

6.6 RT-PCR

Das PCR-Verfahren (engl. “polymerase chain reaction”), welches bereits 1983 entdeckt wurde, ist heute eine der zentralen Methoden der Molekularbiologie und dient zur Analyse von DNA und RNA aller Lebewesen...

Das PCR-Verfahren (engl. “polymerase chain reaction”), welches bereits 1983 entdeckt wurde, ist heute eine der zentralen Methoden der Molekularbiologie und dient zur Analyse von DNA und RNA aller Lebewesen. Ihr geistiger Vater, Kary B. Mullis (Kalifornien), wurde dafür 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Seither wurde die PCR ständig verbessert. Mit der RT-TaqMan-PCR (Reverse Transkriptase-TaqMan PCR) steht heute in der BVD-Diagnostik eine Methode zur Verfügung, welche nicht nur hochspezifisch und ausgesprochen sensitiv ist, sondern auch für die Massen- diagnostik geeignet ist. Im Prinzip beruht die PCR auf der Vervielfältigung eines definierten, im Ausgangsmaterial (Probe) vorhandenen DNA-Abschnitts. In einem ersten Schritt werden Primer hergestellt. Es handelt sich dabei um zwei Oligonukleotide, deren Sequenz nach den Regeln der Basenpaarung komplementär zu den Anfangssequenzen der beiden zu vermehrenden DNA-Stränge sind. Durch langsames Erhitzen des Gemisches auf 94° werden die DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturation). Die anschließende Absenkung der Temperatur (auf 40 - 65°) führt zur Hybridisierung der Primer mit den DNA-Anfangssequenzen (Annealing). Ausgehend von diesen Primern kopiert die zugegebene Polymerase nun die DNA-Stränge. Die ideale Arbeitstemperatur der Polymerase liegt bei 72°C. Am Ende eines Zyklus liegt eine exakte Kopie der Ausgangs-DNA vor. Durch vielfache Wiederholung dieses Vorgangs gelingt es, aus einer sehr geringen Menge DNA innert kurzer Zeit Millionen von Kopien herzustellen. Diese können in einem Gel von anderen DNA-Molekülen getrennt und in einer Bande sichtbar gemacht werden. Mit entsprechender Modifikation lässt sich die Methode auch zur Vermehrung von RNA nutzen. Hier kommt die Reverse Transkriptase (RT) ins Spiel. Dieses Enzym konvertiert in einem der eigentlichen PCR-Reaktion vorgeschalteten Schritt die RNA in DNA, genauer gesagt in cDNA (complimentary DNA).