

# Quantitative Real Time PCR: Prinzip und Anwendung am Beispiel GVO-Analytik und dem Nachweis von Rindfleisch in Wurstwaren

P. REMLER

Um eine einfache Quantifizierung der PCR zu ermöglichen, war man bemüht, einen sogenannten homogenen Assay zu entwickeln, bei dem Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelang erstmals 1991 mit dem von HOLLAND et al. beschriebenen 5'-Nuclease PCR Assay unter Ausnutzung der 5'-Exonukleaseaktivität der *Taq* Polymerase zur Detektion der Sequenz-spezifischen Amplifikation.

Bei der "real-time" PCR wird während der PCR ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das proportional zur Zunahme des PCR-Produktes ist und online direkt im PCR-Reaktionsgefäß gemessen wird. Das erlaubt ein Verfolgen der Reaktion in der logarithmischen Phase der PCR, wodurch die Messung der Effizienz möglich wird.

Die Sonde (TaqMan-Sonde, Probe) ist ein Oligonukleotid mit einer Sequenz komplementär zum amplifizierten Frag-

ment. Dadurch erhält man eine Spezifität, die einer PCR mit anschließendem Southernblot und Hybridisierung entspricht.

Die Sonde ist an ihren Enden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter und einem Quencher, konjugiert. Der fluoreszente Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Es stehen mehrere Farbstoffe, die sich im Emissionsspektrum ausreichend unterscheiden, zur Verfügung. Den verschiedenen Reporterfarbstoffen (Multiplex-Anwendung des TaqMan<sup>®</sup> PCR Systems sind also möglich) steht jeweils der Quencher-Farbstoff gegenüber.

Der Quencher wird über ein Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden. Schließlich wird die Sonde noch chemisch phosphoryliert, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden.

Ist das Oligonukleotid intakt, wird bei einer Anregung des Reporters durch den

Laser die Fluoreszenzenergie auf den Quencher übertragen und dieser emittiert ein Lichtsignal (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Wird nun das Oligonukleotid durch die 5'-Exonukleaseaktivität der *Taq* Polymerase gespalten, werden Reporter und Quencher räumlich getrennt und man erhält ein Lichtsignal vom Reporter.

Wenn sich die Emissionsspektren von Reporter und Quencher ausreichend unterscheiden, kann man aus dem Gesamtspektrum die Zunahme des Reportersignals berechnen.

Mit Hilfe der "real-time" quantitativen PCR hat man eine Methode in der Hand, die eine gute und reproduzierbare Quantifizierung von PCR und RT-PCR bei Verwendung von inhibitorfreier DNA und RNA erlaubt. Das Hauptproblem ist nicht mehr die quantitative PCR, sondern die Isolierung sauberer, inhibitorfreier DNA in ausreichender Menge aus den verschiedenen Lebensmittelmatrizes.

---

**Autor:** Dr. Peter REMLER, Institut für Lebensmittelchemie und -technologie, Technische Universität Graz, Petersgasse 12, A-8010 GRAZ

---



