Reverse Transkriptase-PCR

J. Arnemann

Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland

Synonym(e) RT-PCR

Englischer Begriff reverse transcriptase PCR

Definition Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) ist eine Technik zum Expressionsnachweis und zur selektiven Vermehrung von Transkripten auf cDNA-Ebene.

Beschreibung Die RT-PCR („reverse transcriptase PCR“) besteht aus 3 Abschnitten, nämlich Isolierung der Gesamt-RNA bzw. der mRNA, einer Umschreibung der mRNA in komplementäre cDNA mittels des Enzyms reverse Transkriptase und einer nachfolgenden PCR-Reaktion.

Zur RNA-Isolierung existieren zahlreiche Protokolle und können mit den verfügbaren kommerziellen Kits gut abgearbeitet werden. Gewebestückchen oder Zellen werden lysiert, geschreddert und mit Proteinase K inkubiert, anschließend das Lysat durch Silica-Säulen zentrifugiert und die in der Silica-Membran gebundene Gesamt-RNA ausgelöst. Für eine Weiterverarbeitung kann aus der Gesamt-RNA z. B. mittels magnetischer Oligo-dT-Beads die Poly(A)-mRNA-Fraktion gezielt isoliert werden. Für die Umschreibung der Gesamt-RNA oder der Poly(A)-Fraktion werden in einem Ansatz entweder sog. Random-Primer, Oligo-d(T)-Primer oder auch eine Mischung aus beiden eingesetzt, um die eigentliche reverse Transkription zu initiieren. Die RNA-abhängigen DNA-Polymerasen oder reversen Transkriptasen sind

i. d. R. modifizierte Varianten aus Retroviren, wie z. B. das Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV), die an die Primer binden und den zur RNA komplementären cDNA-Strang synthetisieren. Während die Oligo-d(T)-Primer bevorzugt die Sequenzen im 3'-Bereich des Gens umschreiben, wird der 5'-Bereich, besonders wenn die Transkripte länger sind, besser mit den Random-Primern abgedeckt.

Die resultierende cDNA kann nun als Matrize in die eigentliche PCR-Reaktion mit Primern spezifisch für die gesuchte Zielsequenz eingesetzt werden. Für den Expressionsnachweis eines Gens, qualitativ oder quantitativ, muss immer parallel ein interner Standard oder Referenzgen getestet werden, um den Erfolg des Assays zu überprüfen.

Für eine quantitative Testung zur Expression eines Gens wird i. d. R. immer eine quantitative Realtime-PCR (qPCR) mit fluoreszenzmarkierten Sonden am LightCycler oder einem ähnlichen Realtime-PCR-Gerät durchgeführt und die Expression des Zielgens in Relation zum Kontrollgen berichtet. Optimalerweise sollte der Ansatz doppelt getestet werden. Kritisches Qualitätskriterium zur Beurteilung einer qPCR ist hierbei die Reproduzierbarkeit der Werte für das Kontrollgen. Für eine sichere Quantifizierung des exprimierten Gens oder der getesteten Erreger (z. B. HCV) sollten mindestens 4 unterschiedliche Verdünnungsstufen des Standards oder des Referenzgens im Doppelansatz mitgeführt werden, um anhand dieser Eichgerade auch das eigentliche Zielgen sicher zu quantifizieren.

Literatur

Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23–39