

# Real-time PCR brengt routinematige toepassing van moleculair biologische technieken dichterbij

J.W. (Annelien) Roenhorst

Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, e-mail: j.w.roenhorst@minlnv.nl

Het gebruik van ELISA voor het grootschalig en routinematig toetsen van plantaardig materiaal op virussen is algemeen bekend. De techniek is betrouwbaar, robuust, goedkoop en grotendeels te automatiseren. Helaas kan deze serologische techniek niet in alle gevallen worden toegepast, bijvoorbeeld wanneer geen goed antiserum kan worden gemaakt, de ziekteverwekker geen eiwit heeft (viroïden) of wanneer kruisreacties optreden met andere organismen. De real-time PCR techniek biedt de mogelijkheid om in deze gevallen moleculair biologische toetsen te ontwikkelen die geschikt zijn voor routinematige toepassing. Deze techniek biedt daarmee een waardevolle aanvulling op ELISA.

## Inleiding

Sinds de ontwikkeling van snelle en betrouwbare laboratoriumtoetsen zoals ELISA en PCR, worden deze methoden in de plantaardige sector steeds vaker ingezet om garanties af te geven over de gezondheid van het materiaal. Hierbij gaat het vaak om uitgangsmateriaal voor zowel de interne markt als voor export. Voorbeelden zijn de virustoetsingen in aardappelpootgoed, bloembollen, bloem- en boomkwekerijproducten en groentezaden. Al ruim dertig jaar wordt voor deze grootschalige en routinematige toetsingen gebruik gemaakt van ELISA. Daar deze techniek niet in alle gevallen kan worden toegepast, is het wenselijk om ook moleculair biologische toetsen als PCR op grotere schaal te kunnen in

zetten. In de loop der jaren zijn verschillende technieken ontwikkeld waarmee specifieke nucleïnezuursequenties kunnen worden gedetecteerd, zoals nucleïnezuurhybridisatie, zowel met radioactieve als fluorescerende probes, polymerase chain reaction (PCR), nucleic acid sequence based amplification (NASBA) en real-time PCR. Met name deze laatste techniek blijkt geschikt te zijn voor opschaling. In dit artikel wordt het principe van deze techniek beschreven in relatie tot de mogelijkheden voor routinematige toepassing. De focus ligt hierbij op de TaqMan technologie daar deze vooralsnog het meest wordt toegepast.

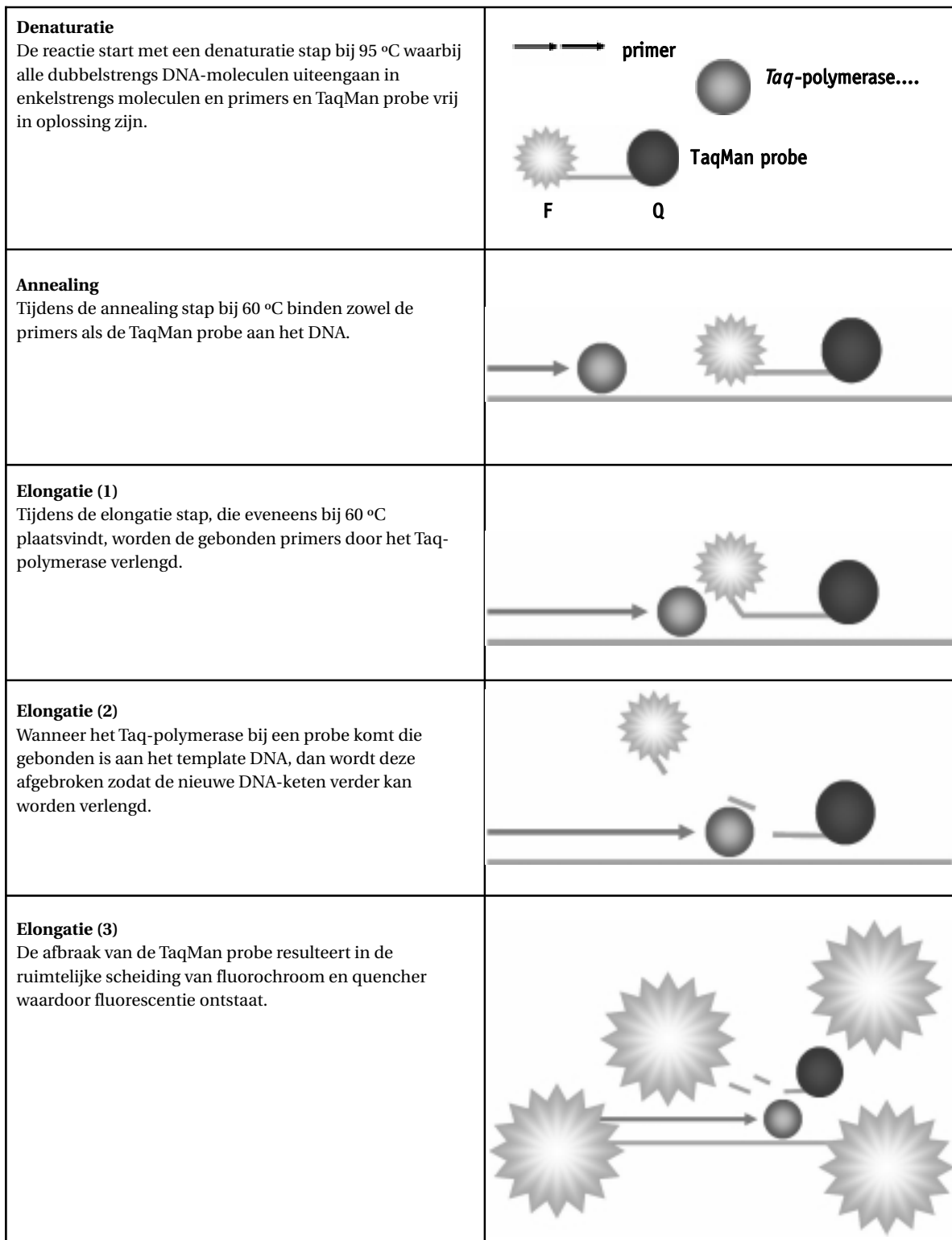
## Real-time PCR

Real-time PCR combineert twee technieken: PCR en nucleïnezuurhybridisatie. Net als bij de conventionele PCR wordt gebruik gemaakt van twee specifieke primers voor de amplificatie van een klein deel van het genoom van het te detecteren organisme. Anders dan bij de conventionele PCR, waar amplicons zichtbaar worden gemaakt in ethidiumbromide-gels, resulteert amplificatie bij deze techniek in fluorescentie. Deze fluorescentie kan 'real time', dat wil zeggen gedurende het verlopen van de reactie worden gemeten. Daarbij is de methode kwantitatief, hetgeen betekent dat het fluorescentiesignaal bij elke cyclus sterker wordt. De gemeten fluorescentie wordt per monster weergegeven in een grafiek die na afloop van de reactie wordt geanalyseerd.

## De techniek

Bij een conventionele PCR bestaat het reactiemengsel uit een buffer met daarin *Taq*-polymerase, vier typen nucleotiden (ACGT) en een forward en reverse primer. In geval van re-

ARTIKEL



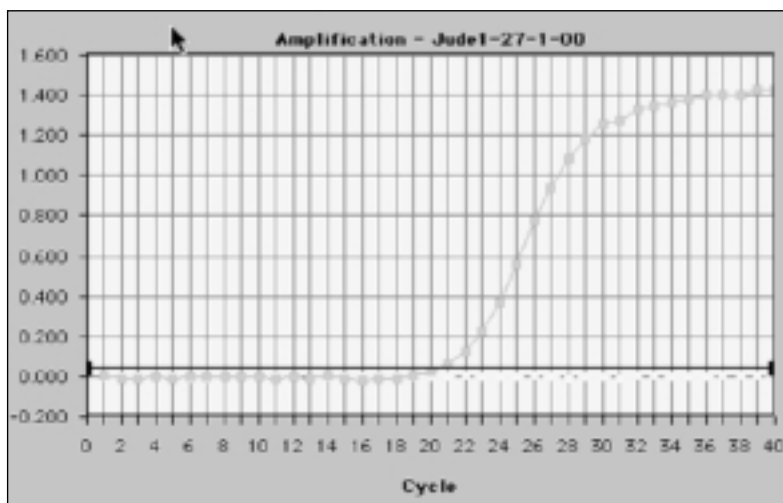
[ARTIKEL

*Figuur 1. De stappen in real-time PCR. (Tekeningen N. Boonham en R. Mumford, Central Science Laboratory, York)*

al-time PCR wordt aan dit mengsel een TaqMan probe toegevoegd die complementair is aan een deel van het DNA van het amplicon (Figuur 1). Deze TaqMan probe is aan de

uiteinden voorzien van twee extra moleculen. Aan de ene kant is een fluorochroom gekoppeld, aan de andere kant een quencher. Tijdens de PCR wordt het fluorochroom aan-

gestraald door UV-straling, waardoor het gaat fluoresceren. De fluorescentie wordt echter geabsorbeerd door de quencher zolang beide moleculen zich dicht bij elkaar be-



*Figuur 2. Fluorescentiegrafiek*

*Deze grafiek toont de fluorescentie (Y-as) als functie van het aantal cycli (X-as). De positieve reactie toont een S-curve die na 20 cycli de cycle threshold (getrokken lijn) passeert. De Ct-waarde is in dit geval 20. De controle geeft geen fluorescentie, hetgeen wordt weergegeven door een rechte lijn die onder het niveau van de threshold blijft (Grafiek: N. Boonham en R. Mumford, Central Science Laboratory, York).*

vinden, dus zolang ze gekoppeld zijn aan de probe. Dit betekent dat er aan het begin van de reactie geen fluorescentiesignaal wordt gemeten.

Evenals bij de conventionele PCR worden bij real-time PCR de volgende stappen onderscheiden: denaturatie, annealing en elongatie. Tijdens de annealing stap binden de primers aan de enkelstrengs DNA-moleculen. Bij real-time PCR bindt bovendien de TaqMan probe aan het DNA. Wanneer vervolgens het Taq-polymerase gaat repliceren dan bereikt dit enzym op zeker moment de probe. Om de nieuwe DNA-steng verder te kunnen verlengen, wordt de probe door de endoclease-activiteit van het Taq-polymerase afgebroken. Hierdoor raken fluorochroom en quencher los van de TaqMan probe waardoor de afstand tussen deze moleculen toeneemt. De fluorescentie van het fluorochroom wordt dan niet langer geabsorbeerd waardoor een meetbaar signaal ontstaat.

De essentie van de techniek is dus dat het optreden van replicatie zich via afbraak van de TaqMan probe vertaalt in een fluorescentiesignaal. Hoe vaker replicatie plaatsvindt, des te groter het aantal probes dat wordt afgebroken en des te sterker het signaal. Hierdoor is het dus mogelijk om zowel het verloop van de reactie in de tijd te volgen als na afloop van de reactie de oorspronkelijke hoeveelheid target DNA te berekenen.

## Analyse meetgegevens

In het algemeen worden de drie PCR-stappen circa veertig maal herhaald (40 cycli). De fluorescentie wordt na iedere cyclus gemeten en in een grafiek gezet (Figuur 2). In geval van positieve monsters neemt de fluorescentie toe na elke cyclus. Gezonde en controlemonsters leiden niet tot fluorescentie waardoor het signaal onder de zogenaamde thres-

hold blijft. Voor de analyse van real-time PCR gegevens wordt over het algemeen gebruik gemaakt van de cycle threshold (Ct) waarde. Dit is het aantal cycli dat is verlopen wanneer het fluorescentiesignaal de cycle threshold passeert. Hoe eerder een monster de cycle threshold bereikt, dus hoe lager de Ct-waarde, des te hoger is de hoeveelheid target DNA in het oorspronkelijke materiaal. Daar gezonde en controlemonsters de cycle threshold niet passeren, is de Ct waarde in deze gevallen onbepaald.

Het bepalen of een toetsresultaat (Ct-waarde) positief dan wel negatief is, is mede afhankelijk van de kenmerken van de betreffende real-time PCR. Wanneer een hoge concentratie van het organisme aanwezig is in het oorspronkelijk materiaal dan zijn de Ct-waarden over het algemeen laag, circa vijftien tot twintig. Het onderscheid met gezonde monsters is dan niet moeilijk. Bij Ct-waarden die in de buurt liggen van het totaal aantal cycli van de PCR (40) kan een nadere analyse nodig zijn om uit te sluiten dat het een specifieke reactie of kruisbesmetting betreft. De afbakening tussen positief en negatief moet dan ook voor iedere real-time PCR afzonderlijk worden bepaald. Vaak zal een 'twijfelzone' worden gehanteerd, waarbij de monsters die hierin vallen opnieuw moeten worden getoetst.

## Routinematige toepassing

Real-time PCR leent zich bij uitstek voor grootschalige en routinematige toepassingen. De PCR's worden uitgevoerd in 96 of 384 wells platen, vergelijkbaar met de microtiterpla-

ten die worden gebruikt bij ELISA. Deze platen worden handmatig gevuld of met behulp van pipetteerrobots. Zowel de monstergegevens als de bijbehorende fluorescentiegrafieken worden vastgelegd zodat de resultaten na afloop van de reactie kunnen worden geanalyseerd. Monsters hoeven dus niet meer handmatig op gel te worden gebracht zoals bij de conventionele PCR.

Daarnaast kan in één well gelijktijdig op meerdere organismen worden getoetst, een zogenaamde multiplex real-time PCR. De primers en Taqman probes voor de verschillende organismen worden namelijk zodanig ontworpen dat de real-time PCR met een universeel programma kan worden uitgevoerd. Over het algemeen hebben de amplicons een grootte van ongeveer honderd nucleotiden. Dit is kleiner dan bij de meeste conventionele PCR's.

Het voordeel hiervan is dat de verschillende stappen van de PCR sneller kunnen worden doorlopen.

Ook bij real-time PCR kost het voorbereiden van de monsters de meeste tijd. Het bemonstren en vernalen blijft voor een groot deel handwerk. Voor de nucleïnezuurextractie zijn inmiddels kits beschikbaar die geschikt zijn voor geautomatiseerde systemen, zoals de KingFisher. Dit systeem maakt gebruik van magnetic beads voor het extraheren van het nucleïnezuur uit het plantensap en werkt eveneens met 96 wells platen.

Routinematige toetsen stellen hoge eisen aan het voorkómen van kruisbesmettingen. Zeker bij een zo gevoelige techniek als real-time PCR zijn enkele DNA-moleculen of amplicons voldoende om een postief toetsresultaat te geven. Dit

maakt dat ook bij deze techniek soortgelijke voorzorgsmaatregelen moeten worden genomen als bij de conventionele PCR. Het voordeel van real-time PCR hierbij is dat de reactievaatjes na de amplificatie niet meer open gaan, waardoor de kans op kruisbesmetting met amplicons aanzienlijk geringer is dan bij conventionele PCR. Verder is de techniek aanzienlijk gevoeliger dan de conventionele PCR, waardoor extra alertheid is gewenst tijdens het opwerken van de monsters.

In vergelijking met ELISA is real-time PCR een complexe techniek die gebruik maakt van geavanceerde apparatuur en reagentia. In situaties waar ELISA niet kan worden toegepast, biedt real-time PCR technologie de mogelijkheid om grootschalig te toetsen op organismen waarop dit voorheen niet mogelijk was.

ARTIKEL