

Whitepaper MT-PCR

Multiple Touchdown PCR (MT-PCR): Eine neue Anwendung der PCR für mehr Präzision und Stabilität

Was ist MT-PCR?

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, ist seit fast 30 Jahren im Einsatz und wird in allen Arten von biochemischen und medizinischen Labors eingesetzt. Das überwältigendste Problem, das bei der PCR auftritt, ist jedoch die Amplifikation von Non-Target-DNA, die alle Arten von Problemen verursachen kann, nicht zuletzt falsch positive Ergebnisse. Glücklicherweise haben sich die PCR-Techniken im Laufe der Jahre ständig verbessert und eine neue PCR-Technik - Multiple Touchdown PCR (MT-PCR) - wurde entwickelt. MT-PCR kombiniert die Eigenschaften von mehreren PCRs und Touchdown-PCRs. Mehrere Primer werden verwendet, um mehrere DNA-Targets in einem PCR-Experiment zu testen. Die Glühtemperatur wird von einem ursprünglichen Sollwert um 0,5~1°C für jeden Zyklus reduziert, bis die beste Glühtemperatur erreicht ist.

MT-PCR, das in einer neuen Studie 2016*(1) vorgestellt wurde, wurde für den Nachweis von Resistenzgenen entwickelt. MT-PCR identifiziert erfolgreich mehrere verschiedene bakterielle Target-DNAs, verhindert aber auch, dass die Reaktion Non-Target-DNAs verstärkt und somit falsch-positive Ergebnisse liefert.

Wie löst MT-PCR das Problem der Mehrfach-PCR?

In einem regulären PCR-Experiment ist das Ziel eine einzelne DNA-Vorlage und ein spezifischer Primer verlängert die Vorlage in 20 Reaktionszyklen. Durch die Verwendung mehrerer Primer und Ziel-DNAs in einer Reaktion kann viel Zeit gespart werden,

wobei wir mehrere Ziel-DNAs in einer einzigen PCR gleichzeitig verlängern können*(2).

Die Verwendung mehrerer PCRs hat jedoch einen gravierenden Nachteil, es ist nicht einfach, eine Kreuzamplifikation von Non-Target-DNA in einer Mischung aus Primern und DNAs zu vermeiden. Daher müssen wir die spezifischen Target-DNAs im Voraus auswählen, bevor wir die multiple PCR durchführen. Nur Ziel-DNAs mit unterschiedlicher Länge von DNA-Paaren werden für die Mehrfach-PCR ausgewählt.

Obwohl mehrere PCRs Zeit sparen, können Fehler durch die Kreuzamplifikation von Non-Target-DNAs nicht verhindert werden. Deshalb brauchen wir MT-PCR. Der große Unterschied zwischen MT-PCR und multipler PCR ist die Glühtemperatur. Bei der MT-PCR wird dies mit jedem Zyklus verringert. Die erste Zyklus-(Anfangs-)Glühtemperatur wird 3~5°C höher als die erwartete Temperatur eingestellt. Generell gilt: Je höher die Glühtemperatur, desto besser die Übereinstimmung der Primer und Templates. Ein langsamer Abfall der Glühtemperatur macht die PCR effizienter.

Die präzise und stetige Kontrolle der Temperatur ist entscheidend.

Die Forscher dieser MT-PCR-Studie identifizierten erfolgreich 5 Ziel-DNAs, *mecA*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* und *bla_{OXA}* in Blutkulturflaschen und dotierten Blutkulturflaschen siehe Abbildung 1.

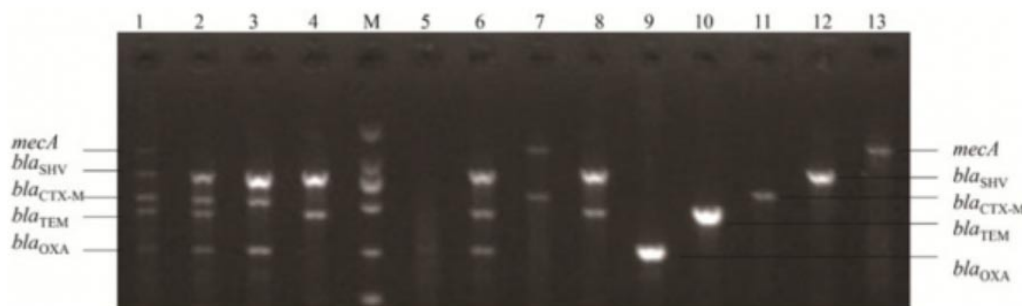


Abb. 1 Das MT-PCR-Ergebnis von Proben aus 12 dotierten Blutkulturflaschen. Nr. 9~Nr. 13 sind die Kontrollgruppen für die Zielgene. Nr. 1~Nr. 8 zeigte eine klare Expression für die Zielgene im MT-PCR-Array ohne weitere Kreuzamplifikation.

Whitepaper MT-PCR

Gleichzeitig gab es keine Kreuzverstärkung und keine falsch positiven Ergebnisse. (Abbildung 2) Im Experiment betrug die am Thermocycler eingestellte Anfangsglühzeit 30 Sekunden lang 66°C. Die Forscher führten die Reaktion 20 Zyklen lang weiter, aber für jeden Zyklus wurde die Glühzeit um 0,5°C gesenkt. Die Präzision und Stabilität der Temperaturregelung sind entscheidend. Der TurboCycler-Thermocycler von BlueRay Biotech ist sehr stabil und kann die Temperatur präzise und stabil regeln. Er verfügt über eine hohe Anstiegsrate, die es ermöglicht, ihn schnell auf die gewünschte Temperatur einzustellen. Es verfügt auch über einen Probenmodus, der die Temperaturdifferenz zwischen Probe und Prüfblock auf ein absolutes Minimum reduziert. Der TurboCycler ist die ideale Wahl für die MT-PCR.

In der Studie enthielten die zu untersuchenden bakteriellen DNAs Gene für multiple Antibiotika-resistenzen. Patienten, die mit diesen Bakterien infiziert sind, müssen unverzüglich mit dem richtigen Antibiotikum behandelt werden, da eine Sepsis schwerwiegende Folgen haben kann. Diese Arbeit bewies, dass die MT-PCR die beteiligten Bakterien schnell identifizieren konnte.

Schlussfolgerung

MT-PCR kann nicht nur die Gene mehrerer Zielbakterien in den Proben schnell identifizieren, sondern auch die Kreuzamplifikation für Non-Target DNA kann vermieden werden. Falsch positive Ergebnisse sind deutlich geringer als bisher und das Verfahren ist sowohl für die klinische Forschung als auch für die Diagnostik von großem Wert. Wir erwarten, dass es in naher Zukunft noch viele weitere MT-PCR-Anwendungen geben wird. Es ist auch sehr wichtig, einen guten Thermocycler für die besten Ergebnisse der PCR zu wählen.

Referenz

1. Ming-Yi W, Jian-Li G, Ying-Jian C, Yu S, Mei S, Hai-Zhu L, and Cheng-Kin H. Direct Detection of *mecA*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, and *bla_{OXA}* Genes from Positive Blood Culture Bottles by Multiple-touchdown PCR Assay.
2. Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy, S R, Vance, G H and Vogt, P H (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23, 504-511.

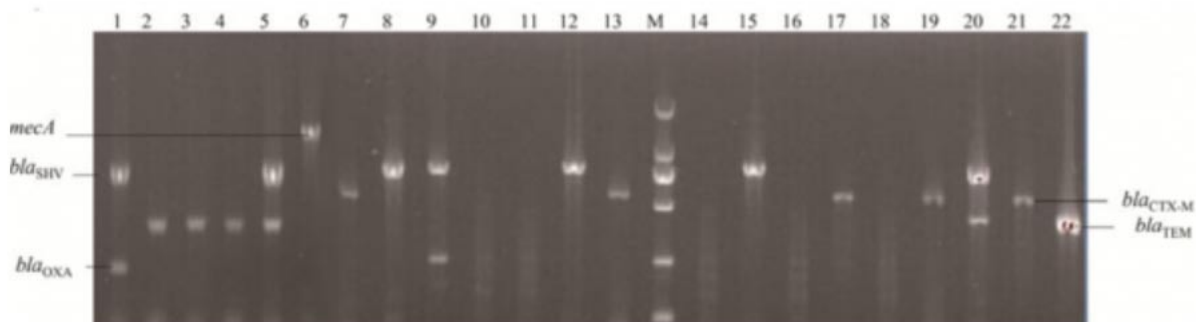


Abb. 2. Das Ergebnis von Proben aus 33 positiven Blutkulturflaschen in 4h MT-PCR-Array. Die Zielgene werden ohne Non-Target Genexpression eindeutig exprimiert.