

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung zur Verwendung bei der Realtime-PCR

Nils Scharke, iNano

Abstract

Die Verwendung neuartiger Seltenerd-Komplexe in Verbindung mit zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung liefert bei der Realtime-PCR schnellere Ergebnisse und produziert dabei weniger Messfehler.

Einleitung

Die **Polymerase Chain Reaction** (Polymerase Kettenreaktion) ist eine Methode, um die Erbsubstanz DNA zu vervielfältigen (Amplifikation).

Sie wird in biologischen und medizinischen Laboratorien angewandt um z.B. genetische Fingerabdrücke zu erstellen, pathogene Keime nachzuweisen oder um Erbkrankheiten frühzeitig zu erkennen.

Dabei durchläuft eine Probe bestehend aus der isolierten DNA, dem Enzym Taq-Polymerase, einem Primer sowie einer geeigneten Pufferlösung eine Serie von ca. 40 Temperaturzyklen.

Ein Zyklus setzt sich aus drei Stufen zusammen, in denen jeweils eine Temperatur für üblicherweise ca. 30 bis 45 Sekunden gehalten wird.

Nach 40 Kopiervorgängen beinhaltet die Probe bei exponentiellem Wachstum: $2^{40} = 1,1$ Milliarden DNA-Doppelstränge.

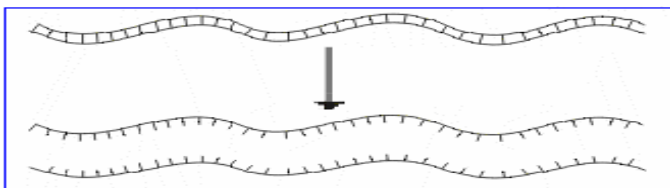


Abb. 1 zeigt die erste Stufe. **Denaturierung:** Probe wird auf 94°C – 96°C erhitzt um den DNA-Doppelstrang aufzubrechen.

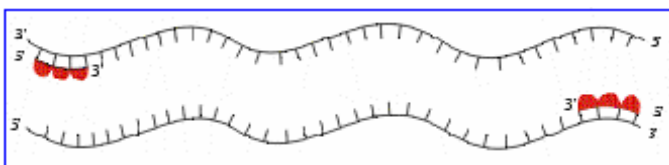


Abb. 2 zeigt die zweite Stufe. **Primerhybridisierung:** Probe wird auf 55°C – 65°C abgekühlt, sodass sich die Primer anlagern können.

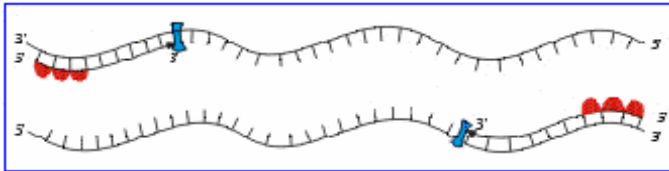


Abb. 3 zeigt die dritte Stufe. **Elongation:** Probe wird auf $68^{\circ}\text{C} - 72^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Die Polymerase füllt die fehlenden Stränge mit freien Nucleotiden auf. Es resultiert eine Verdoppelung der Erbsubstanz.

Die Realtime-PCR erlaubt zudem eine quantitative Bestimmung der vervielfältigten Substanz im laufenden Betrieb. Sollte tatsächlich die Ausgangssubstanz vervielfältigt worden sein, so wird der Marker aktiviert und bei einer Anregung mit UV-Licht fluoreszieren.

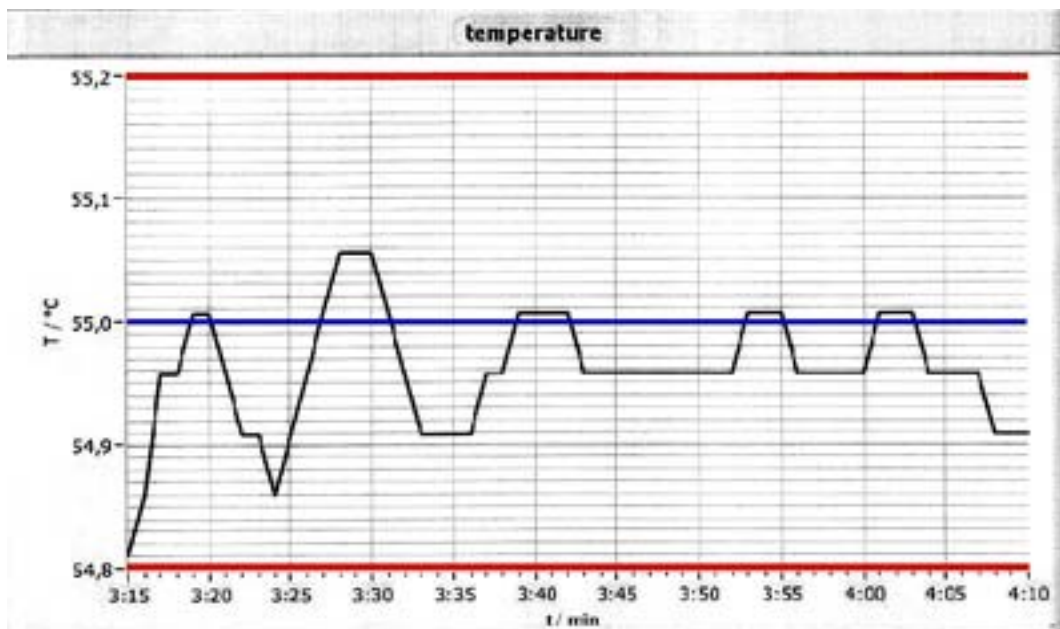


Abb. 4: Diagramm (Temperatur vs. Zeit) mit einem Tunnel von $\pm 0,2\text{K}$ verdeutlicht hohe stationäre Genauigkeit

Das Verfahren

Hierzu wurde ein Thermocycler mit 120W Heiz- bzw. Kühlleistung entwickelt, der die gewünschte Solltemperatur schnell erreicht und mit einer Sollwert-Abweichung von maximal $\pm 0,2\text{K}$ eine hohe stationäre Genauigkeit aufweist. Abb. 5 zeigt den schematischen Aufbau des aus Kupfer gefertigten Probenhalters im Längs- und Querschnitt. Hier sind auch die im rechten Winkel zueinander angeordneten Bauteile zu erkennen.

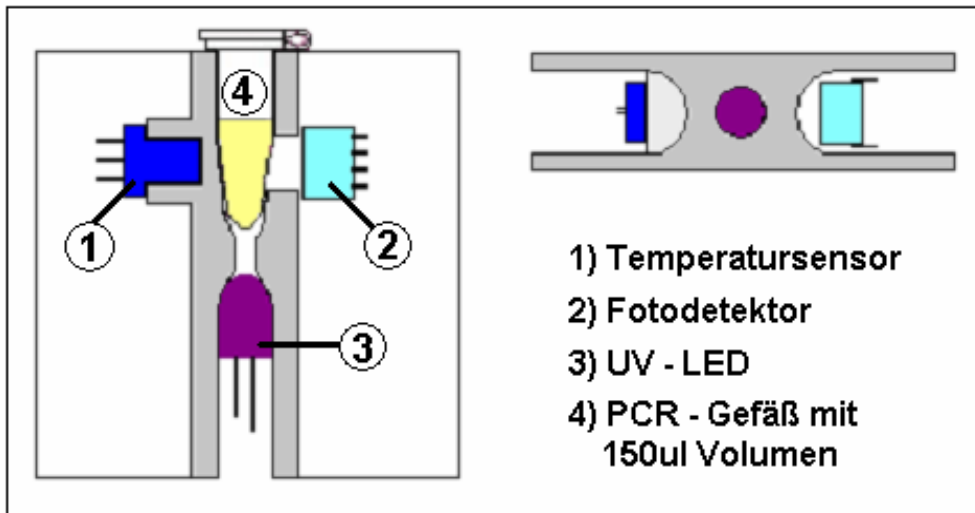


Abb. 5: schematischer Aufbau des Probenhalters

Im Gegensatz zu kommerziellen Systemen werden neuartige Seltenerd-Komplexe als Marker verwendet, die eine detektierbare Fluoreszenz von bis zu 2ms aufweisen. Diese Farbstoffe wurden von der FH Münster entwickelt und werden derzeit noch weiter optimiert. Sie ermöglichen die Verwendung einer gepulsten Anregungs-Lichtquelle.

Die Anregungswellenlänge des Farbstoffs liegt bei 375nm und die Emissionswellenlänge bei 613 nm. Aufgrund dieser großen Stokes'schen Verschiebung ist die Detektion des vom Marker emittierten Signals einfach zu realisieren.

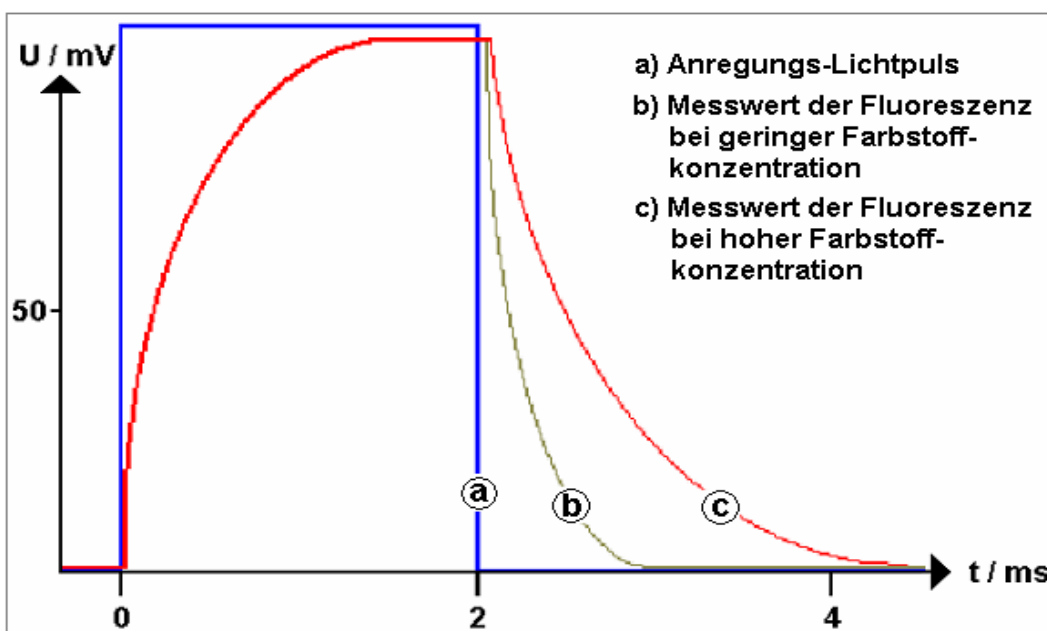


Abb. 6: Diagramm „Detektorspannung vs. Zeit“ verdeutlicht den Betrieb mit gepulster Anregungs-Lichtquelle

Die Signaldetektion erfolgt erst $180\mu\text{s}$ nach Abschalten der Anregungslichtquelle, nachdem die Fluoreszenz etwaiger Verunreinigungen abgeklungen ist. Dies bietet gegenüber der Detektion in herkömmlichen Systemen deutliche Vorteile: Substanzen, die die Probe verunreinigen und bei der Amplifikation ebenfalls vervielfältigt werden, werden bei dieser Art der Messung nicht berücksichtigt und können dementsprechend auch keine falschen Messwerte verursachen. Dies wiederum lässt es zu, deutlich früher während einer ablaufenden PCR, eine Aussage über das zu erwartende Endergebnis zu treffen.

Desweiteren ist bei diesem Verfahren keine energiereiche Laserstrahlung oder eine aufwändige Optik zur Detektion erforderlich. Unser Prototyp ist mit Low-Cost Bauteilen realisiert, die geringe Fertigungskosten ermöglichen.

Der in Abb. 7 gewählte Ausschnitt der unter LabView programmierten Steuerungssoftware zeigt 2 von 40 Zyklen. Die Temperaturstufen 1 bis 3, die für den eigentlichen Ablauf der PCR zuständig sind, wurden bereits erläutert.

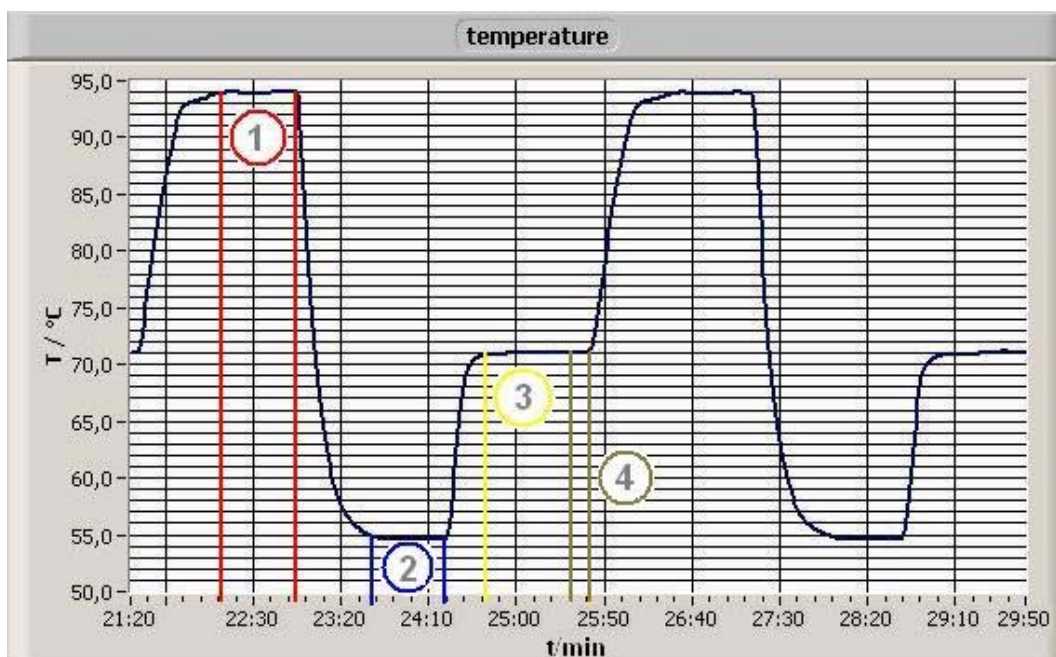


Abb. 7: Darstellung zweier Zyklen als Plot (Temperatur vs. Zeit) der unter LabView erstellten Steuerungssoftware

Die 4. Stufe bezeichnet nun die nach jedem Kopiervorgang folgende Detektion. Auch hier wird dem Anwender die Signalauswertung grafisch und in Echtzeit angezeigt.

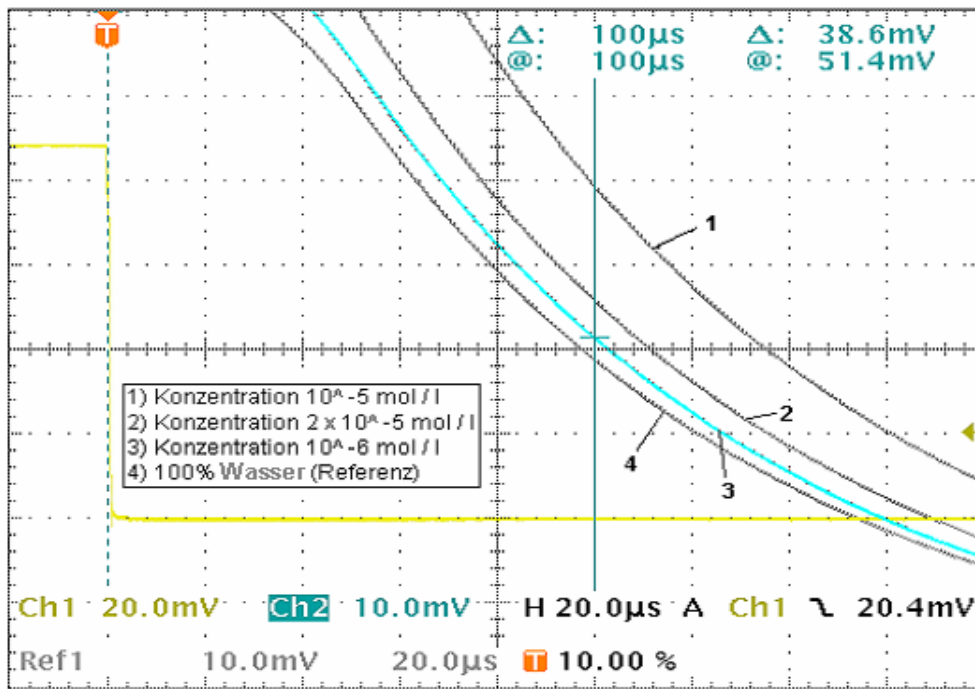


Abb. 8: Oszilloskop-Plot (Spannung vs. Zeit) zur Verdeutlichung der hohen Empfindlichkeit der verwendeten Optik.

Ergebnisse und Ausblick

Mit dem Prototypen sind bereits Messungen sehr geringer Konzentrationen der Seltenerd-Komplexe in einer Pufferlösung, die Spuren amplifizierter DNA entsprechen, möglich.

Abb. 8 verdeutlicht die bisherige Leistungsfähigkeit des Prototypen, der derzeit noch weiter optimiert wird. Die geringste, reproduzierbar gemessene Konzentration beträgt 10^{-6} mol / l. Hier liegt immer noch eine deutliche Spannungsdifferenz von 1,5mV zwischen der Messkurve und der Referenzkurve, die dem Messwert bei 100% Wasser entspricht.

Mit qualitativ hochwertigeren (nicht Low-Cost) Bauteilen und einer weiteren Optimierung der Optik ließe sich die Empfindlichkeit sicherlich noch wenigstens um den Faktor 10 erhöhen.

Danksagung

Mein besonderer Dank für Tipps und Anregungen zu diesem Projekt gilt den folgenden Personen:

Prof. Dr.-Ing. Büddefeld

Dipl.-Ing. Kufferrath

Dipl.-Ing. Joschko

Dr. Klauth