



»Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) –  
Grundlage für die medizinische Diagnostik«

## Hain Lifescience – Ihr kompetenter Partner

Seit über 15 Jahren ist Hain Lifescience Ihr zuverlässiger und innovativer Partner im Bereich der molekularbiologischen Diagnostik. Unsere Angebotspalette reicht von der Probenentnahme über den Transport bis zur Isolierung und Abarbeitung. Auch die erforderlichen Geräte erhalten Sie direkt bei uns. Unsere Testsysteme sind kombinierbar, schnell und einfach abzuarbeiten bzw. auszuwerten.

Dem Großteil unserer Testsysteme liegt das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion zugrunde. Mit dieser Broschüre möchten wir Ihnen einen kurzen Einblick in diese wichtige Technik geben.

## Das wissen Sie schon!

Die Desoxyribonukleinsäure (oder im Englischen *desoxyribonucleic acid* = DNA) ist bei allen Lebewesen, sowie bei einigen Viren Träger der Erbinformation. Sie besteht aus vier verschiedenen Grundbausteinen, den **Nukleotiden**. Diese unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung durch die **Basen** Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Zwei gegenüberliegende Polynukleotidstränge bilden zusammen eine Doppelhelix (Abb. 1).

Der DNA-Abschnitt, der die Information für ein spezifisches Protein enthält, wird als **Gen** bezeichnet. Diese Information ist in Form der spezifischen Abfolge der vier Basen (A, T, C und G) verschlüsselt.

Das gesamte Erbgut eines Lebewesens oder Virus ist das **Genom**. Dieses befindet sich beim Menschen im Zellkern (Abb. 2) und bei Bakterien frei in der Zelle (Abb. 3). Viren tragen ihr Genom im Capsid (Abb. 4).



Abb. 1: DNA- Doppelhelix

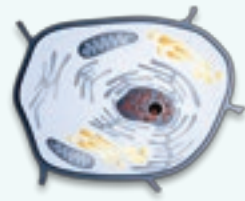


Abb. 2: Menschliche Zelle



Abb. 3: Bakterium



Abb. 4: Virus

## Was ist eine PCR?

Keine molekularbiologische Technik hat die medizinische Diagnostik so schnell und grundlegend verändert wie die Polymerase-Kettenreaktion oder im Englischen *polymerase chain reaction* (PCR). Der Begriff „Kettenreaktion“ beschreibt die Tatsache, dass nach vielen Verdopplungsschritten schließlich eine exponentielle Vervielfältigung der ursprünglichen DNA erzielt wird (Abb. 5). Die PCR ermöglicht so die spezifische Vervielfältigung einer Ausgangs-DNA innerhalb kürzester Zeit. Mittels PCR können daher auch kleinste Ausgangsmengen an DNA nachgewiesen und untersucht werden. Dies kann aus fast jedem beliebigen Probenmaterial erfolgen, wie z. B. aus Blut, Sekreten, Abstrichen, Nahrungsmitteln oder Fossilien.

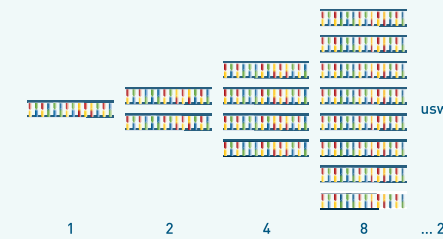


Abb. 5: Exponentielle Vervielfältigung der DNA

## Welche Komponenten sind für die PCR notwendig?

Zur Durchführung einer PCR wird isolierte DNA aus dem zu untersuchenden Probenmaterial benötigt. Der DNA-Abschnitt, der vervielfältigt werden soll, wird als Template bezeichnet. Durch mechanische oder alkalische Methoden wird die in den Zellen enthaltene DNA freigesetzt.

Für die PCR (synonym werden auch die Begriffe Amplifikation oder Vervielfältigung verwendet) benötigt man außerdem folgende Komponenten (Abb. 6):

- Zwei kurze DNA-Stücke (**Primer**), um auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen
- Eine ausreichende Menge der vier **Nukleotid-Bausteine** A, C, G und T
- Ein hitzestabiles **Enzym** zur Vervielfältigung von DNA (DNA-Polymerase)
- **Puffer**, die eine für die DNA-Polymerase geeignete physiologische Umgebung schaffen
- **Salze**, wie z. B. Magnesium-Ionen, die für die Funktion der DNA-Polymerase essenziell sind.

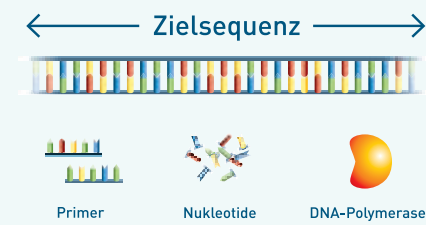


Abb. 6: Komponenten für die PCR



## Wie wird eine PCR durchgeführt?

Die für die PCR notwendigen Komponenten werden in einem sogenannten Mastermix zusammenpipettiert. Dieser wird dann auf einzelne Reaktionsgefäße verteilt, in die anschließend die zu untersuchende isolierte DNA gegeben wird. Das Endvolumen pro PCR-Ansatz beträgt in der Regel zwischen 20 und 100  $\mu\text{l}$ . Die Amplifikation erfolgt in einem Thermocycler. Dabei handelt es sich um einen programmierbaren Heiz-Kühlblock, der in kürzester Zeit die für die PCR erforderlichen Temperaturbereiche zwischen 4°C und 95°C ansteuern kann.

## Wie funktioniert die PCR?

Das Grundprinzip der PCR ist einfach. Sie beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Reaktionsschritten:

**1. Denaturierung:** Im ersten Schritt wird der PCR-Ansatz auf ca. 95 °C erhitzt. Dabei trennt sich die DNA-Doppelhelix in die beiden komplementären Einzelstränge auf (Abb. 7a).

**2. Anlagerung der Primer:** Durch das anschließende Absenken der Temperatur auf 55–65°C kann sich an jeden der beiden DNA-Einzelstränge der passende Primer anlagern (Abb. 7b). Die Primer sind so gewählt, dass sie komplementär zu den Anfangs- und Endbereichen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind. Wenn die Sequenz der Primer nicht vollständig mit der Basenabfolge der Ausgangs-DNA übereinstimmt, erfolgt keine Anlagerung.

**3. Verlängerung:** Die Temperatur wird wiederum erhöht, diesmal auf die optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase (68–72°C). Dadurch lagert sich die DNA-Polymerase an die Primer an und fügt komplementäre Nukleotid-Bausteine dem neuen Strang hinzu (Abb. 7c). Anschließend wird der Reaktionsansatz erneut auf ca. 95°C erhitzt und es beginnt ein neuer PCR-Zyklus.

Auf diese Weise entstehen nach 20 Zyklen aus einem einzigen DNA-Doppelstrang etwa eine Million und nach 35 Zyklen bereits über eine Milliarde identische Kopien. Die auf diese Weise vervielfältigte DNA kann nun analysiert werden.

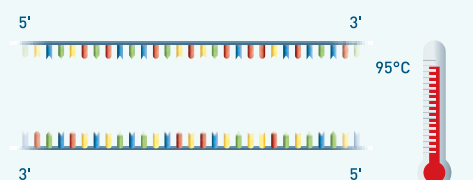


Abb. 7a: Denaturierung

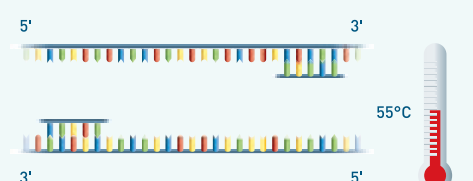


Abb. 7b: Primer-Anlagerung

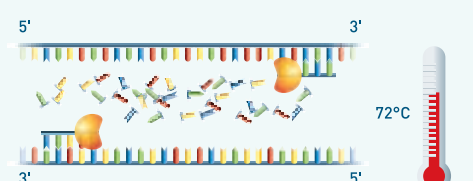


Abb. 7c: Verlängerung

## Worauf ist bei der Durchführung einer PCR zu achten?

Die PCR ist eine bequeme Möglichkeit, DNA zu kopieren und zu vermehren. Selbst sehr kleine DNA-Mengen können mittels PCR vervielfältigt und damit nachgewiesen werden. Dies betrifft jede Art von DNA, die sich in der zu untersuchenden Probe befindet, also auch solche, die ungewollt, z. B. vom vorherigen Experiment, darin enthalten sein könnte.

Daher müssen einige Vorkehrungen getroffen und einfache Regeln eingehalten werden, um eine unerwünschte Verschleppung der DNA (Kontamination) zu vermeiden und ein optimales PCR-Ergebnis sicher zu stellen.

### Probenentnahme und Transport

Die Probenentnahme sollte stets mit Einmal-Handschuhen erfolgen. Das Probenmaterial sollte sofort in die Probengefäße (z. B. EDTA-Röhrchen für Blutuntersuchungen oder Abstrichröhrchen) überführt, fest verschlossen und ungeöffnet ins Labor transportiert werden. Probenröhrchen, die Heparin enthalten, sind für PCR-Untersuchungen ungeeignet, da Heparin die PCR hemmt. Bei der Verwendung von Abstrichtupfern ist darauf zu achten, dass möglichst nur solche verwendet werden, die für das jeweilige Testsystem empfohlen bzw. validiert sind.

### Räumliche Trennung der Arbeitsbereiche

Je nach räumlichen Gegebenheiten wird für molekularbiologisches Arbeiten eine Raumtrennung empfohlen. Für jeden Arbeitsbereich ist ein eigener Satz Pipetten und Filterspitzenboxen empfehlenswert.

Bestenfalls sollten folgende Arbeitsbereiche getrennt werden:

- **DNA-Isolierungs-Bereich:** Hier wird DNA aus Probenmaterial isoliert.
- **Prä-PCR-Bereich:** Hier wird der Mastermix für die PCR angesetzt. Dieser Raum muss frei von kontaminierender DNA sein.
- **Detektions-Bereich oder Post-PCR-Bereich:** Hier wird die PCR und anschließend die Analyse der PCR-Produkte durchgeführt. In diesem Bereich liegt die vermehrte DNA in hoher Kopienzahl vor. Es ist daher darauf zu achten, dass Labormaterialien wie Pipetten oder Reaktionsgefäßständer aus diesem Bereich nicht zurück in den DNA-freien Prä-PCR-Bereich gebracht werden!

### Mitführen von Kontrollen

Falls trotz aller Vorsichtsmaßnahmen einmal DNA verschleppt wird, kann diese Kontamination durch das Mitführen einer Negativkontrolle aufgedeckt werden. Diese enthält zwar alle PCR-Komponenten, nicht aber die zu vervielfältigende DNA.

Es ist außerdem ratsam, von Zeit zu Zeit eine Positivkontrolle einzusetzen.

### Dekontamination des Arbeitsplatzes

Alle benutzten Gegenstände und Oberflächen sollten vor Beginn und nach Beendigung der Arbeiten mit einer frisch angesetzten Dekontaminationslösung (z. B. 0,5%-ige Natriumhypochloritlösung) gründlich gereinigt werden. Alkoholische Lösungen zur Flächendesinfektion wie z. B. 70%-iges Ethanol sind ungeeignet, da sie die möglicherweise zurückgebliebene DNA nicht beseitigen können.



## Was ist noch zu beachten?

Neben den bereits genannten Vorkehrungen sollten beim Arbeiten mit DNA zusätzlich die folgenden einfachen Regeln beachtet werden:

- Bei allen Arbeitsschritten empfiehlt sich das Tragen von **Handschuhen** und eines **Labormantels**.
- Der Mastermix sollte immer **frisch** angesetzt und gut gemischt, aber nicht gevortext werden, da dies die DNA-Polymerase beeinträchtigt.
- Beim Mitführen einer **Positivkontrolle** sollte diese zuletzt pipettiert werden. Das entsprechende Gefäß wird nur kurz zur Entnahme geöffnet und sofort wieder verschlossen.
- Gefäße sollten grundsätzlich beim Arbeiten nicht zu lange offen stehen.
- Es ist generell zu vermeiden, über geöffneten Gefäßen zu arbeiten.



## Was sind die Vorteile der PCR?

In vielen Bereichen der medizinischen Diagnostik hat die PCR klassische mikrobiologische und/oder biochemische Nachweisverfahren abgelöst bzw. ergänzt, da sie einige Vorteile bietet:

- Die DNA eines Erregers oder ein bestimmter Genabschnitt wird **direkt** nachgewiesen. Genprodukte, die eventuell erst später detektierbar sind, müssen nicht berücksichtigt werden.
- Die PCR liefert **rasch** ein Ergebnis. In der Regel ermöglicht ein PCR-Nachweis bereits nach wenigen Stunden eine zuverlässige Aussage, während mit klassischen Verfahren teilweise erst nach Tagen bis Wochen ein Ergebnis vorliegt.
- PCR-Verfahren sind **sehr spezifisch**. Dies liegt in der hohen Spezifität der Primersequenz begründet. Dadurch wird eine sehr hohe diagnostische Sicherheit erreicht.
- Die PCR ist zudem **sehr sensitiv**. Schon kleinste Mengen Ausgangs-DNA sind für einen korrekten Nachweis ausreichend.
- Darüber hinaus ermöglicht die PCR auch eine **Mengenangabe** der eingesetzten Ausgangs-DNA. Diese Methode der exakten Quantifizierung wird als Real-time-PCR bezeichnet.



## In welchen Fällen ist die PCR besonders geeignet?

Als hochsensitive und -spezifische Nachweismethode ist die PCR im Bereich der **mikrobiologischen und virologischen Diagnostik** besonders geeignet:

- Für den Nachweis von Krankheitserregern, die schwierig, langsam oder nicht kultivierbar sind (z. B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, HIV).
- Für Krankheitserreger, bei denen ein rascher Nachweis ausschlaggebend ist (z. B. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-resistente Enterokokken), um unverzüglich adäquate Hygienemaßnahmen einzuleiten.
- In der akuten Phase von Erkrankungen, noch bevor Antikörper nachgewiesen werden können (z. B. nach einer HCV- oder HIV-Infektion).
- Bei immungeschwächten Personen, die nur wenige oder keine spezifischen Antikörper produzieren können (z. B. HIV-Infizierte, Patienten nach einer Organtransplantation oder einer zytostatischen Therapie).
- Als Direktmarker einer Virusinfektion (z. B. bei einer HSV-Infektion).
- Bei unklarer Serologie (z. B. isolierter HBc AK bei Hepatitis B).
- Für die Kontrolle des Therapie-Erfolges (z. B. nach Interferon-Behandlung bei Hepatitis B).

Auf dem Gebiet der **humangenetischen Diagnostik** werden PCR-Verfahren eingesetzt:

- Zur Erkennung von Erbkrankheiten oder erblichen Vorbelastungen für bestimmte Krankheitsbilder (z. B. Thrombophilie, Hereditäre Hämochromatose).
- Bei Vaterschaftstests.
- In der Forensik (z. B. genetischer Fingerabdruck).
- Bei der Klonierung von Genen. Dies ist ein Vorgang bei dem ein Gen aus einem Organismus isoliert und anschließend in einen anderen eingepflanzt wird. Diese Technik findet z. B. bei der Herstellung von Arzneimitteln Verwendung.



# Was bietet Ihnen Hain Lifescience?

Die Testsysteme von Hain Lifescience basieren auf der PCR-Technologie. Neben den Reagenzien zur Durchführung der PCR sind auch alle Komponenten für die anschließende Detektion in den Kits enthalten. Wir bieten Ihnen drei verschiedene Technologieplattformen und haben damit für jeden Bedarf die passende Lösung.

## Die FluoroType®-Technologie

Die **FluoroType®**-Technologie ermöglicht Ihnen moderne PCR-Diagnostik aus Direktmaterial mit hohem Anwenderkomfort. PCR und Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden laufen vollautomatisch in einem Arbeitsschritt ab. Mit dem innovativen **FluoroType®**-System bieten wir Ihnen eine Komplettlösung für Ihre tägliche Routine: Von der DNA-Isolierung bis zum Ergebnis erhalten Sie alles aus einer Hand – in gewohnt hoher Qualität und mit maximaler Flexibilität.



## Die DNA•STRIP-Technologie

Die Stärken der **DNA•STRIP**-Technologie liegen in der Verbindung von hohem Informationsgehalt und effizienter Abarbeitung. Mittels Multiplex-PCR gibt Ihnen ein Test beispielsweise gleichzeitig Auskunft über verschiedene Bakterienspezies sowie deren Resistenzen. Interne Kontrollen dokumentieren die Validität Ihrer Ergebnisse. Tests der **GenoType**-Serie sind für kleine und große Serienlängen geeignet. Sie können wahlweise manuell oder automatisiert abgearbeitet werden.



## Die GenoQuick®-Technologie

Die **GenoQuick®**-Technologie erlaubt eine schnelle und zuverlässige Diagnostik von Direktmaterial. Abarbeitung und Ergebnisauswertung sind denkbar einfach, denn PCR und Hybridisierung werden in einem Arbeitsschritt durchgeführt. Die anschließende Detektion erfolgt innerhalb von nur 10 Minuten. Hierzu verfügen die Teststreifen über drei Banden, von denen eine das Ergebnis liefert und zwei als Kontrollen dienen. Die **GenoQuick®**-Technologie ist ein sehr flexibles System, daher können sowohl Einzelproben als auch große Serienlängen effizient und ökonomisch abgearbeitet werden.



## Übrigens ...

Für die Abarbeitung der Testsysteme ist nur eine minimale Geräteausstattung erforderlich. Wir bieten Ihnen individuelle Gerätelösungen, maßgeschneidert nach Ihrem Bedarf. Ausführliche Schulungen, Produktdemonstrationen und Einweisungen in den Gebrauch der Geräte sind für uns selbstverständlich.

**Hain Lifescience GmbH**

Hardwiesenstraße 1 | 72147 Nehren

Tel.: 0 74 73- 94 51- 0 | Fax: 0 74 73- 94 51- 31

E-Mail: [info@hain-lifescience.de](mailto:info@hain-lifescience.de) | [www.hain-lifescience.de](http://www.hain-lifescience.de)

