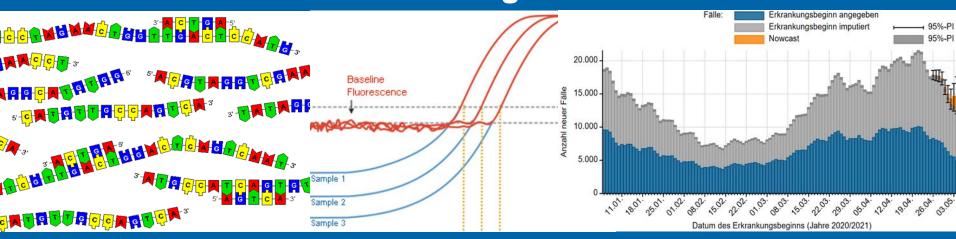


Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion): Grundlagen und Probleme der Anwendung im Zusammenhang mit Covid-19



Prof. Michael Schlömann 21.6.2021



- 1. Vorstellung, Dilemma
- 2. Normale PCR
- 3. Quantitative PCR (qPCR)
- 4. SARS-CoV-2-Detektion u. damit verbundene Pobleme
- 5. Meldung an das Robert-Koch-Institut



1. Vorstellung, Dilemma

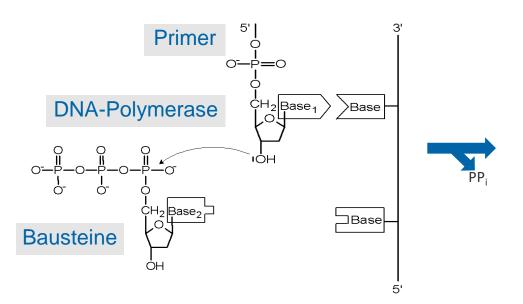


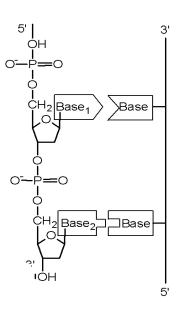
2. Die "normale" Polymerase-Kettenreaktion



Chemie der Verlängerungsreaktion der DNA-Polymerase

Matrize



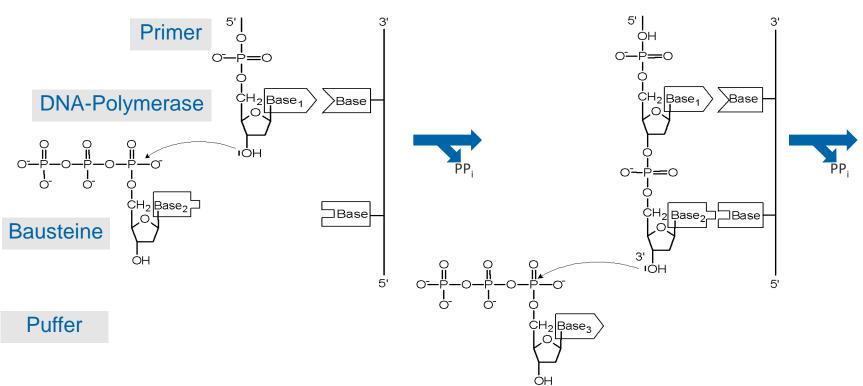


Puffer



Chemie der Verlängerungsreaktion der DNA-Polymerase

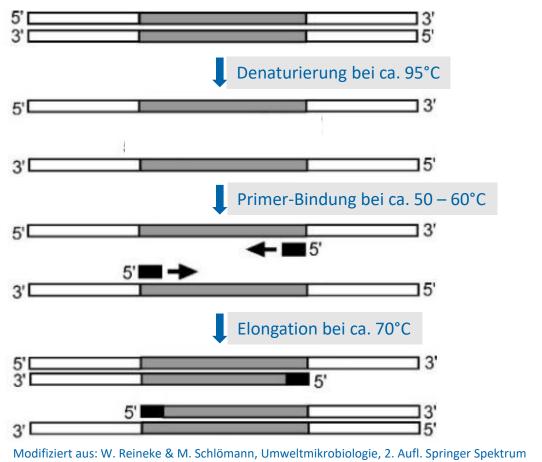
Matrize







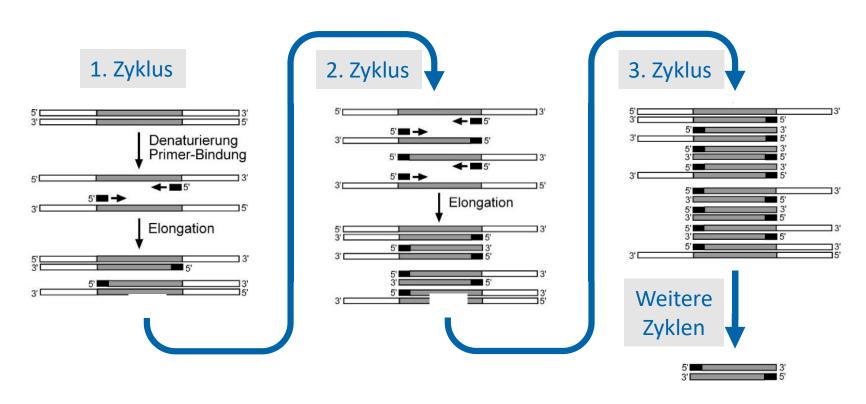
Die Polymerase-Kettenreaktion: 1. Zyklus







Die Polymerase-Kettenreaktion

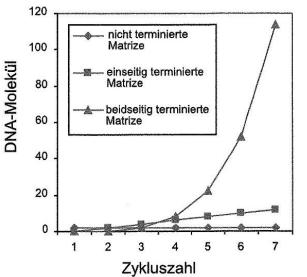




| Vorstellung | PCR | qPCR | SARS-CoV-2-Detektion | Meldung |

Die Polymerase-Kettenreaktion

- Wiederholung von 3 Schritten:
- Denaturierung bei ca. 95°C
- Primer-Bindung bei 50 60°C (abhängig von Länge und Sequenz)
- Elongation bei ca. 70°C

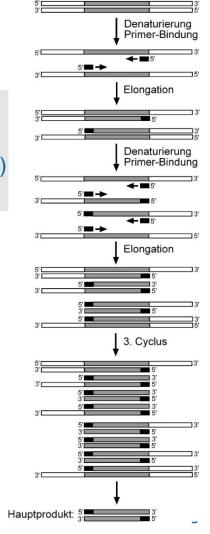


Durch n Zyklen theoretisch Vervielfachung der Zielsequenz um Faktor 2ⁿ

Beipiele:

20 Zyklen 2²⁰ ≈ 10⁶

35 Zyklen 2³⁵ ≈ 34 10⁹



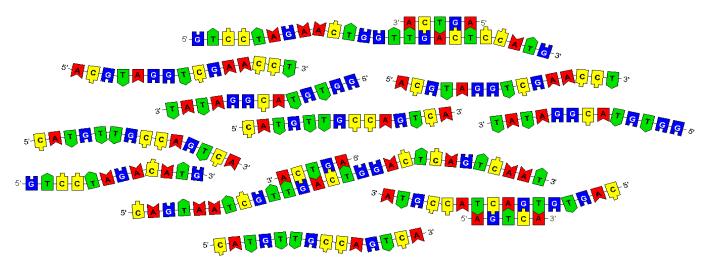




Bindung der Primer an Einzelstrang-DNA

- Normale Basenpaarung: Adenin (A) mit Thymin (T)
 Guanin (G) mit Cytosin (C)
- PCR-Primer nicht nur 5 Basen lang, sondern z.B. 20 Basen

Freies Oligonukleotid: 3'-ACTRA 5'







Erfinder der PCR: Kary B. Mullis

- US-amerikanischer Biochemiker, 1944 2019
- 1983 Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion
- 1993 Nobelpreis für Chemie zusammen mit Michael Smith
- Leugner des Zusammenhangs von AIDS und HIV
- Bestreiten des Ozonlochs und des Klimawandels

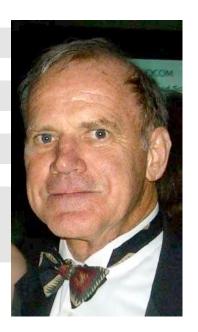


Bild: Dona Mapston



3. Quantitative "real time" PCR



"Normale" PCR ↔ quantitative PCR: allgemeine Anmerkungen

- "Normale" PCR nicht quantitativ, da Analyse nach Ende der Reaktion und:
 - Hemmung durch Produkte (DNA, PP_i, NMPs)
 - Bindung von Produktfragmenten aneinander
 - Langsame Zerstörung von Polymerase und Nukleotiden
- Länge der exponentiellen Phase abhängig von Kopienzahl:

Ausgangskopien	Zyklen exponentiell
12 - 400	30
200 - 3200	25
3200 - 51200	20

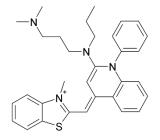
- In quantitativer "real-time" PCR-Reaktion Signal bei jedem Zyklus zu verfolgen, nicht erst am Ende
- Reaktion verfolgt über Fluoreszenz-Signal



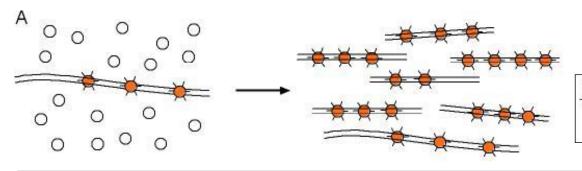


Real-time PCR: SYBR Green I

 Verwendung von Farbstoff, dessen Fluoreszenz bei Bindung an doppelsträngige DNA zunimmt



Source: Wikipedia, K. Hoffmeier



O ● Fluoreszenzfarbstoffe ohne oder mit geringer Fluoreszenz

- → Licht emittierende Fluoreszenzfarbstoffe

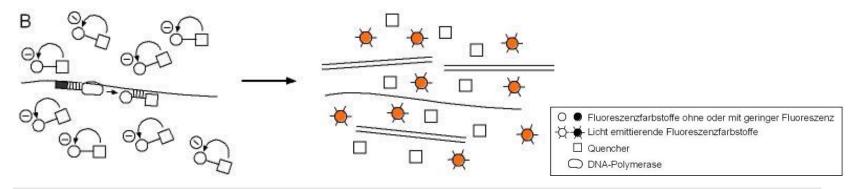
- Vorteile: einfach und billig
- Nachteile: nicht spezifisch
 Beitrag zum Signal auch von unerwünschten Nebenprodukten (z.B. aus nicht spezifischer Primer-Bindung)





Real-time PCR: TaqMan

- Zusätzlich zu Primern Verwendung einer Oligonukleotid–Sonde mit Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und Quencher am 3'-Ende
- Quencher "unterdrückt" Fluoreszenzfarbstoff, wenn nahe zusammen
- Während der Elongation Hydrolyse des Oligonucleotids durch 5'→3'-Exonuclease-Aktivität der DNA-Polymerase
 - → Trennung von Farbstoff und Quencher → Anstieg der Fluoreszenz

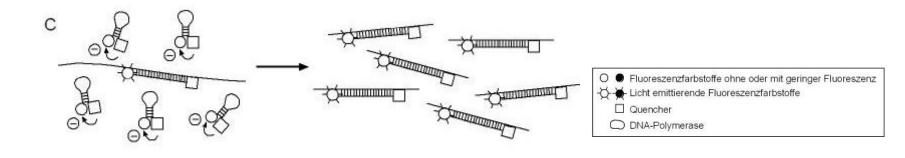


- Vorteil: spezifisch, Signal nur vom angestrebten PCR-Produkt
- Nachteile: teurer, zusätzliches Oligonukleotid mit Farbstoff u. Quencher erforderlich



Real-time PCR: Molecular Beacons

- Zusätzlich zu Primern Verwendung eines Oligonukleotids mit Haarnadelstruktur und sowohl Fluoreszenzfarbstoff als auch Quencher
- Durch Bindung an Ziel-DNA größerer Abstand zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Quencher → Lichtemission

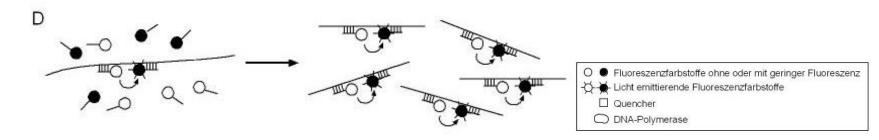






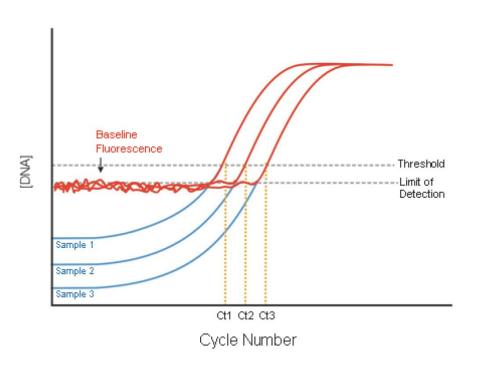
Real-time PCR: LightCycler-Sonden

- Zusätzlich zu Primern Verwendung von zwei Oligonukleotiden, Bindung nebeneinander zwischen Primern
 - einer mit grünem Fluoreszenzfarbstoff am 3'-Ende
 - einer mit rotem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende
- Energietransfer vom grünen zum roten Fluoreszenzfarbstoff
- Durch vervielfavhung mehr DNA → mehr Bindung nebeneinander
- Messung in Phase der Primer-Bindung





C_t-Wert ("Treshold Cycle")

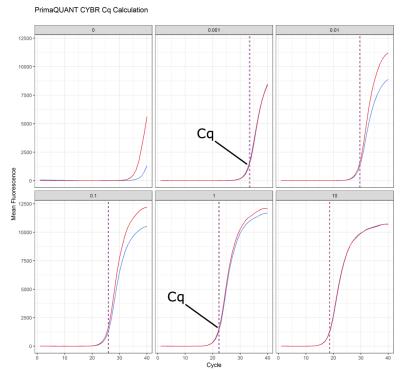


- Zykluszahl, bei der ein Schwellenwert überschritten wird und das Fluoreszenzsignal die Detektionsgrenze eindeutig übersteigt.
- Je weniger DNA oder RNA desto höher der C₁-Wert.





C_q-Wert "Quantification Cycle"



Schematische Fluoreszenzentwicklung in verschiedenen Verdünnungsstufen

- Zykluszahl, bei der die Fluoreszenzänderung also nicht mehr ansteigt (zweite Ableitung der Fluoreszenzkurve maximal, Wendepunkt).
- An diesem Punkt exponentielle Zunahme beendet.
- Weitere Berechnungsverfahren möglich.
- Je weniger DNA oder RNA desto höher der C_q-Wert.





Kalibrierung durch externen Standard

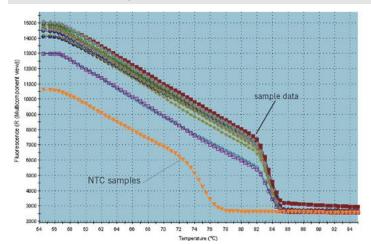
- C_t- und C_q-Wert als solche nur "semiquantitativ"
- Möglichkeit der Kalibrierung durch externen Standard Verwendung einer anderen Messmethode
- Möglichkeit von (internationalen) Ringversuchen unter Verwendung derselben Probe

Vorstellung | PCR | qPCR | SARS-CoV-2-Detektion | Meldung |

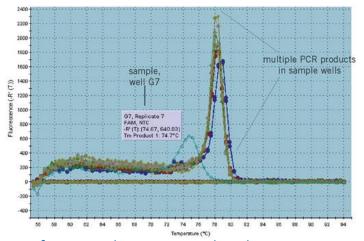


Qualitätskontrolle durch Schmelzpunktkurve

- Prüfen des PCR-Produktes auf Homogenität
- Denaturierung bei 95°C
- Anlagerung bei 55°C
- Dann langsames Hochfahren der Temperatur bei Messung der Fluoreszenz



"Schmelzkurve" Fluoreszenzabnahme bei steigender Temperatur. NTC = no template control.



Auftragung der Steigung der Fluoreszenzsignale gegen die Temperatur. Hierdurch Zusatzpeaks besser erkennbar. Bei ca. 75°C NTC mit Primer-Dimeren.





Quantifizierung von RNA

- DNA-Polymerase vervielfältigt nur DNA.
- Notwendigkeit des Umschreibens von RNA in DNA vor der PCR.
- Enzym "Reverse Transkriptase" (aus Retroviren).
- Anschließend "normale" qPCR

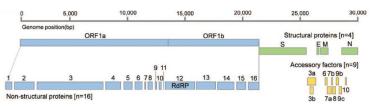


3. SARS-CoV-2-Nachweis durch qPCR



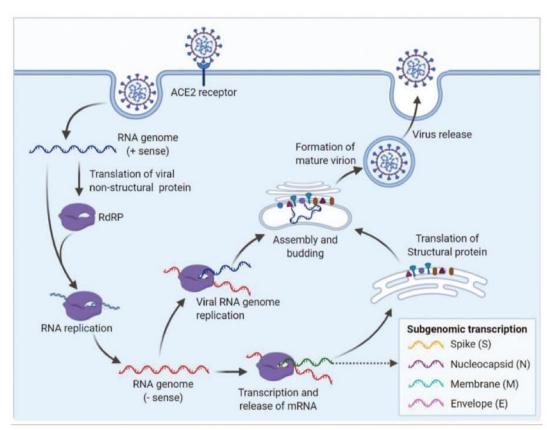


Genom und "Lebenszyklus von SARS-CoV-2:



Aufbau des SARS-CoV-2-Genoms

RdRP = Rna-dependent RNA polymerase ACE2 = Angiotensin converting enzyme 2

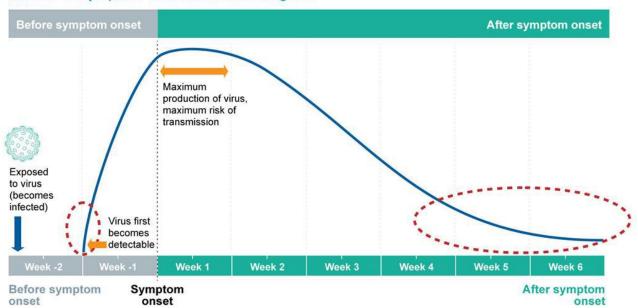






Infektiosität und Nachweisbarkeit von SARS-CoV-2 im Infektionsverlauf

COVID-19 symptom onset schematic diagram





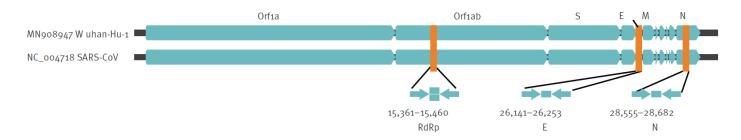
Vorstellung | PCR | qPCR | SARS-CoV-2-Detektion | Meldung |

Nachweissystem der Drosten-Gruppe

- Nachweis mit TaqMan-System
- Primer und Sonde für verschiedene Virus-Gene
- 45 Zyklen

FIGURE 1

Relative positions of amplicon targets on the SARS coronavirus and the 2019 novel coronavirus genome



E: envelope protein gene; M: membrane protein gene; N: nucleocapsid protein gene; ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase gene; S: spike protein gene.

Numbers below amplicons are genome positions according to SARS-CoV, GenBank NC_004718.



|Vorstellung | PCR | qPCR | SARS-CoV-2-Detektion | Meldung |

Nachweissystem der Drosten-Gruppe

TABLE 1***

Primers and probes, real-time RT-PCR for 2019 novel coronavirus

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence ^a	Concentration ^b		
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGGCGG	Use 600 nM per reaction		
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV.		
			Use 100 nM per reaction and mix with P1		
	RdRP_SARSr-P1 FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ		Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs.		
			Use 100 nM per reaction and mix with P2		
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction		
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nM per reaction		
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nM per reaction		
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nM per reaction		
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nM per reaction		
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nM per reaction		
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nM per reaction		

^a W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.

- Primer-Längen:

RdRp- u. E-Gen: 22 bzw. 26 Basen

N-Gen: 19 bzw 20 Basen

^b Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 μL of a 10 μM primer stock solution per 25 μL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.



Einwände:

"Die PCR hat keine Aussagekraft, weil kein ganzes Virus in den Personen nachgewiesen wird, sondern nur einzelne Gene."

"Es werden nur Sequenzen nachgewiesen."



| Vorstellung | PCR | qPCR | SARS-CoV-2-Detektion | Meldung |

Nachweis nur von einzelnen Virus-Genen: ein Problem?

- Nachweissysteme für: RdRP-, S-, E- und N- Gen von SARS-CoV-2
- Übliche Art des PCR-Nachweises
- Entscheidend: Selektivität der Primer oder anderen Sonden
 - → Design von Primern für SARS-CoV-2, die nicht an menschliche DNA binden
- Molekulare Verfahren in Forensik inzwischen etabliert (Identifizierung von Mördern, Vergewaltigern, Vätern etc.)
- Immer nur Nachweis von Molekülen!





Tatsächlich nur Nachweis einzelner Gene bzw. "Sequenzen"

Trotzdem aussagekräftiges Verfahren!!



Einwände:

"Ohne Angabe des C_t-Wertes ist PCR nicht aussagekräftig."

"Gesundheitsamt müsste C_t-Werte mit erfassen und bewerten."





Varianz von C_t- oder C_q-Werten für SARS-CoV-2

 Vergleichsstudie mit 365 von 406 registrierten Laboren aus 36 Ländern (25 Europa) mit Analyse derselben Proben

TABLE 1

Coronavirus disease (COVID-19) outbreak preparedness EQA pilot study, panel composition and overall performance per sample, April/May 2020 (n = 521)

Sample code	Sample content ^a	Viral RNA concentration ^b (dPCR log1o copies/ mL)	Sample status ^c	Percentage correct qualitative results (all)		Reported Cq values (For information purposes only)	
				%	Total datasets	Median (range)	Total datasets
CVOP20S-01	SARS-CoV-2	4.30	CORE	98.1	521	29.1 (15.8–41.6)	449
CVOP20S-02	HCoV-NL63	4.64	EDUC	96.9	521	NA	NA
CVOP20S-03	SARS-CoV-2	3.30	CORE	96.9	521	32.2 (18.0-43.0)	450
CVOP20S-04	HCoV-OC43	4.03	EDUC	97.1	521	NA	NA
CVOP20S-05	Negative	NA	CORE	97.3	521	NA	NA
CVOP20S-06	SARS-CoV-2	4.30	CORE	98.5	521	29.2 (16.6–40.0)	450
CVOP20S-07	SARS-CoV-2	5.30	CORE	99.2	521	25.9 (12.0–39.0)	453
CVOP20S-08	SARS-CoV-2	2.30	CORE	86.0	521	35.0 (22.7–43.3)	400

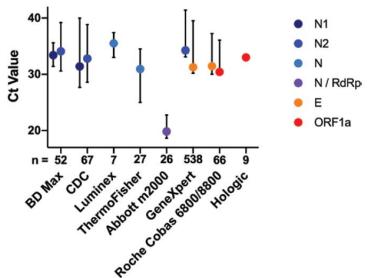
- Ergebnisse im Wesentlichen korrekt
- Erhebliche Varianz bei den C_t-Werten für dieselbe Probe





Varianz von C_t- oder C_α-Werten für SARS-CoV-2

- Vergleichsstudie mit mehr als 700 Laboren durch das College of American Pathologists, Analyse derselben Proben
- Abweichung um bis zu 14 Zyklen



C_t-Werte für Zielgene und Hersteller für dasselbe Testmaterial. Median des C_t-Wertes (gefüllte Kreise) und Wertebereich. Die Zahl der Antworten zur Übersicht ist zur jeweiligen Methode unterhalb der x-Achse angegeben.



Varianz von C_t- oder C_q-Werten für SARS-CoV-2

Relativ große Varianz in Abhängigkeit von

- Qualität des Abstrichs
- Dauer und Art des Probenaufbewahrung
- Gerät
- Messmethode
- Zielgen
- Methode der RNA-Isolation
-





C_t-Werte für dieselbe Probe variieren stark zwischen verschiedenen Labors

Erfassung durch Gesundheitsämter nur sehr eingeschränkt sinnvoll



Einwand:

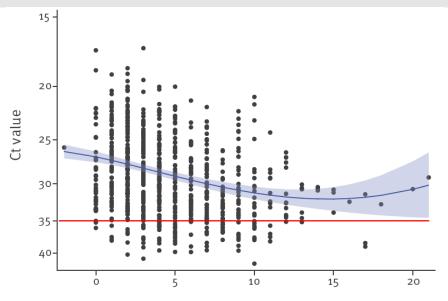
"Es werden häufig PCR-Tests als positiv bewertet, wo der C_t -Wert sehr hoch (z.B. > 35) und der Virus-Nachweis deshalb fragwürdig ist."





Typische C_t- oder C_q-Werte für SARS-CoV-2

- Studie aus England, Januar bis April 2020



Time to collection post symptom onset (days)

Detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR targeting the RdRp gene, England, January—April 2020 (n = 754).

Rote Linie bei C_t = 35 hinzugefügt vom Vortragenden.



| Vorstellung | PCR | qPCR | SARS-CoV-2-Detektion | Meldung |

Typische C_t- oder C_q-Werte für SARS-CoV-2

 - Untersuchung aus einem Pflegeheim im King County, Washington State, USA im März 2020

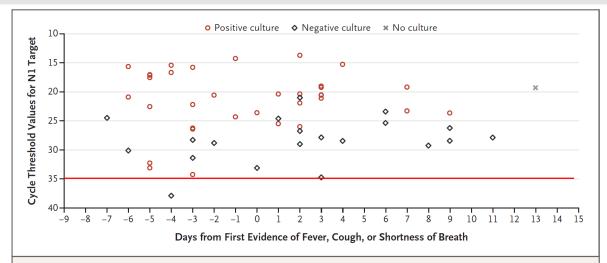


Figure 3. Cycle Threshold Values Relative to First Evidence of Fever, Cough, or Shortness of Breath.

Shown are N1 target cycle threshold values and viral culture results for each resident's positive tests for SARS-CoV-2 shown by day since the first evidence of fever, cough, or shortness of breath (N=55). Dates of onset of typical symptoms were known for 43 residents; 12 residents with two specimens that were positive for SARS-CoV-2 are also included. One positive test was not assessed for culture growth. The relationship between the first test and the second test for residents who had two positive tests is shown in Figure S2.

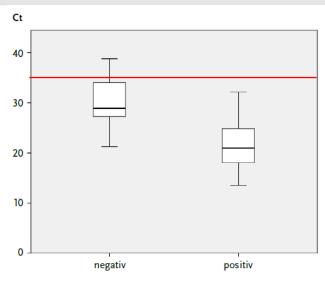
Rote Linie bei C_t = 35 hinzugefügt vom Vortragenden.





Typische C_t- oder C_q-Werte für SARS-CoV-2

 Untersuchung des Klinikums Stuttgart zur Aussagekraft eines Antigentests in der Notaufnahme



SARS-CoV-2-Antigen-Test

Abb. 1 | Boxplot mit Darstellung des Ergebnisses des Antigen-Tests in Abhängigkeit der mittleren Ct-Werte der RT-PCR. Patient*innen der Notaufnahme (n = 468), Klinikum Stuttgart, 5.10.–7.11.2020

Rote Linie bei C₁ = 35 hinzugefügt vom Vortragenden.

Quelle: RKI 2021 Epidemiologisches Bulletin vom 21.1.2021





In verschiedenen Studien die allermeisten C_t - oder C_q -Werte kleiner als 35. Sehr hohe C_t - oder C_q -Werte nicht häufig.



Einwand:

"Der PCR-Test bringt nichts, weil nur Menschen mit Symptomen infektiös sein können."

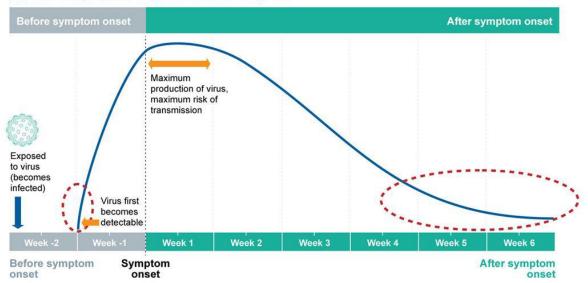




Zusammenhang zwischen Symptomen und Infektiosität

- Schwerwiegende Symptome → größere Infektiosität
- Größte Infektiosität bei oder kurz vor Beginn der Symptome

COVID-19 symptom onset schematic diagram







Höhepunkt der Infektiosität ungefähr bei Symptombeginn, also vorher schon hoch.

Auch Infizierte ohne Symptome in gewissem Maße infektiös.



Einwand:

"Bei C_t-Werten über 35 ist gar kein Virus mehr da. Der PCR-Test täuscht dann etwas vor, was nicht wirklich da ist."





Zusammenhang zwischen C_t- oder C_q-Werten für SARS-CoV-2 und Infektiosität

- Studie zur Entlassung
- Patienten mit C_t über 33 34 in deren System nicht infektiös
- Detektion von SARS-CoV-2 bis 20 Tage nach Symptombeginn, aber keine Virus-Isolierung mehr nach Tag 8

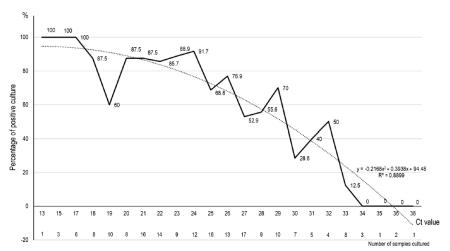


Fig. 1 Percentage of positive viral culture of SARS-CoV-2 PCR-positive nasopharyngeal samples from Covid-19 patients, according to Ct value (plain line). The dashed curve indicates the polynomial regression curve

"One limitation of our work is that it cannot be extrapolated to other hospital centers since they use different systems of sample transport, of RNA extraction, and of PCR with different primers and probes …"

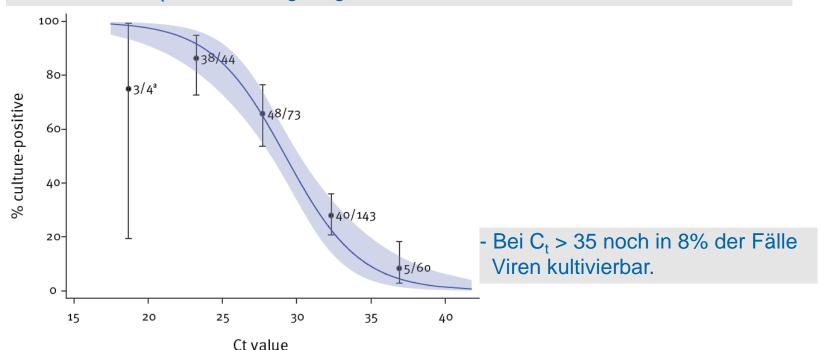
59 **4**5





Zusammenhang zwischen C_t- oder C_q-Werten für SARS-CoV-2 und Infektiosität

- Studie aus England, Januar April 2020
- Je höher der C_t-Wert, desto geringer die Kultivierbarbarkeit der Viren





Einwand:

"Bei C_t-Werten über 35 ist gar kein Virus mehr da. Der PCR-Test täuscht dann etwas vor, was nicht wirklich da ist."

Auch bei C_t-Werten über 35 ist ein eindeutiger Nachweis des Virus möglich.

Aber:

In der Tat bei zurückgehender Krankheit bei $C_t > 35$ i.d.R. keine Infektiosität mehr.



Sollte man C_t-Werte über 35 generell als "negativ" werten?

Nein!!

- Einzelne Infizierte auch bei Abklingen bei C₁ > 35 infektiös.
- Am Ende der Infektion Viren voller Antikörper, zu Beginn nicht. Situation allein durch eine Messung nicht eindeutig zu bewerten.



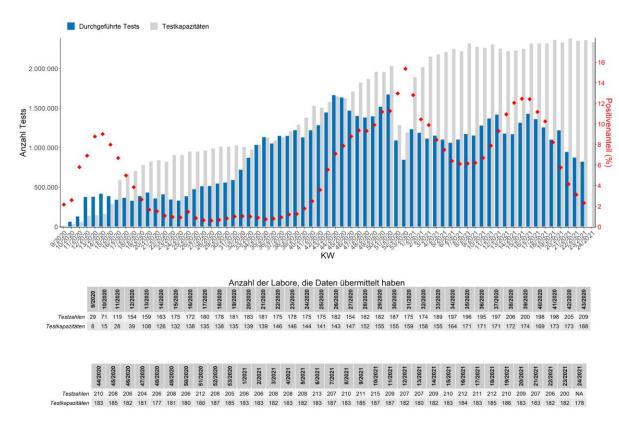
Einwand:

"Wenn man mehr testet, findet man mehr Infizierte. Anstieg kommt durch zunehmende Testung."





Testhäufigkeit und Anteil positiver Tests



In "Wellen" mehr durchgeführte Tests

In "Wellen" starker Anstieg des Anteils positiver Tests



Testhäufigkeit und Anteil positiver Tests

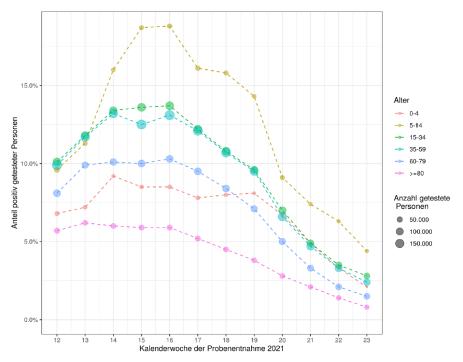


Abbildung 8: Anteil der positiv getesteten Personen von allen im Rahmen der laborbasierten Surveillance SARS-CoV-2 übermittelten getesteten Personen nach Kalenderwoche der Probenentnahme und unter Berücksichtigung der Anzahl der getesteten Personen. Die Punktgröße spiegelt die Anzahl der gesamtgetesteten Personen pro Kalenderwoche wider. Dargestellt werden die letzten 12 Kalenderwochen (Datenstand 15.06.2021; 76 übermittelnde Labore).



Einwand:

"Wenn man mehr test trandet man mehr Infizierte. Anstieg kommt durch zuneb "end Testung."

In der Tat: bei mehr Testung mehr positive Ergebnisse.

Trotzdem irreführend.

Entscheidend: in den Wellen auch erhöhter Anteil an positiven Tests!!!



Wie Möglichkeit der Quantifizierung und Qualitätskontrolle?





Material für SARS-CoV-2-Ringversuche in Deutschland

Organisierte Qualitätskontrolle

BEGLEITHEFT



Quantitative Bezugsproben zur Verbesserung der Vergleichbarkeit und Bewertung von Laborergebnissen zum Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2

> Informationen zur Testdurchführung und Anwendung der quantitativen Bezugsproben

inkl. Anhang Auswertung der Ergebnisse vom 1. Versand (03.11. 2020) und 2. Versand (17.11.2020)

3. Versand am 15. Januar 2021

Die quantitativen Bezugsproben werden auf Basis einer Kooperation zwischen

- dem Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionskrankheiten und Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene/Hochpathogene Viren,
- dem Konsiliarlabor für Coronaviren am Institut für Virologie der Charité Universitätsmedizin Berlin,
- INSTAND e.V. als Referenzinstitution der Bundesärztekammer für die externe Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien und
- der ad hoc-Gruppe der Gemeinsamen Diagnostikkommission der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) und der Gesellschaft für Virologie (GfV)

zur Verfügung gestellt.

Ansprechpartner:

INSTAND-Ringversuchsleiter: Univ.-Prof. i.R. Dr. Heinz Zeichhardt

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Heinz Zeichhardt IQVD GmbH Institut für Qualitätssicherung in der Virusdiagnostik Potsdamer Chaussee 80. 14129 Berlin

Tel.: +49-(0)30-81054-300; Fax: +49-(0)30-81054-303

Email: Heinz.Zeichhardt@iqvd.de

Stelly, INSTAND-Ringversuchsleiter:

Dr. Martin Kammel c/o INSTAND e.V. Ubierstr. 20, 40223 Düsseldorf Tel.: +49-(0)30-81054-300 Fax: +49-(0)30-81054-303 Email: M.Kammel@igvd.de

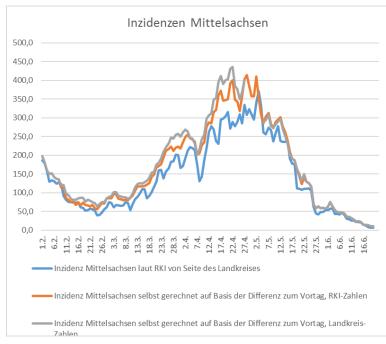


4. Meldung von PCR-Daten aus Mittelsachsen an das RKI



Vorstellung | PCR | qPCR | SARS-CoV-2-Detektion | Meldung |

Diskrepanz bei Inzidenzwerten für Mittelsachsen

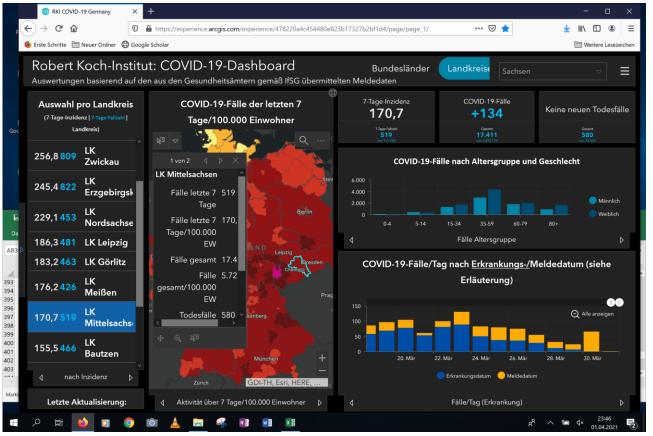


- Seit Anfang Februar systematische Diskrepanzen in Inzidenzzahlen für Mittelsachsen
- Maximale Abweichung 16.4.: 164 (395 statt offiziell 231)
- Wesentliche Ursachen:
 - Beim Landkreis Mitzählen registrierter Schnelltests, bei RKI nicht
 - Meldung so, dass nur 6 Tage pro Woche erfasst
- Am 26./27.4. Umstellung beim Landkreis:
 - Schnelltests nicht mehr dabei
 - Änderung des Meldezeitpunktes
- Diskrepanz zwischen offizieller Inzidenz und Inzidenz auf Basis der Differenz zum Vortag (1.2. bis 20.6.)
- BRD: 5%
- Sachsen: 13%
- Mittelsachsen bis 26.4.: 24% (mit Schnelltests 33%) ab 27.4.: 18%





Screenshots vom RKI-Dashboard (Beispiel 1.4.2021)



Ouelle: RKI Dashoard





Screenshots vom RKI-Dashboard (Beispiel 1.4.2021)



Quelle: RKI Dashoard

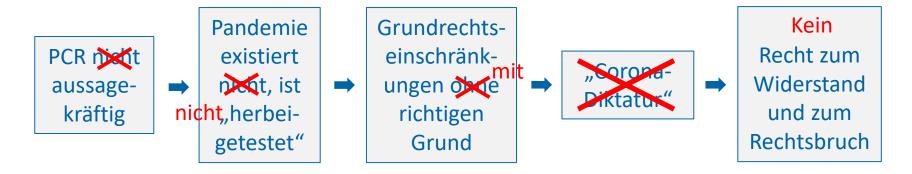
58





Die PCR-Reaktion und der Rechtsstaat

Argumentationslinie der Gegner der Corona-Maßnahmen: Richtig ist:





Vielen Dank für die Aufmerksamkeit!

Glück auf!





Nachweissystem der Drosten-Gruppe

PCR-Reaktionsgemisch (25 µl):

- · 5 µl RNA
- 12,5 µl 2 x Reaktionspuffer mit
 Taq-Polymerase,
 0,4 mM von jedem dNTP u.
 3,2 mM MgSO₄
- 1 µl Reverse Transkriptase
- · 0,4 μl 50mM MgSO₄
- 1 µg Rinderserumalbumin
- Primer und Sonde wie in Tabelle

Temperaturprogramm:

10 Min. 55°C Reverse Transkription
3 Min. 95°C Denaturierung
45 Zyklen mit 15 Sek. 95°C
30 Sek. 58°C

Gerät: Roche Light Cycler oder Applied Biosystems ViiA₇



Quencher im Nachweissystem der Drostengruppe

