

Neuer Echtzeit-Nachweis von Nukleinsäuren

Bernd Faltin, Robert Bosch GmbH; Simon Wadle, Dr. Günter Roth, Stefanie Rubenwolf, Dr. Michael Lehnert, Prof. Dr. Roland Zengerle, Dr. Felix von Stetten; Universität Freiburg

Kosteneinsparungen bei der real-time-PCR sind ein stets aktuelles Thema. Mit dem Ziel, die Kosten beim Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden zu senken, wurde ein neues Verfahren entwickelt – die Mediator-Sonden PCR¹ (Mediator Probe PCR, MP PCR): Eine nicht fluoreszenzmarkierte Mediator-Sonde (MP) bindet während der Annealing-Phase der PCR an die Zielsequenz. Durch die Nukleaseaktivität der Polymerase wird von der Sonde ein Sequenz-Überhang, der Mediator, abgespalten. Dieser löst an einem sekundären universellen fluorogenen Reporter (Universal Reporter, UR) eine Reaktion aus, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht. Die MP PCR ist ebenso sensitiv wie eine Hydrolyse-Sonden-PCR, aber hat den Vorteil, dass ein einziger fluorogener UR für verschiedene Assays eingesetzt und markierungsfreie, amplikonspezifische Sonden verwendet werden können.

An den Verzicht der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Forschung, Diagnostik und Forensik ist heute nicht mehr zu denken². Gendefekte, die auf einem Sequenzunterschied von nur einem Basenpaar beruhen, können aufgelöst und kleinste DNA-Mengen von Pathogenen in einer Patientenprobe nachgewiesen werden. Dank

ihrer hohen Spezifität und Sensitivität wurde die Methode in standardisierte Arbeitsabläufe in den Laboren weltweit etabliert und fortlaufend weiterentwickelt. Eine Variante stellt die real-time-PCR dar, die sich als Goldstandard zur sensitiven Quantifizierung von Nukleinsäuren bewährt hat. Dabei wird in jedem Zyklus eine

Fluoreszenzsonde (Hydrolyse-Sonde) gespalten und das entstandene Signal detektiert. Während der Entwicklung von PCR-basierten Nachweisen werden viele verschiedene dieser Hydrolyse-Sonden benötigt, um beispielsweise die optimale Sondensequenz zu ermitteln. Aufgrund von zwei Fluoreszenzmodifikationen (Fluorophor und Quencher) pro Sonde ist die Anschaffung dieser Sonden mit hohen Kosten verbunden. Hinzu kommt, dass die initiale Hintergrundfluoreszenz für verschiedene Hydrolyse-Sonden unterschiedlich hoch ist. Dieser Effekt ist auf unterschiedliche Effizienzen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) verschiedener Fluorophor-Quencher-Kombinationen zurückzuführen³ und wird auch von der Sequenz sowie Länge der Hydrolyse-Sonde beeinflusst. Dies kann sich nachteilig auf die Signaldetektion auswirken, falls in einem parallelen Ansatz mehrere Sonden in einem Farbkanal ausgelesen werden sollen.

Um die beschriebenen Nachteile der Hydrolyse-Sonden-PCR zu beheben, wurde eine neue Methode entwickelt – die Mediator-Sonden PCR – und im Oktober erstmals vorgestellt!

Nachweis mit markierungsfreien Sonden und fluorogenem Reporter

Das Reaktionsprinzip der MP PCR ist in Abbildung 1 dargestellt. Ein Primer-Paar dient der Amplifikation der Zielsequenz mittels PCR. Zur real-time-Detektion werden zwei weitere Oligonukleotide benötigt, eine markierungsfreie Mediator-Sonde (MP) und ein fluorogener universeller Reporter (UR). Die MP besteht aus zwei funktionellen Bereichen: dem 3'-Bereich, der eigentlichen „Sonde“, die zur Zielsequenz komplementär ausgelegt ist, sowie dem 5'-Bereich, dem „Mediator“, dessen Sequenz standardisiert ist und keine Komplementarität zu verschiedenen genomischen Sequenzen aufweisen darf. Bindet die MP in der Annealing-Phase der PCR an die Zielsequenz, wird durch die Nukleaseaktivität der Polymerase der Mediator abgespalten. Dieser besitzt ein freies 3'-Ende, das eine Strangverlängerung am UR initiieren kann. Der UR enthält am 3'-Ende eine Mediator-Hybridisierungssequenz, einen internen Fluorophor in der Mitte und einen Quencher am 5'-Ende. Durch interne Hybridisierung des UR bildet er eine Haarnadelstruktur, die Fluorophor und Quencher in direkte Nähe bringt. Hybridisiert nun der abgespaltene Mediator am UR, wird dieser durch die Aktivität der Polymerase verlängert. Dadurch wird in einem Reaktionsweg die Haarnadel-Struktur des UR aufgefaltet oder in einem anderen Reaktionsweg der Quencher durch die Nukleaseaktivität der Polymerase abgespalten. In beiden Fällen werden Fluorophor und Quencher voneinander getrennt, und eine Zunahme der Fluoreszenz kann detektiert werden. Die Nachweisreaktion am UR kann nicht durch ungespaltene MPs ausgelöst werden, da diese nicht von der Polymerase verlängert werden können. Dadurch können falsch-positive

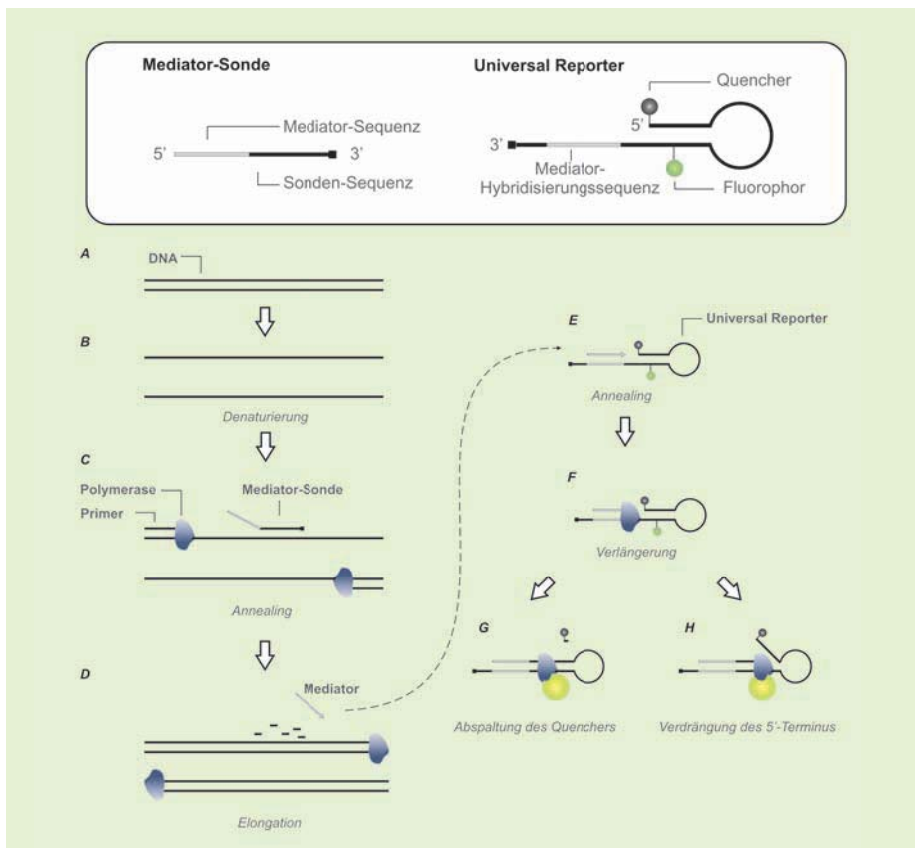


Abb. 1: Schematische Darstellung der MP PCR. Die verwendeten Oligonukleotide sind eingrahmt. Das Target (A) wird bei 95 °C denaturiert (B). In der Annealing-Phase hybridisieren Primer und MP (C). Die Taq-Polymerase verlängert die Primer und spaltet die MP. Dabei wird der Mediator freigesetzt (D). Der Mediator hybridisiert mit dem UR (E) und wird von der Polymerase verlängert (F). Dabei wird der 5'-Quencher abgespalten (G) bzw. der 5'-Terminus des UR verdrängt (H).

Tab. 1: Kostenvergleich der benötigten Sonden-Oligonukleotide für MP PCR (MP + UR) und Hydrolyse-Sonden-PCR. Die Beträge beziehen sich auf die Synthesekosten der Oligonukleotide (Synthesemaßstab: : 0,05 nmol Hydrolyse-Sonde bzw. MP für 1 Target. 0,05, 0,2 bzw. 0,5 nmol UR für 1, 4 bzw. 10 Targets)

Anzahl der Targets	Kosten pro Oligonukleotid (€)		
	1	4	10
Hydrolyse-Sonden PCR	179	716	1790
MP PCR	475	650	1090
UR	435	490	690
MP	40	160	400

Signale ausgeschlossen werden. Ferner hat sich gezeigt, dass die Aktivität der Polymerase unbeeinträchtigt von der Spaltung der MP ist.

Kostenvorteile durch Skaleneffekte

Der entscheidende Vorteil der MP PCR besteht darin, dass die Zielsequenz indirekt nachgewiesen wird und somit nur ein einziger UR für die Detektion verschiedener Zielsequenzen benötigt wird. Die Spezifität wird dabei durch die MP erreicht, deren Sondensequenz an die jeweilige Zielsequenz angepasst wird. Im Gegensatz zur Hydrolyse-Sonden-PCR ist die Zielsequenzspezifische Sonde also nicht fluoreszenzmarkiert und kann somit günstig synthetisiert und in verschiedenen Designs getestet werden. Da zur Detektion ein einziger standardisierter UR zum Einsatz kommt, der in allen Reaktionen verwendet wird, kann dieser kostengünstig in großem Maßstab synthetisiert werden. Schätzt man die Kosten ab, ergeben sich bereits für den Nachweis vier verschiedener Zielsequenzen deutliche Einsparungen für die MP PCR gegenüber der Hydrolyse-Sonden-PCR (Tab. 1). Bei einer höheren Anzahl von Zielsequenzen sind die möglichen Einsparungen durch Skaleneffekte bei der Herstellung des UR noch größer. Für die Berechnung der Synthesekosten wurden jeweils die identischen Mengen von MP, UR und Hydrolyse-Sonde zugrundegelegt, wobei die Menge des UR jeweils der Gesamtmenge aller Hydrolyse-Sonden entsprach.

MP- versus Hydrolyse-Sonden-PCR

Anhand eines Modellsystems wurde die MP-PCR mit der Hydrolyse-Sonden-PCR (TaqMan-PCR) verglichen. Als Modell diente ein Fragment des Humanen Papillomvirus-18 (HPV18). Zunächst wurde das Detektionslimit ermittelt, also die Anzahl der DNA-Kopien pro Reaktion, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nachgewiesen werden kann. Es war für beide PCR-Varianten vergleichbar [(78,3 (MP PCR) bzw. 85,1 (Hydrolyse-Sonden-PCR)]. Zusätzlich wurde die Richtigkeit für die Amplifikation von 10^2 bis 10^6 HPV18-Kopien bestimmt. Die Richtigkeit innerhalb einer Testreihe war +21,6 bis -8,1 % (MP PCR) bzw. +19,4 bis -9,8% (Hydrolyse-Sonden-PCR) und die Richtigkeit zwischen fünf verschiedenen Testreihen

betrug +3,4 bis -7,0 % bzw. -2,0 bis -12,0 %. Ferner wurde eine Duplex-PCR durchgeführt, bei der die HPV18-Zielsequenz sowie eine interne Kontrolle [humane DNA, Zielsequenz β -Aktin (ACTB)] nachgewiesen wurden (Abb. 2). Dabei wurde für jedes Gen eine Mediator-Sonde mit unterschiedlicher Mediator-Sequenz eingesetzt und entsprechend zwei UR, die mit unterschiedlichen Mediator-Hybridisierungssequenzen ausgestattet und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert waren. Dadurch konnte jedem Gen ein Farbkanal zugeordnet werden. Die vergleichend getesteten Hydrolyse-Sonden waren ebenfalls mit verschiedenen Farbstoffen markiert. 10^2 bis 10^6 DNA-Kopien der HPV18-Zielsequenz wurden zuverlässig detektiert ($r^2=0,998$ bzw. $0,988$), wobei die interne Kontrolle (300 Kopien ACTB) nur eine minimale Abweichung zwischen den einzelnen Reaktionen aufwies ($C_q = 33,0 \pm 0,5$ bzw. $31,8 \pm 0,4$). Zusätzlich wurden mit beiden PCR-Methoden in individuellen Reaktionen verschiedene Genabschnitte von *H. sapiens*, *E. coli*, *S. aureus* und HPV18 amplifiziert ($r^2=0,991$ - $0,999$ bzw. $0,975$ - $0,993$), um die Anwendbarkeit auf verschiedene Zielsequenzen zu zeigen. Bei den Hydrolyse-Sonden-PCRs musste hierbei je eine sequenzspezifische fluorogene Hydrolyse-Sonde eingesetzt werden, wogegen bei der

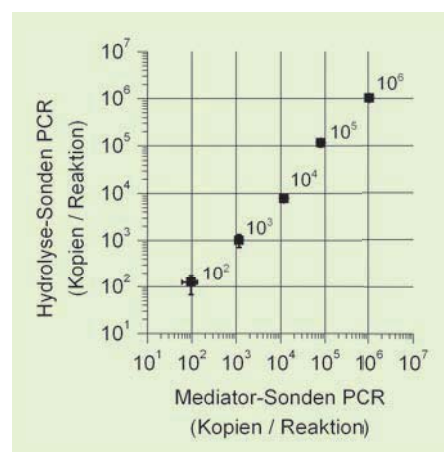


Abb. 2: Amplifikation der HPV18-Zielsequenz durch MP PCR ($r^2=0,998$) und Hydrolyse-Sonden-PCR ($r^2=0,988$). Die eingesetzte Kopienzahl ist an den jeweiligen Messpunkten angegeben. Parallel wurde in jeder Reaktion ein Kontrollgen (300 Kopien ACTB) amplifiziert (nicht dargestellt).

Mediator-Sonden PCR alle Zielsequenzen mit nur einem fluorogenen UR nachweisbar waren. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Methoden besteht im Abstand von Fluorophor und Quencher. Im Falle der Hydrolyse-Sonden-PCR hängt dieser von der Länge der Sonde ab, im Falle der MP PCR ist er konstant. Das hat den Vorteil, dass bei der MP PCR der Fluoreszenzanstieg immer konstant und unabhängig von der Zielsequenz ist. Ferner bietet der UR eine höhere Quenching-Effizienz als eine Hydrolyse-Sonde, da zwischen Fluorophor und Quencher eine geringere Distanz liegt.

Zusammenfassend kann die MP PCR als bedeutender Fortschritt in der Entwicklung der real-time-PCR⁴ gewertet werden. Die Methode ist universell anwendbar und ermöglicht eine deutliche Kostenreduktion bei der Entwicklung neuer Assays. Hierbei können mehrere Designiterationen anhand markierungsfreier Sonden für eine bestimmte Zielsequenz getestet werden, ohne dass es notwendig wäre, zahlreiche kostspielige Fluoreszenzsonden zu bestellen. Bisherige Experimente zeigen, dass die Mediator-Sonden PCR bei entsprechendem Design der Sonden in puncto Sensitivität und Spezifität mit der weitverbreiteten Hydrolyse-Sonden-PCR vergleichbar ist. Viele Einsatzbereiche, in denen die Mediator-Sonden PCR als Alternative angewendet werden kann, sind denkbar: Neben der Quantifizierung geringster DNA-Mengen ist die Methode prinzipiell auch zur Allel-spezifischen Genotypisierung oder für Expressionsanalysen einsetzbar. Zudem bietet sich eine Adaption bestehender Hydrolyse-Sonden-Assays an die Mediator-Sonden-Technologie an, um das bessere Quenching und die Zielsequenz-unabhängige Signalgenerierung nutzen zu können. Künftige Forschungsthemen sind die Erhöhung des Multiplex-Grades sowie das Ableiten von Design-Regeln für die MP und den UR. Da die Durchführung einer MP PCR keine zusätzlichen technischen Voraussetzung gegenüber der Hydrolyse-Sonden-PCR benötigt, bleibt besonders spannend, ob die neue Methode auf eine breite Akzeptanz bei den Anwendern stößt.

Literatur

- [1] Faltin, B., Wadle, S., Roth, G., Zengerle, R., von Stetten, F., *Clinical Chemistry* (2012), doi: 10.1373/clinchem.2012.186734
- [2] Kaltenboeck, B., Wang, C.M., *Advances in clinical chemistry* 40 (2005), 219-259
- [3] Marras, S.A.E., Kramer, F.S., Tyagi, S., *Nucleic Acids Research* 30 (2002)
- [4] Kubista, M., *Clinical Chemistry* (2012), doi: 10.1373/clinchem.2012.194126

Korrespondenzadresse

Dr. Felix von Stetten
Universität Freiburg
Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK)
Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg
vstetten@imtek.uni-freiburg.de
www.ioac-imtek.de/