

PCR-ELISA

**Eine Methode zur Pathogendiagnose
und zur Ermittlung der Befallsstärke**

*Luitgardis Seigner und Stefan Knabel **

*Bayerische Landesanstalt für
Landwirtschaft*

Institut für Pflanzenschutz

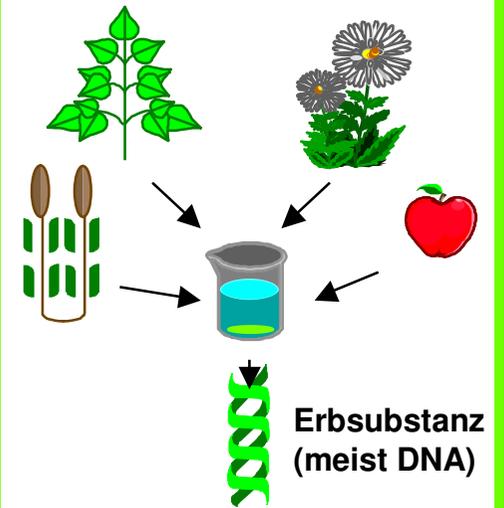
Der PCR-ELISA

Der PCR-ELISA ist eine Kombination aus molekularbiologischen (PCR und Gensonden-Hybridisierung) und serologischen Techniken. Er kann zum Nachweis von Pilzen, Bakterien, Viren und Viroiden eingesetzt werden.

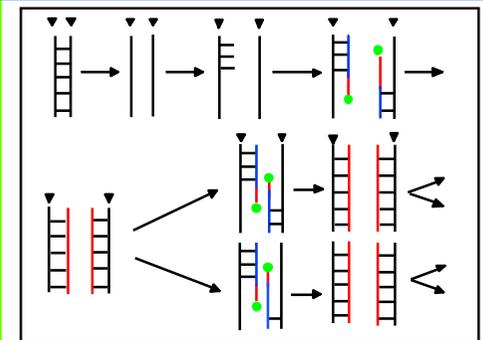
Der PCR-ELISA besteht aus folgenden Einzelschritten:

- Isolierung der Erbsubstanz des Erregers.
- Durchführung der **PCR** unter Verwendung erregerspezifischer Primer.
- Bindung der PCR-Produkte an eine Mikrotiterplatte.
- Ankopplung einer erregerspezifischen **Gensonde** an das gebundene PCR-Produkt.
- **Serologischer Nachweis** der Gensonde über eine Farbreaktion.
- Messung der Färbung. Die Intensität der Färbung ist ein Maß für die Befallsstärke.

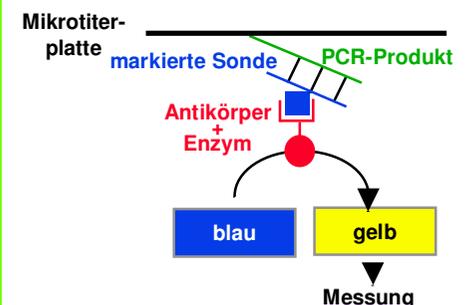
Extraktion der Erbsubstanz



PCR



Nachweis des PCR-Produktes



**Die Vorteile des
PCR-ELISAs**

😊 **Höhere Sensitivität als die PCR**

😊 **Sehr hohe Spezifität**

😊 **Quantifizierung der Befallsstärke**

😊 **Durchführung in der Mikrotiterplatte**

➔ **parallele Untersuchung einer großen Anzahl von Proben**

➔ **sehr gute Eignung für die Routine**

Aus der **Kombination** von

PCR

(erregerspezifische Primer)

und

Sondentechnik

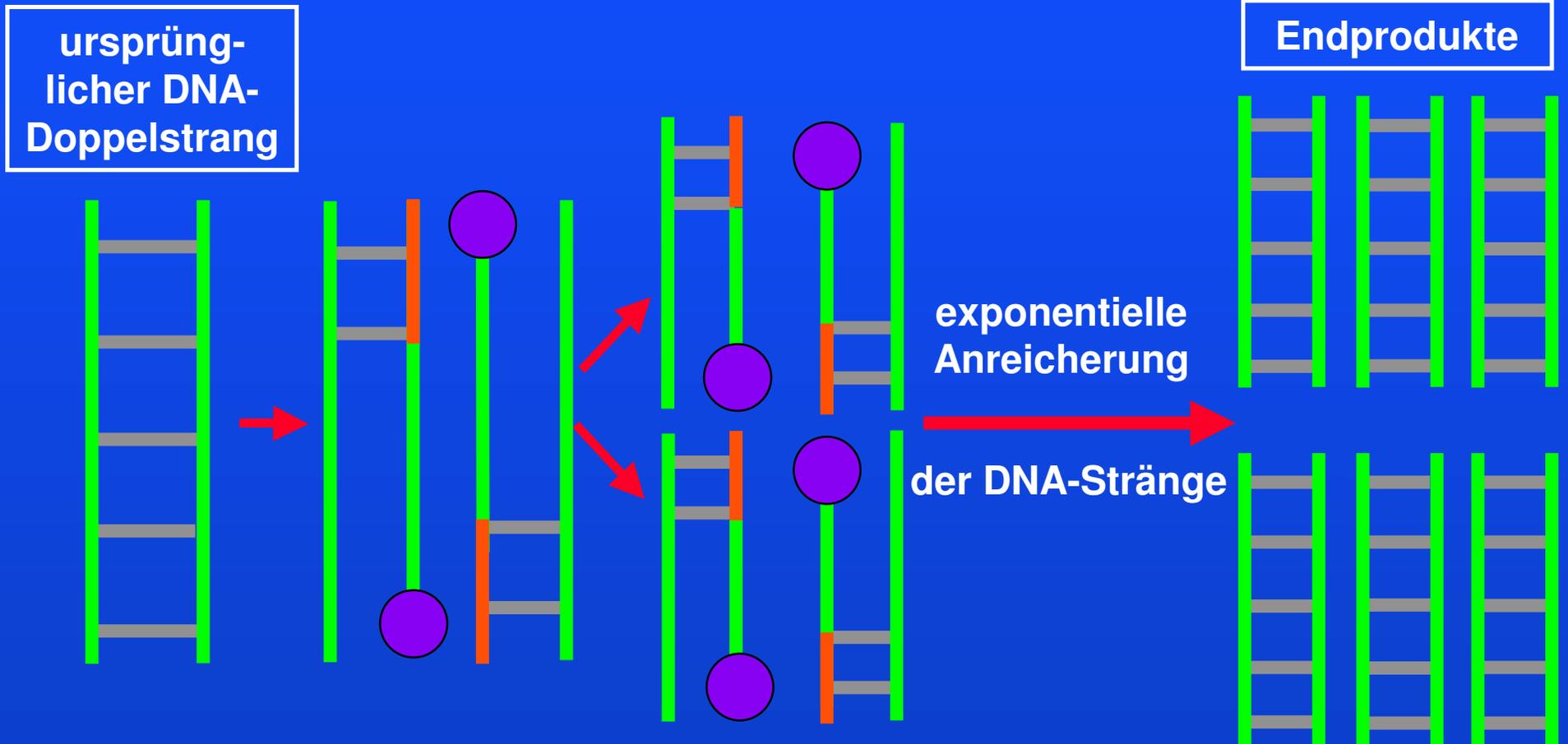
(erregerspezifische Gensonde)

resultiert die

sehr hohe Spezifität

**Die Teilschritte des
PCR-ELISAs**

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



Zuerst wird eine PCR durchgeführt. Dabei werden erregerspezifische **Primer** eingesetzt. Ein **Enzym** vervielfältigt dabei definierte Abschnitte des **Erbmaterials** des Erregers.

Denaturierung der PCR-Produkte

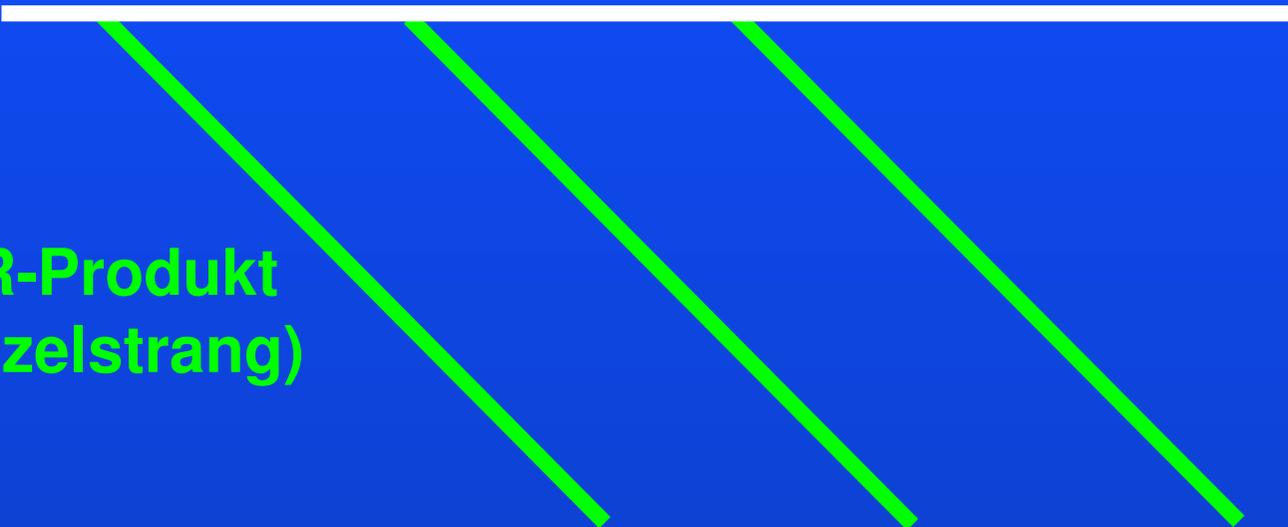


Nach der PCR liegen die **PCR-Produkte** doppelsträngig vor. Sie werden durch Denaturierung in **Einzelstränge** zerlegt. Dabei werden die **Wasserstoffbrückenbindungen** zwischen den Einzelsträngen gelöst.

Bindung der PCR-Produkte an eine Mikrotiterplatte

Mikrotiterplatte

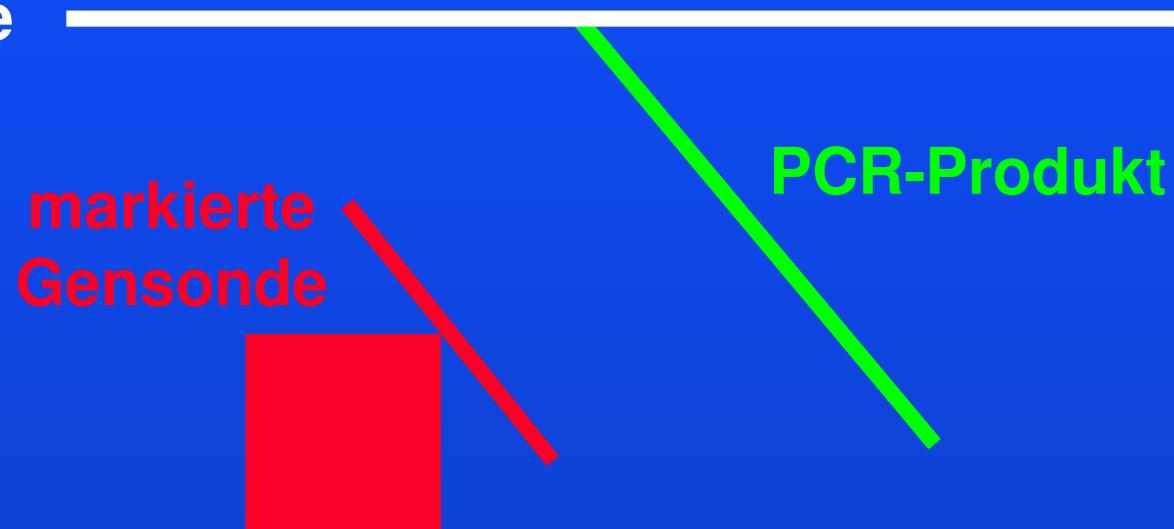
PCR-Produkt
(Einzelstrang)

A diagram illustrating the binding of PCR products to a microtiter plate. A white horizontal line at the top represents the microtiter plate. Three red diagonal lines, representing PCR products (single strands), are shown extending downwards from the white line, indicating their attachment to the plate.

Die einzelsträngigen **PCR-Produkte** werden an eine Mikrotiterplatte gebunden.

Zugabe der Gensonde

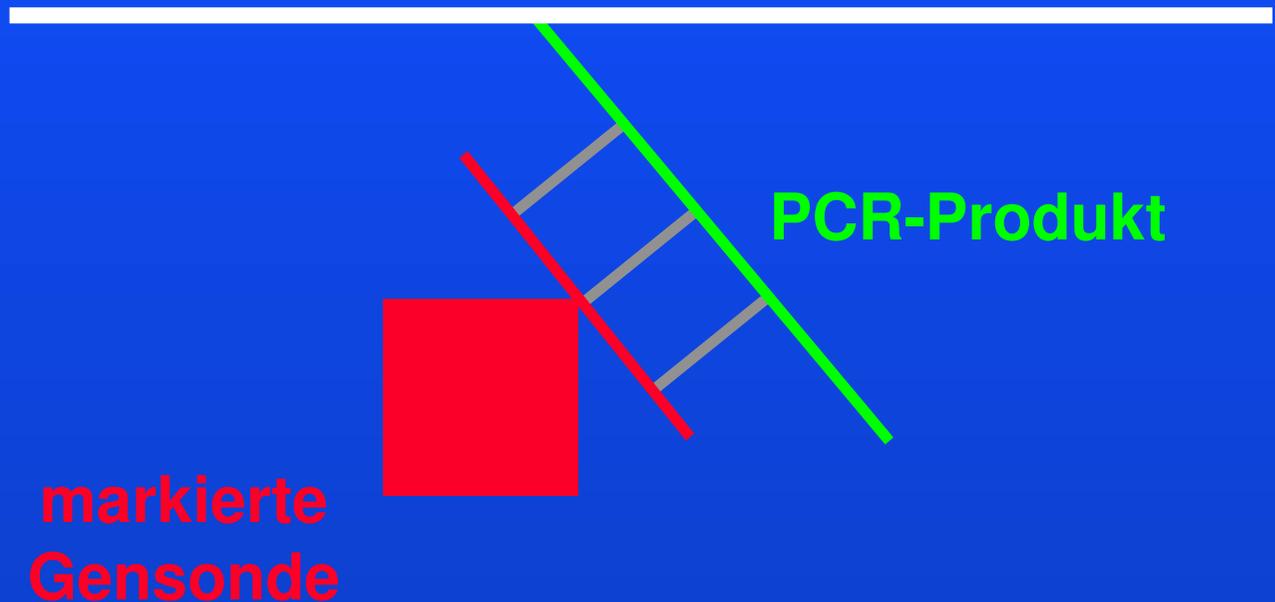
Mikrotiterplatte



Es wird eine erregerspezifische **Gensonde** dazugegeben.
An dieser Sonde hängt eine **Markierung** ■:
= **markierte Gensonde**.

Bindung der Gensonde an das PCR-Produkt

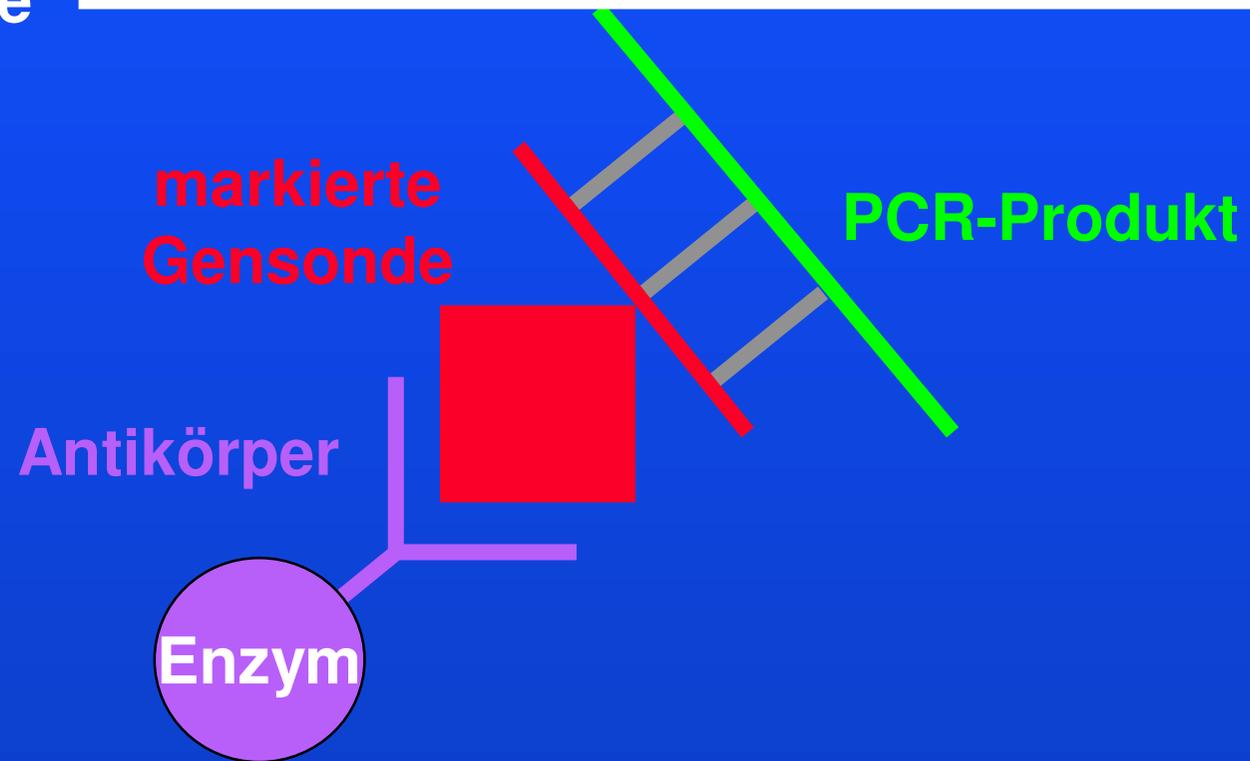
Mikrotiterplatte



Die **markierte Gensonde** bindet spezifisch über Wasserstoffbrückenbindungen an eine ganz bestimmte Stelle des **PCR-Produktes**.

Antikörper-Ankopplung

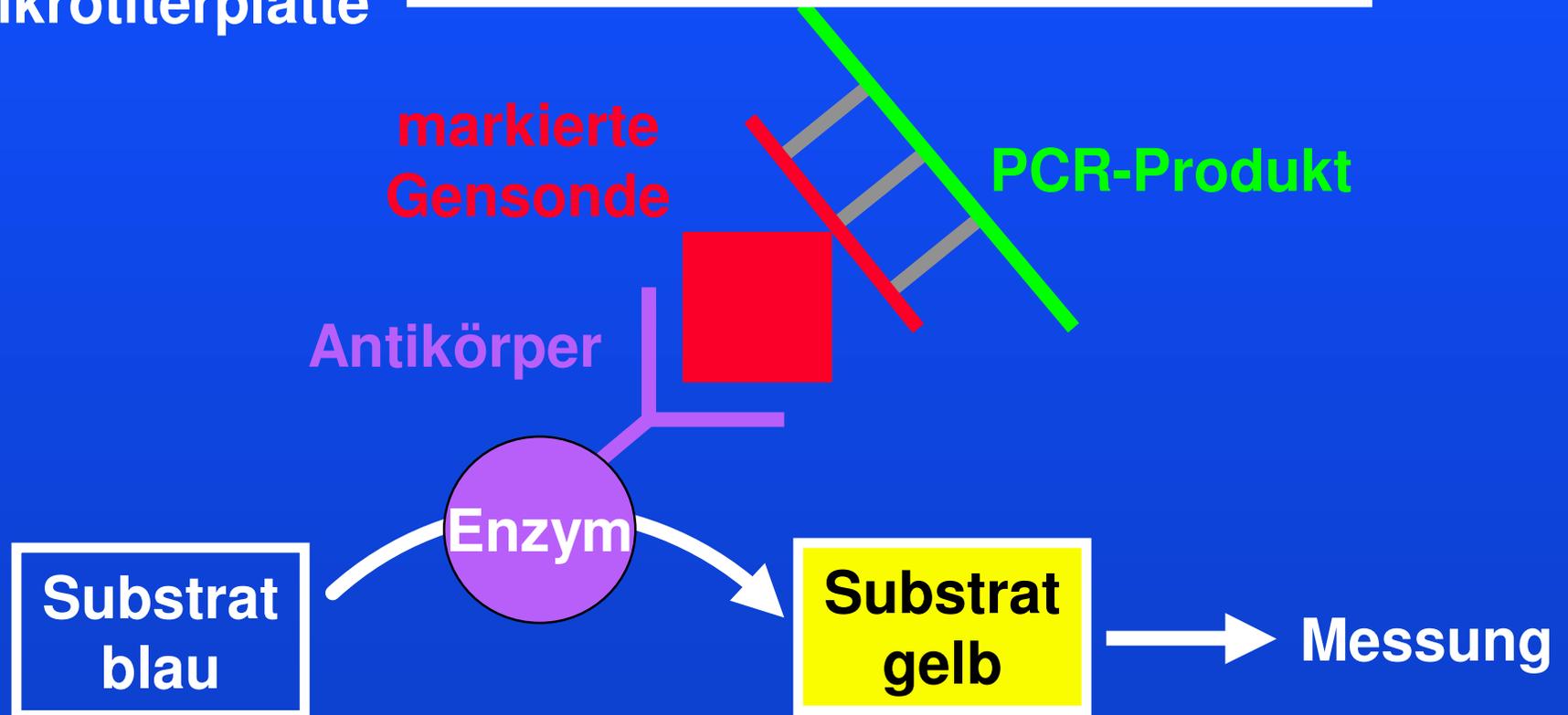
Mikrotiterplatte



Ein spezifischer **Antikörper** reagiert mit der **markierten Gensonde**.
An dem Antikörper hängt ein Enzym.

Farbreaktion

Mikrotiterplatte



Nach Zugabe eines Substrates bewirkt das Enzym einen Farbumschlag. Die Intensität der resultierenden Färbung wird mit einem Photometer gemessen und ist ein Maß für die Befallsstärke.