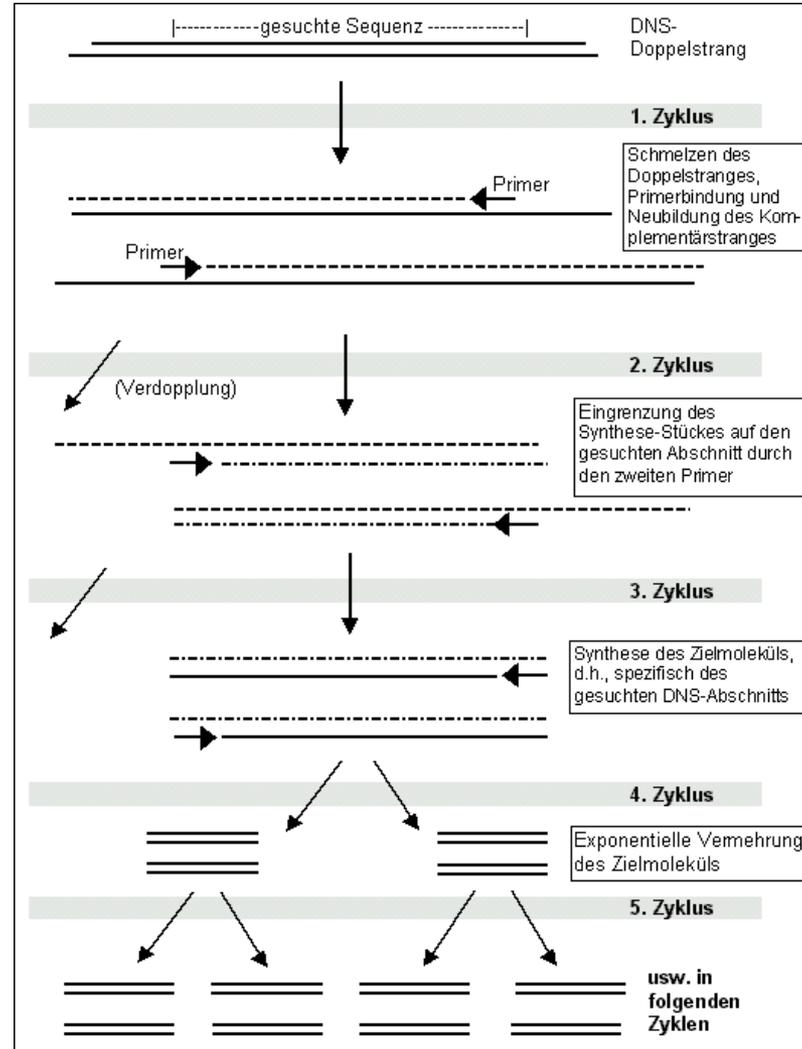


Realtime PCR

2.12.2013

Jonathan Kliman

PCR Schema



Realtime PCR

- Quantifizierung der PCR-Produkte mittels Fluoreszenz-Messungen
- Während des PCR-Zyklus (in Echtzeit) erfasst
- Fluoreszenz nimmt direkt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu
- Bei anderen quantitativen PCR-Methoden, Quantifizierung erst nach Ablauf der PCR (Gelelektrophorese)

Methoden

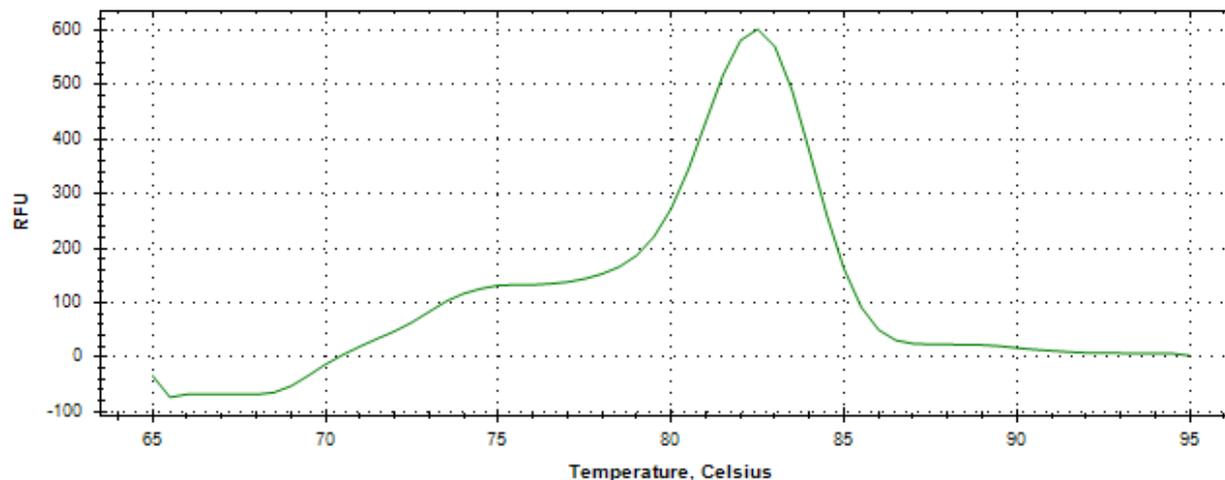
- Interkalierende Farbstoffe
- Lux-Primer
- FRET-Sonden
 - LightCycler-Sonden (auch Hybridisierungs-Sonden)
 - TaqMan-Sonden (auch Hydrolyse-Sonden)
 - Molecular Beacons

Interkalierende Farbstoffe

- DNA-Farbstoffe (z. B. Ethidiumbromid oder SYBR Green I)
- Lagern sich in die DNA ein (interkalieren)
- Messung am Ende der Elongation in jedem Zyklus
- Nachteile
 - geringe Spezifität (→ Schmelzkurvenmessung)

Schmelzkurvenmessung

- Kontinuierliche Temperaturerhöhung
- Nicht spezifische Doppelstränge denaturieren vor spezifischen Verbindungen
- Dabei wird ein Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR Green I)
- Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments





Lux-Primer

- Lux-Primer: mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonucleotide
- Werden diese Primer eingebaut, nimmt die Fluoreszenz zu

FRET-Sonden

- Basieren auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)
 - Energie eines Angeregten Fluoreszenzfarbstoffes (Donor) wird an einen zweiten in der Nähe befindlichen Farbstoff (Akzeptor) übertragen. (Unterdrückung der Fluoreszenz durch den Akzeptor)
 - Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu ($>6\text{nm}$ / $> 5\text{-}7$ Nukleotide), so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt.

LightCycler-Sonden (Hybridisierungs-Sonden)

- Die einfachste Möglichkeit der Nutzung des FRET
- Zwei verschiedene, jeweils mit FRET-Donor/-Akzeptor markierte Oligonukleotide
- Binden nebeneinander an die Ziel-Sequenz
- Bringen die Fluorochrome in eine für den FRET ausreichende Nähe
- Auch hier kann sich eine Schmelzkurvenanalyse anschließen.

LightCycler-Sonden



TaqMan-Sonden

- TaqManSonde: An einem Ende mit Akzeptor (= Quencher), am anderen Ende mit Donor-Fluoreszenzfarbstoff (= Reporter) markiert
- Taq-Polymerase (besitzt zusätzlich eine Exonuklease-Aktivität → spaltet im Verlauf der Kettenverlängerung das 5'-Ende der Probe samt des Donors ab und ersetzt diese Nucleotide)
- Baut die Taq-Polymerase während der Synthese des Gegenstranges die Sonde am 5'-Ende ab, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander
- Steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.
- Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

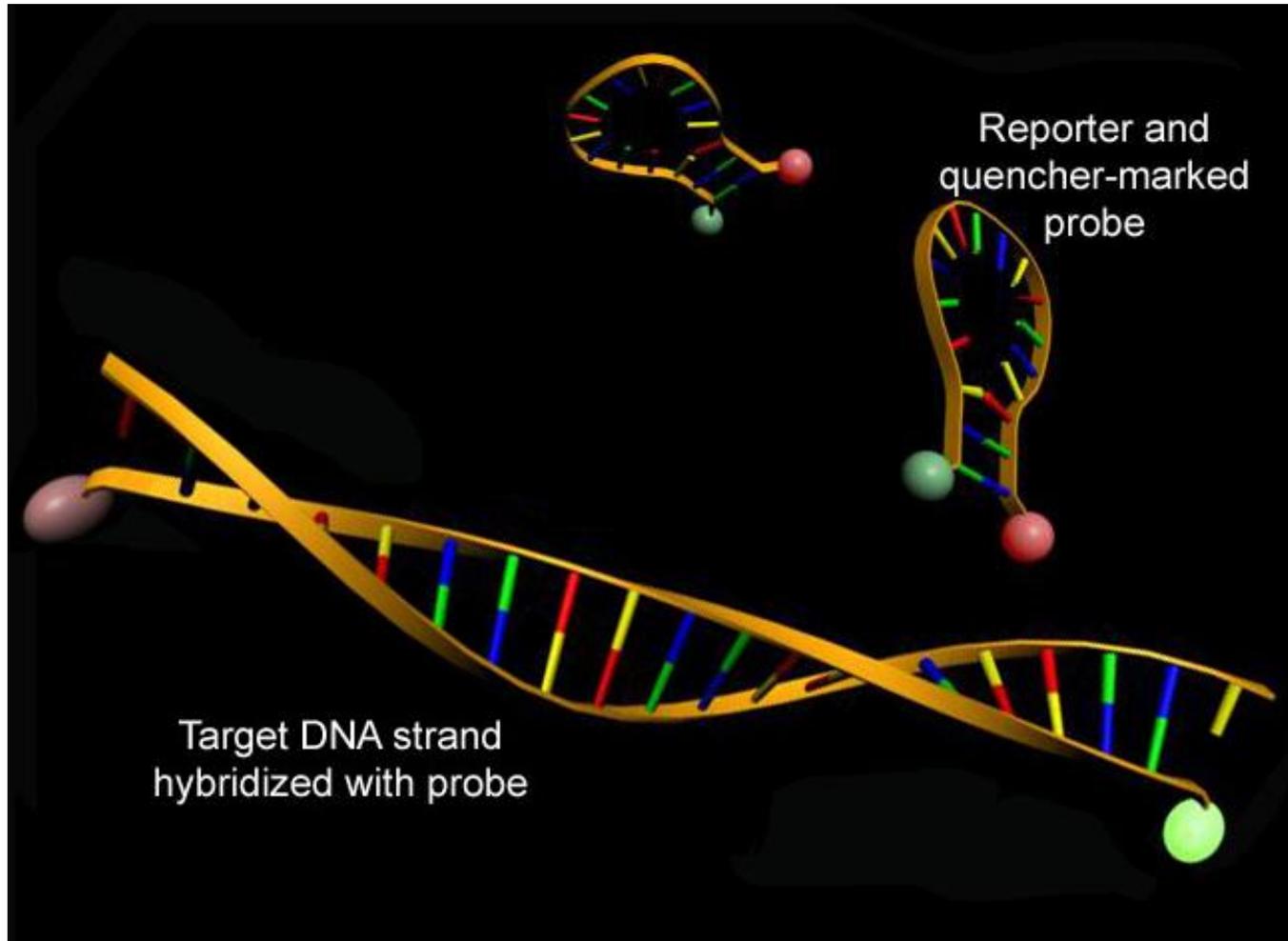
TaqMan-Sonden



Molecular Beacons

- Molecular Beacons: Oligonucleotide. Mit einem Reporter und einem Quencher gekoppelt.
- Die Nucleotide am 5'-Ende zum 3'-Ende komplementär → charakteristische Sekundärstruktur (stem loop / Haarnadelstruktur)
- Reporter durch seinen geringen Abstand zum Quencher keine Fluoreszenz.
- Anlagerung der Schleifen-Region an eine komplementäre DNA-Sequenz während eines PCR-Zyklus
- Abstand zwischen Quencher und Reporter vergrößert → Reporter-Fluoreszenz.

Molecular Beacons





Christian
Doppler
Laboratory

for
Cardiac and Thoracic
Diagnosis & Regeneration



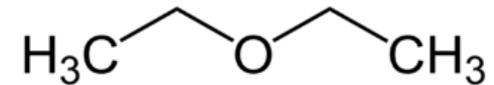
MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

Vielen Dank für die Aufmerksamkeit

Quellen:

- <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>
- http://home.arcor.de/naturwissenschaften/Gentechnik/referate/unsavedneue_seite_2htm.htm
- <http://bio-rad.com>
- <http://www.wikipedia.de>

„Was ist eigentlich Äther?“



= Diethylether, Schwefelether, Narkoseether

Herstellung aus Ethanol und Schwefelsäure

Ether bildet *bei Bestrahlung mit Licht und Kontakt mit Sauerstoff hochexplosive Peroxide*

In der Physik früher als Trägermedium für elektromagnetische Wellen (Äther = griech. „blauer Himmel“)