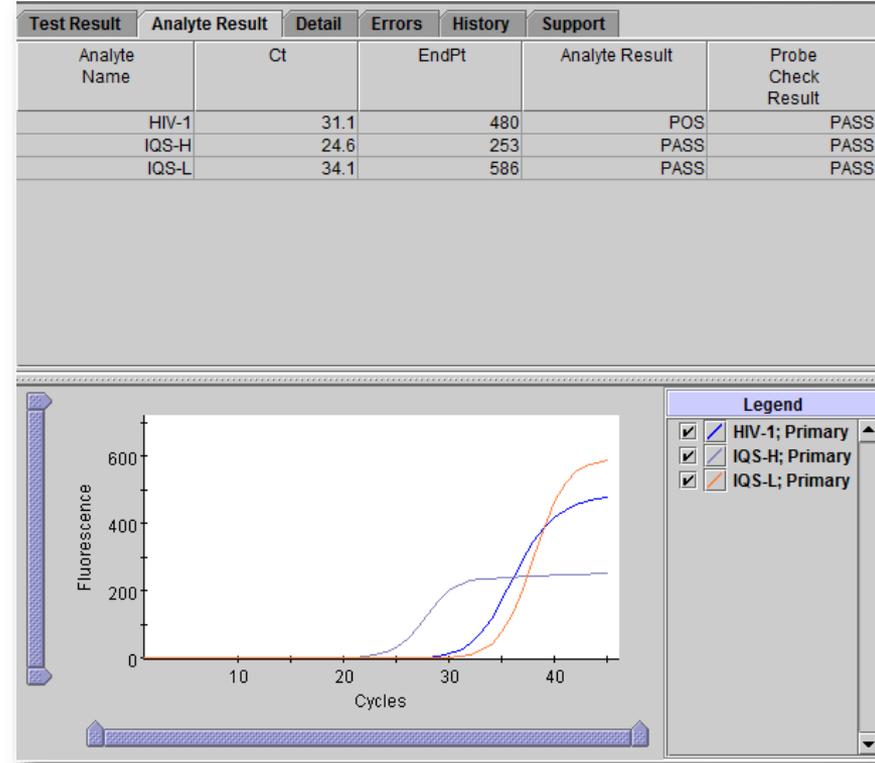
Im linearen Konzentrationsbereich genügen 2 Standards.

# Absolute Quantifizierung mithilfe interner Standards

Für den Xpert HIV-1 VL:

Anhand von 2 Standards wird die Konzentration der Probe berechnet:

- 1 hoher Standard (IQS-H) =  $10^6$  Kopien/ml
- 1 niedriger Standard (IQS-L) =  $10^3$  Kopien/ml
- Anhand der Ct-Werte und bekannten Konzentrationen der beiden Standards sowie des Ct-Werts der unbekannt Probe berechnet die GeneXpert Software die Konzentration der unbekannt Probe.



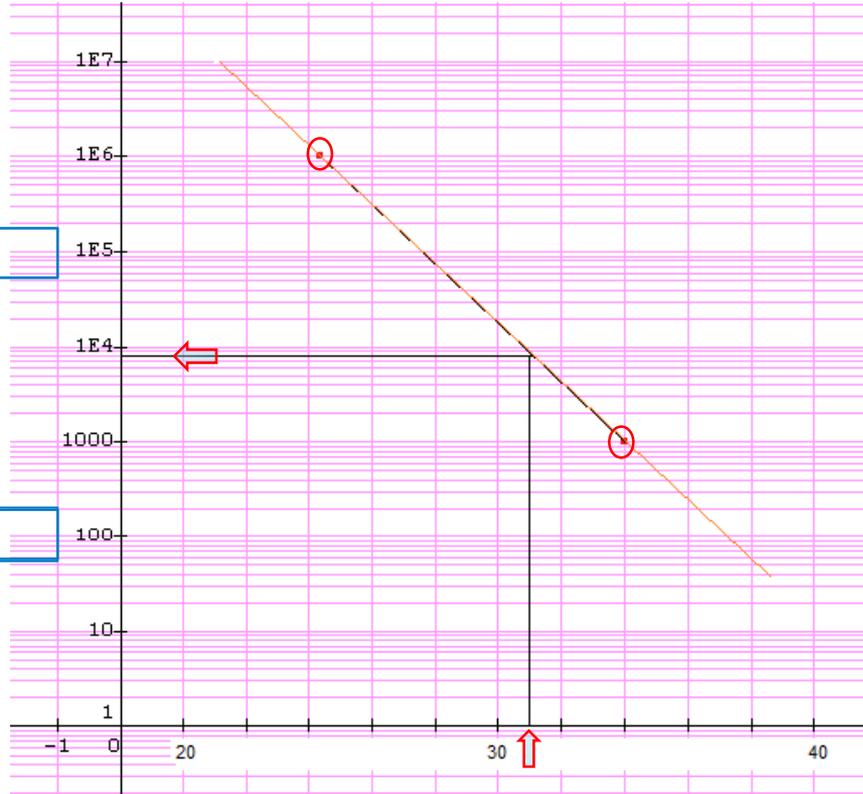
# Berechnung der Konzentration in der Probe

$y = \text{Viruslast}$   
(Kopien/ml)

Analyte Name	Ct
HIV-1	31.1
IQS-H	24.6
IQS-L	34.1

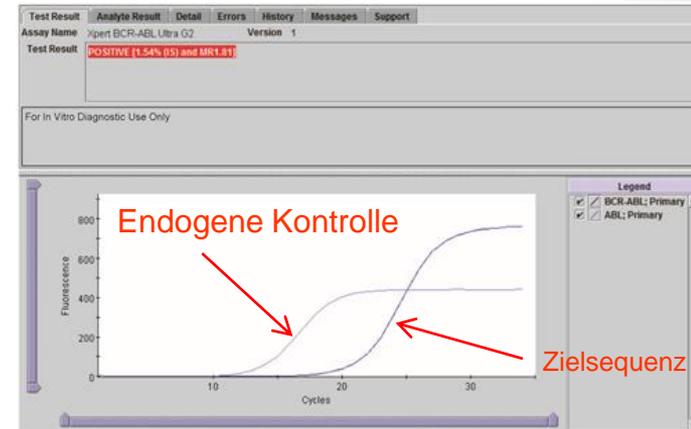
IQS-H

IQS-L



# Relative Quantifizierung bei der Echtzeit-PCR (Beispiel: Xpert BCR-ABL)

- Bei der relativen Quantifizierung wird das Niveau einer Zielsequenz gemessen und relativ zu dem einer internen Kontrolle (Referenzgen) ausgedrückt.
- Das Referenzgen kann endogen sein. Daher kann es auch sicherstellen, dass genügend Probenmaterial im Test eingesetzt wird.
- Aufgrund ihrer geringen Variabilität kann die endogene Kontrolle auch zum Nachweis einer Hemmung der PCR eingesetzt werden.



**POSITIV [1,54% (IS) und MR1,81]**

Beispiel für ein Testergebnis mit dem Xpert BCR-ABL Ultra

# Schlussfolgerung

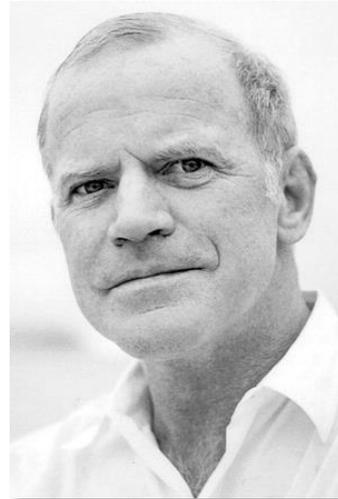
RT-PCR ist:

- Schnell
- Sensitiv
- Genau
- Einfach durchzuführen
- Potenziell quantitativ

“

**Die Wissenschaft überrascht uns jedes Jahr aufs Neue mit unerwarteten Erkenntnissen und erstaunlichen Geräten.**

*Kary Mullis*





Vielen Dank.

[www.Cepheid.com](http://www.Cepheid.com)

