

BIOTECHNOLOGISCHE VERFAHREN – PCR UND ANTIGEN-SCHNELLTESTS

Einführung

In dieser Unterrichtseinheit lernen die Schülerinnen und Schüler das Grundprinzip und die Einsatzmöglichkeiten der Polymerase-Kettenreaktion und der Antigen-Schnelltests kennen.

Die Erarbeitung kann in Einzelarbeit oder in arbeitsteiliger Paar- oder Gruppenarbeit erfolgen.

Informationen für die Lehrkraft

Die **Polymerase-Kettenreaktion** (PCR = polymerase chain reaction) ist seit gut 30 Jahren eine der wichtigsten Methoden der Molekularbiologie. Das Ziel der Methode ist die Vervielfältigung von Erbsubstanz. Wichtige Einsatzgebiete der PCR sind beispielsweise die medizinische Diagnostik – zum Nachweis von Virusinfektionen oder Erbkrankheiten – oder die Ermittlung von Verwandtschaftsverhältnissen durch das Erstellen von sogenannten genetischen Fingerabdrücken. Die Bezeichnung „Kettenreaktion“ kommt daher, dass das Verfahren in mehreren Zyklen abläuft: In jedem Zyklus verdoppelt sich die Erbsubstanz und dient danach wieder direkt als Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus, wodurch eine exponentielle Vermehrung möglich ist. Kary B. Mullis entwickelte die Methode und bekam dafür im Jahr 1993 den Nobelpreis für Chemie verliehen. Das Grundprinzip der PCR ist relativ einfach: Ein ganz bestimmter Teil der Erbsubstanz soll vervielfältigt werden. In der Forensik wird beispielweise versucht, einzigartige Teile der DNA von einem möglichen Tatort so häufig zu vervielfältigen, dass sie im Anschluss mittels Gelelektrophorese analysiert und mit einer möglichen Täter-DNA verglichen werden können. Sowohl bestimmte Gene als auch nicht-codierende Bereiche der DNA können mit der Methode kopiert werden, wenngleich nur die Kopie vergleichsweise kurzer DNA-Abschnitte möglich ist.

Materialien und Ablauf

Der Vorgang selbst findet heutzutage in speziellen Thermocyclern statt. Das sind Geräte, die Proben und weitere Komponenten auf bestimmte Temperaturen genau erhitzen und abkühlen können. Um die PCR durchführen zu können, werden die folgenden Komponenten benötigt:

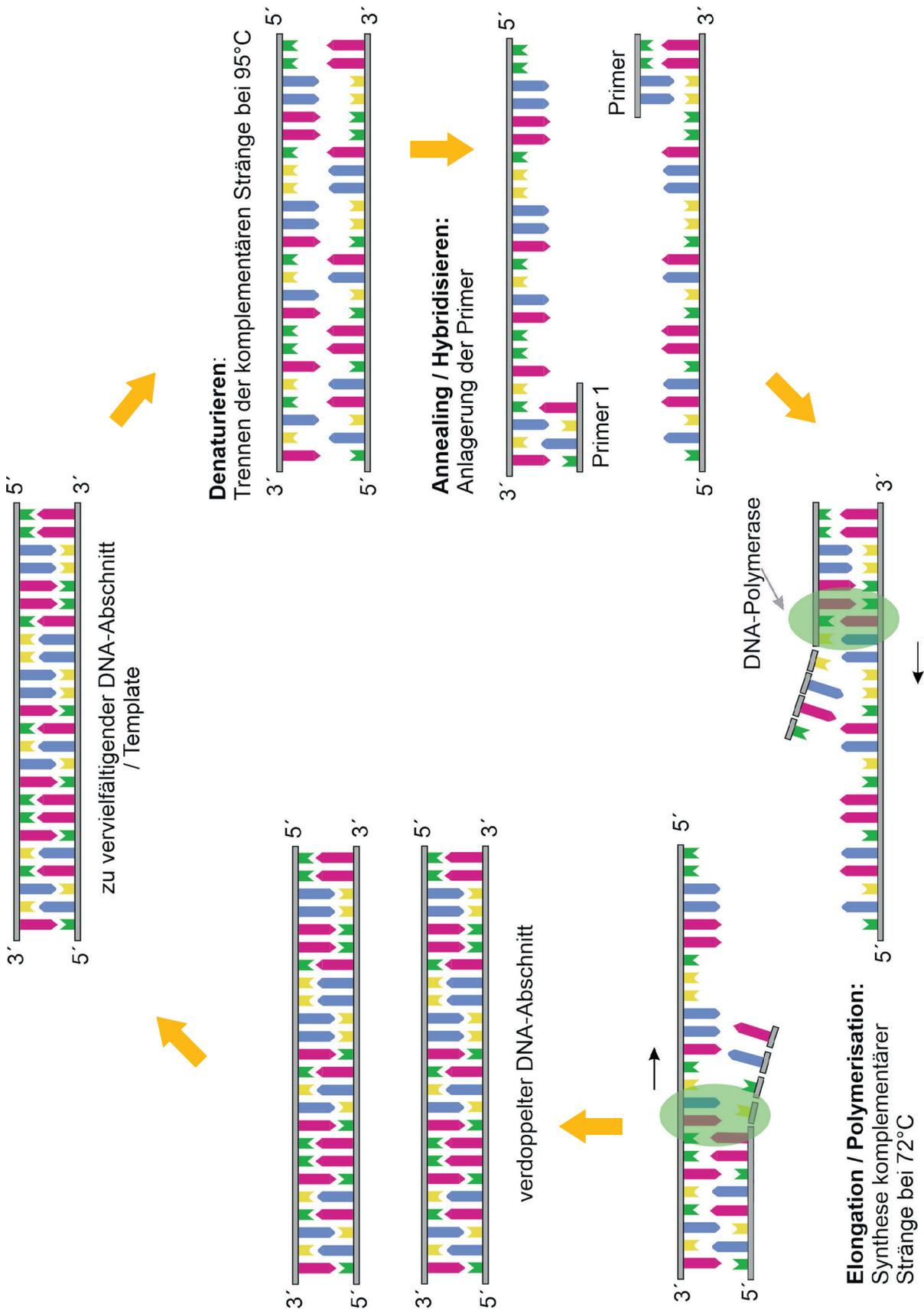
- Die zu vervielfältigende DNA-Probe
- Hitzebeständige DNA-Polymerase, da der Vorgang bei teils sehr hohen Temperaturen stattfindet und „normale“ Polymerasen dabei zerstört werden würden. Häufig wird die Taq-Polymerase eingesetzt. Das ist eine hitzebeständige DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*.
- Zwei Primer (kurze Oligonukleotide), die auf den Einzelsträngen der DNA den Startpunkt festlegen, ab dem der DNA-Abschnitt repliziert wird. Ab diesem Startpunkt arbeitet dann die DNA-Polymerase.
- Desoxyribonukleosidtriphosphate, die von der DNA-Polymerase zur Synthese des neuen Strangs verwendet werden.
- Mg^{2+} -Ionen für die DNA-Polymerase
- Puffer

Das Gesamtvolumen der Komponenten übersteigt dabei häufig nicht einmal 0,1 ml, weshalb die Reaktionsgefäße sehr klein sind und eine entsprechend feine Pipette verwendet werden muss.

Der Ablauf erfolgt in mehreren Zyklen. Jeder Zyklus gliedert sich in drei Abschnitte: Denaturierung (auch Melting genannt), Hybridisierung (auch Annealing genannt) und Polymerisation (auch Elongation genannt). Dabei erfolgt jeweils eine Verdopplung der ursprünglichen DNA. Nach einem Zyklus liegen somit zwei Kopien vor, nach zwei Zyklen vier Kopien, ...

1. Denaturierung: Im Englischen wird in dieser Phase auch von „melting“, also schmelzen, gesprochen. Diese Bezeichnung trifft es sehr gut, da die DNA zunächst auf ca. 95 °C erhitzt wird. Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen der DNA aufgebrochen und die Stränge trennen sich voneinander.
2. Die Hybridisierung wird in der Literatur teilweise auch als Anlagerung bezeichnet. Dies rührt daher, dass sich in dieser Phase die beiden Primer bei ca. 58 °C jeweils an einen Einzelstrang der DNA anlagern und somit den Startpunkt für die Polymerase markieren.
3. Die Polymerisation erfolgt bei 72 °C. Dabei ergänzt die DNA-Polymerase die Einzelstränge zu Doppelsträngen. Am Ende dieser Phase liegen zwei exakt gleiche DNA-Doppelstränge vor, die nun das Ausgangsmaterial für weitere Durchläufe bilden.

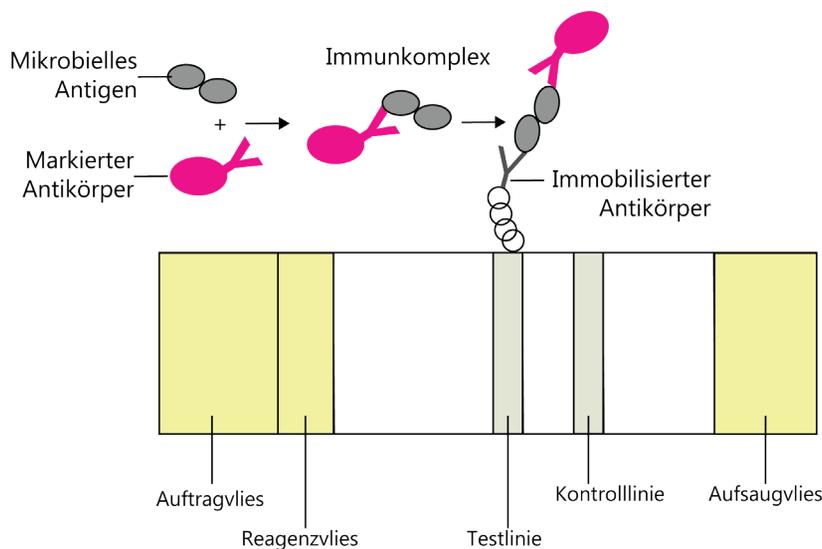
BIOTECHNOLOGISCHE VERFAHREN – PCR UND ANTIGEN-SCHNELLTESTS



BIOTECHNOLOGISCHE VERFAHREN – PCR UND ANTIGEN-SCHNELLTESTS

Dieser Zyklus findet meist 20 bis 40 Mal statt und kann mehrere Stunden dauern. Ziel ist es, eine möglichst große Menge an Replikationen des DNA-Abschnitts zu erhalten. Da die Primer sehr spezifisch an bestimmte Abschnitte der DNA andocken, ist nach Abschluss des Verfahrens leicht feststellbar, ob beispielsweise das Virus-Erbgut in der zu testenden Probe enthalten war. Kam es zur Vervielfältigung, ist die Probe als positiv zu bewerten. Kam es nicht zu einer Vervielfältigung, war die Virus-Erbsubstanz mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in der Probe enthalten.

Eine deutlich schnellere Methode zum Nachweis einer Krankheit sind **Antigen-Schnelltests**. Hier liegt ein Ergebnis meist schon nach rund 15 Minuten vor. Im Vergleich zum PCR-Verfahren sind die Schnelltests jedoch deutlich ungenauer. Die Schnelltests basieren auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Sowohl die Qualität als auch die Quantität der zu untersuchenden Antigene kann damit bis zu einem gewissen Maße bestimmt werden. Solche mikrobiologischen Schnelltests beruhen auf dem Prinzip der Immunchromatographie: Erkennen spezifische Antikörper im Test-Kit die dazu passenden Antigene aus der zu untersuchenden Probe, wird das Antigen an den Antikörper gebunden und durch einen zweiten und farblich markierten Antikörper auf dem Test-Kit sichtbar gemacht. Es entsteht der typische Farbumschlag.



Zunächst wird die Probe auf das Auftragsvlies gegeben. Anschließend fließt die Probe durch das Reagenzvlies. Falls das Antigen in der Probe enthalten ist, bindet dort der markierte Antikörper. Da sehr viele Antikörper vorhanden sind, wandern diese mit der Probe weiter und erreichen die erste Reagenzzone (hier die Testlinie). Dort befindet sich ein immobilisierter Antikörper, der gegen eine andere Stelle des Antigens gerichtet ist und an den Immunkomplex bindet. In der zweiten Zone (hier die Kontrolllinie) befinden sich Sekundärantikörper, die an die freien Antikörper binden, allerdings nicht an den Immunkomplex. Bei einem korrekt durchgeführten Test setzt in der Kontrollzone daher

immer ein Farbumschlag ein. Nur bei einem positiven Test färbt sich zusätzlich noch die Testlinie.

Ein entscheidender Nachteil der Schnelltests ist, dass ein positives Ergebnis immer nur bei einer ausreichend hohen Konzentration an Antigenen erzielt wird. In einem frühen Stadium einer Virus-Erkrankung kann die Viruslast noch nicht ausreichend hoch sein, um zu einem positiven Testergebnis zu führen, obwohl die getestete Person bereits infiziert ist.

Antigen-Schnelltests unterscheiden sich zudem in ihrer Qualität. Qualitätsmerkmale sind die Sensitivität und die Spezifität. Grundsätzlich ist festzuhalten, dass eine höhere angegebene Sensitivität zu einer höheren Trefferquote von tatsächlich infizierten Personen führt. Je höher die Spezifität, desto wahrscheinlicher ist es, dass gesunde Personen nicht fälschlicherweise als krank erkannt werden.

Schnelltests werden nicht nur zum Nachweis von Infektionen mit Krankheitserregern verwendet. Das Prinzip findet auch in Schwangerschaftstests Anwendung. Allerdings werden dort keine Virusproteine nachgewiesen, sondern die Anwesenheit des Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin (hCG).

BIOTECHNOLOGISCHE VERFAHREN – PCR UND ANTIGEN-SCHNELLTESTS

Ablauf der Unterrichtseinheit >>> [Link zu den Arbeitsblättern](#)

Phase	Inhalt	Sozial-/Aktionsform
Einstieg (5 Minuten)	Die Lehrkraft stellt ein Szenario vor: Für einen Konzertbesuch ist sicherzustellen, dass alle Besucherinnen und Besucher nicht mit einer bestimmten Krankheit infiziert sind. Wie kann das gewährleistet werden? Schnell sollte eine Diskussion über mögliche Testverfahren entstehen.	Plenum
Erarbeitung I (30 Minuten)	Die Lernenden bearbeiten Arbeitsblatt 1 zur PCR. Eine eigenständige Kontrolle von Aufgabe 1 bis 4 kann erfolgen.	Einzel-/Gruppenarbeit, Plenum
Erarbeitung II (30 Minuten)	Die Lernenden bearbeiten Arbeitsblatt 2.	Einzel-/Gruppenarbeit
Sicherung	Die Ergebnisse von Arbeitsblatt 2 werden besprochen. Es entsteht eine Diskussion über die Zuverlässigkeit von Selbsttests. Alternative: Die Lernenden kontrollieren eigenständig mit Lösungskarten, ob sie die Abbildung korrekt beschriftet haben. Eine Diskussionen im Plenum erfolgt dennoch.	Plenum

Didaktisch-methodischer Kommentar

Relevanz des Themas

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode / ein Verfahren zur Vervielfältigung von Erbsubstanz. Während diese Methode unter anderem zu den Standardmethoden in der medizinischen Diagnostik zur Vervielfältigung von Virus-Erbgut gehört, war das Verfahren vor dem Beginn der COVID-19-Pandemie nur wenigen Menschen ein Begriff. Da die PCR jedoch zu Beginn der Pandemie die einzige zuverlässige Methode zum Nachweis einer Infektion war, wurde der Begriff schnell auch der breiten Bevölkerung bekannt. Dabei wird die PCR nicht nur zur Diagnose von Krankheiten verwendet: Sie wird beispielsweise auch zur Analyse von Verwandtschaftsverhältnissen und in der Kriminalistik verwendet, um DNA-Spuren zu analysieren und mögliche Täterinnen und Täter zu finden.

Im Verlauf der Pandemie wurden auch sogenannte Schnelltests zum Nachweis einer Infektion mit SARS-CoV-2 entwickelt und zugelassen. Mittlerweile sind sie ein häufig benutztes Verfahren, um Infektionen auszuschließen. Der entscheidende Vorteil gegenüber der PCR-Methode ist, dass ein Testergebnis bereits nach rund 15 Minuten vorliegt. Im Gegenzug sind Schnelltest weniger genau, weshalb nach einem positiven Schnelltest immer auch ein PCR-Test erfolgen muss, um eine Infektion zweifelsfrei belegen zu können. Das Grundprinzip des Schnelltests wird allerdings nicht nur beim Nachweis von Infektionskrankheiten verwendet. Beispielsweise basieren auch Schwangerschaftstests auf demselben Prinzip.

Didaktisch-methodische Analyse

In der Unterrichtseinheit erarbeiten sich die Lernenden einen Großteil durch eigenständige Recherche selbst. Dabei werden sie durch kurze Informationstexte zu Beginn jeder Aufgabe unterstützt. Dennoch sind sie angehalten, unklare Begrifflichkeiten und essenzielle Informationen zum Bearbeiten der Aufgaben selbstständig zu recherchieren, zu strukturieren und zu bewerten.

Im Sinne der Differenzierung können alle möglichen Begriffe der Abbildung auf Arbeitsblatt 2 bereits vor dem Bearbeiten der Aufgabe genannt werden, sodass die Lernenden bei der Begriffswahl eingeschränkter sind. Dies bietet sich vor allem für leistungsschwächere Schülerinnen und Schüler an. Fächerverbindend zum Mathematikunterricht berechnen die Lernenden außerdem Prozentwerte zum Abschluss des Arbeitsblatts.

BIOTECHNOLOGISCHE VERFAHREN – PCR UND ANTIGEN-SCHNELLTESTS

Dabei erkennen sie, dass Schnelltests zwar ein schnelles Ergebnis liefern, es aber durchaus vorkommen kann, dass Personen zu Unrecht positiv oder negativ getestet werden, und dass dies vor allem bei großen Testgruppen ein entscheidender Faktor sein kann.

Der Lehrkraft ist es freigestellt, ob sie die Lösungen mit der gesamten Lerngruppe bespricht. Alternativ kann sie auch die richtigen Lösungen zum eigenständigen Kontrollieren auslegen.

Das Material eignet sich zum Einsatz im naturwissenschaftlichen Unterricht in den Jahrgangsstufen 11 bis 13.

Vorkenntnisse

Die Lernenden sollten Vorkenntnisse im Bereich der Genetik und speziell im Aufbau und in der Vervielfältigung von DNA besitzen. Um zu verstehen, welche „Materialien“ für eine PCR verwendet werden und wie diese abläuft, sollten die Lernenden die wesentlichen Bestandteile der DNA sowie notwendige Enzyme und biochemische Abläufe bei der Vervielfältigung der Erbsubstanz kennen.

Für die Berechnung der falsch-negativen und falsch-positiven Schnelltest sind die Grundlagen der Prozentrechnung ausreichend und lassen sich auch mittels Dreisatzes einfach darstellen.

Kompetenzen

Fachkompetenz

Die Schülerinnen und Schüler

- beschreiben die Grundprinzipien biologischer Arbeitstechniken und biotechnologischer Verfahren (PCR und Antigen-Schnelltests) zum Nachweis von Krankheiten und weiterer Einsatzmöglichkeiten.
- erläutern den Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion und von Antigen-Schnelltests.
- analysieren mögliche Fehler bei der Durchführung von Schnelltests und bewerten die Zuverlässigkeit.

Medienkompetenz

Die Schülerinnen und Schüler

- nutzen das Smartphone oder den PC zur Recherche.

Sozialkompetenz

Die Schülerinnen und Schüler

- helfen sich gegenseitig bei Fragen und Problemen.
- bereiten ihre Ergebnisse adressatengerecht auf.

DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) – MUSTERLÖSUNG

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) ist ein Standard-Verfahren der Molekularbiologie. Es wird dazu verwendet, um bestimmte Abschnitte der Erbsubstanz (z. B. DNA) zu vervielfältigen. Die Bezeichnung „Kettenreaktion“ kommt daher, dass das Verfahren in mehreren Zyklen abläuft: In jedem Zyklus verdoppelt sich die Erbsubstanz und dient danach wieder direkt als Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus, wodurch eine exponentielle Vermehrung möglich ist. Kary B. Mullis entwickelte die Methode und bekam dafür im Jahr 1993 den Nobelpreis für Chemie verliehen. Im Gegensatz zur DNA-Replikation wird nicht das gesamte Genom verdoppelt. Bei der PCR wird nur ein bestimmter Teil vervielfältigt.

Informationsvideo zur PCR: <https://youtu.be/cqSTjJVO-il>

Aufgabe 1

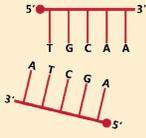
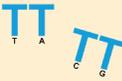
Recherchieren Sie, in welchen Bereichen die Polymerase-Kettenreaktion verwendet wird. Nennen Sie mindestens drei Anwendungsbereiche für eine PCR.

Vaterschaftstest, Erkennung von Virusinfektionen, genetischer Fingerabdruck, Diagnose von Erbkrankheiten

Aufgabe 2

Benennen Sie die einzelnen Komponenten und ordnen Sie ihnen die richtige Funktion zu.

Für eine PCR werden verschiedene Komponenten benötigt: Zunächst wird die DNA-Probe mit dem zu untersuchenden Abschnitt der Erbsubstanz (die sogenannte Template DNA) benötigt. Des Weiteren werden Primer, DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) gebraucht.

Komponenten	Funktion
 <p>Template-DNA</p>	 <p>Dieser Abschnitt der DNA dient als Vorlage zur Vervielfältigung.</p>
 <p>Primer</p>	 <p>Diese spezielle Polymerase ist besonders hitzebeständig und synthetisiert den neuen DNA-Strang.</p>
 <p>DNA-Polymerase</p>	
 <p>dNTPs</p>	 <p>Die DNA-Polymerase nutzt diese Bausteine, um den neuen DNA-Strang zu synthetisieren. Für jede Base gibt es diese Nukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).</p>

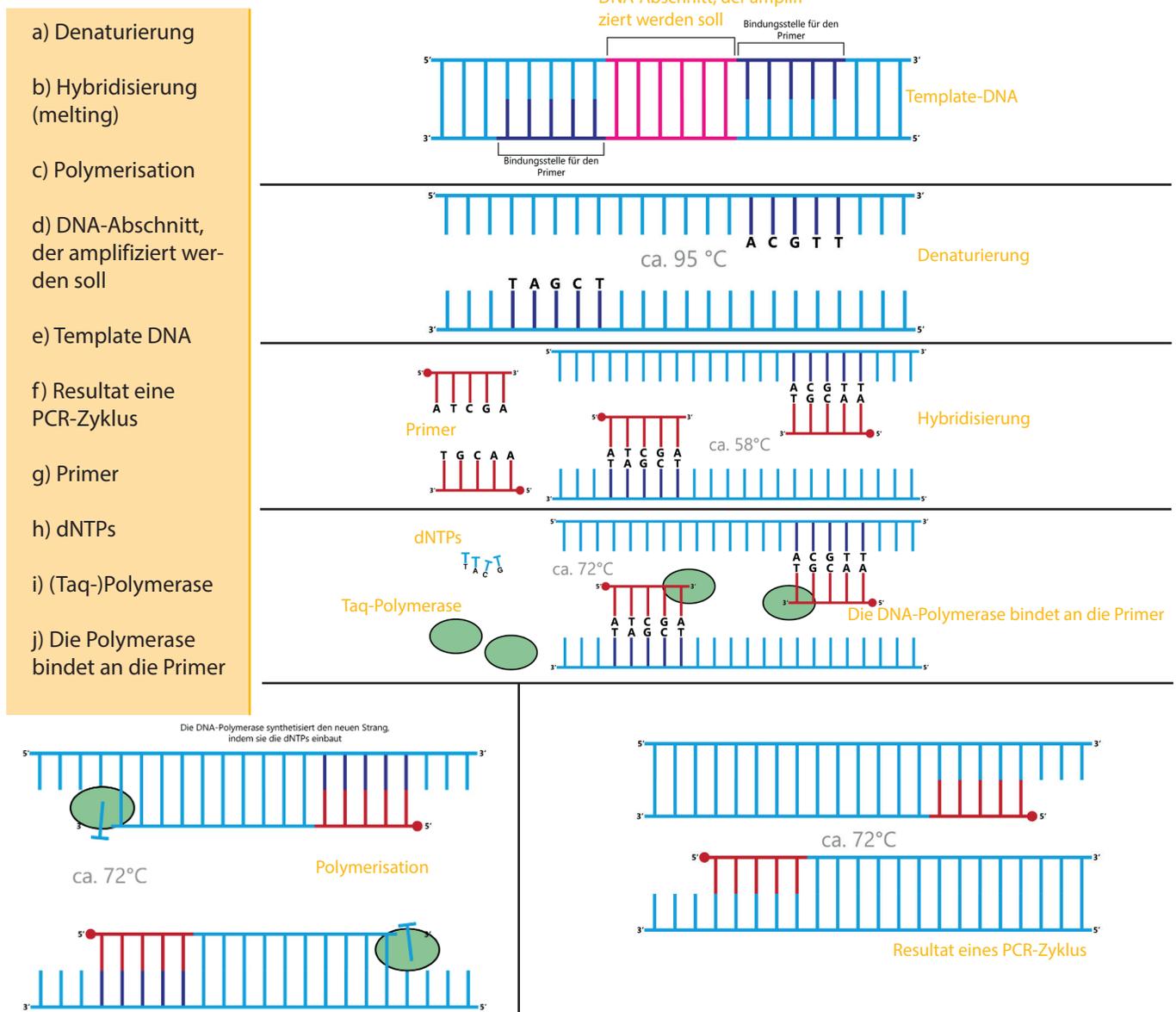
Aufgabe 3

Benennen Sie die einzelnen Phasen eines PCR-Zyklus und ordnen Sie die Begriffe den Abbildungen auf der folgenden Seite zu.

DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) – MUSTERLÖSUNG

Eine Polymerase-Kettenreaktion läuft grundsätzlich in drei Phasen ab:

- Bei der Denaturierung wird die DNA „geschmolzen“. Daher spricht man im Englischen auch von „melting“. Dabei trennt sich der Doppelstrang bei ca. 95 °C in zwei Einzelstränge.
- Bei der Hybridisierung lagern sich die Primer an die beiden Einzelstränge an und markieren den Startpunkt für die Polymerase. Dieser Vorgang geschieht bei ca. 58 °C.
- Die Polymerisation läuft bei 72 °C ab. Hier ergänzt die DNA-Polymerase die beiden Einzelstränge durch dNTPs zu zwei neuen Doppelsträngen, die sich exakt gleichen. Sie dienen als Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus.



Aufgabe 4

Für eine PCR wird eine besondere Polymerase verwendet. Finden Sie heraus, um welche Polymerase es sich handelt und begründen Sie, warum der Einsatz dieser speziellen Polymerase so wichtig für das Verfahren ist.

Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*; sie ist besonders hitzestabil, was für die PCR notwendig ist.

Aufgabe 5

Es gibt verschiedene Varianten der PCR, die für verschiedene Zwecke verwendet werden. Informieren Sie sich über Reverse Transkriptase-PCR und begründen Sie, warum für den Nachweis der meisten Virus-Infektionen (zum Beispiel SARS-CoV-2) die Reverse Transkriptase-PCR eingesetzt wird. Virus-RNA muss zunächst in DNA umgewandelt werden.

ANTIGEN-SCHNELLTESTS – MUSTERLÖSUNG

Zu Beginn der COVID-19-Pandemie war der Nachweis einer Infektion mit dem Virus nur mittels PCR-Verfahren möglich. Auch heute gilt dieser Test als sicherste Methode, um eine Infektion festzustellen oder auszuschließen. Mit dem Fortschreiten der Pandemie wurden allerdings auch neue und schnellere Tests entwickelt und zugelassen. Dabei handelt es sich unter anderem um sogenannte Antigen-Schnelltests. Während man bei einem PCR-Test meist mehrere Stunden auf das Ergebnis warten muss, erhält man bei einem Antigen-Schnelltest bereits nach wenigen Minuten ein Ergebnis. Dieses Prinzip wird nicht nur für den Nachweis von Krankheiten verwendet, sondern kommt zum Beispiel auch bei Schwangerschaftstests zum Einsatz. Es beruht dabei auf der sogenannten Immunchromatographie. Im Test-Kit sind besondere Antikörper vorhanden. Erkennen diese Antikörper spezielle Antigene (das kann zum Beispiel ein Strukturprotein des Virus aus der Speichelprobe sein oder ein bestimmtes Hormon im Urin bei einem Schwangerschaftstest), kommt es zu einer Farbreaktion. Der Test erscheint positiv. Sind keine oder nur wenige Antigene vorhanden, bleibt die Farbreaktion aus.

Aufgabe 1

Das Grundprinzip von Antigen-Schnelltests ist bei den meisten Tests häufig gleich. Zunächst wird die Probe (Speichel, Rachenabstrich, Urin, ...) auf das Auftragsvlies der Test-Kassette gegeben und die Probe fließt dort in Richtung Reagenzvlies. Dieses ist von außen nicht sichtbar. Dort befindet sich eine große Menge speziell markierter Antikörper, die an den Antigenen in der Probe binden, falls sie darin enthalten sind. Die ungebundenen Antikörper wandern mit dem Rest der Probe weiter und erreichen die erste Reagenzienzone (Testlinie – auf der Kassette meist mit einem T markiert). Dort befindet sich ein immobilisierter Antikörper, der gegen eine andere Stelle des Antigens gerichtet ist und an den Immunkomplex bindet. In der zweiten Reagenzienzone (Kontrolllinie – meist mit einem C (control) gekennzeichnet) befinden sich Sekundärantikörper, die an die freien Antikörper binden, allerdings nicht an den Immunkomplex. Bei einem korrekt durchgeführten Test setzt in der Kontrollzone daher immer ein Farbumschlag ein. Nur bei einem positiven Test färbt sich zusätzlich noch die Testlinie.

Beschriften Sie die Abbildung auf der folgenden Seite.

Aufgabe 2

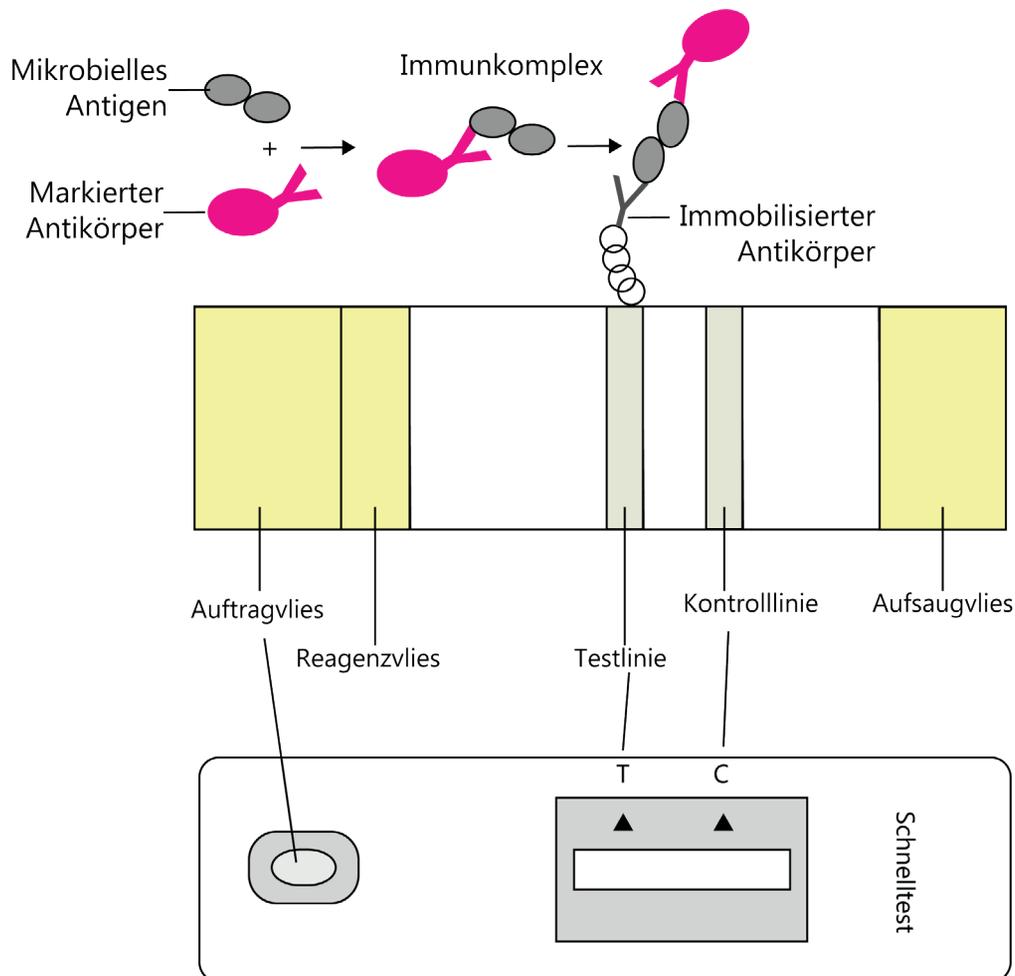
Prinzipiell gilt, dass Schnelltests im Vergleich zu PCR-Tests weniger genau sind. Hierbei spielen die Spezifität und die Sensitivität der Schnelltests eine entscheidende Rolle für die Genauigkeit.

Recherchieren und beschreiben Sie, was man unter Sensitivität und Spezifität im Zusammenhang mit Antigen-Schnelltests versteht.

Sensitivität: Je höher die Sensitivität, desto wahrscheinlicher werden tatsächlich infizierte Personen auch erkannt.

Spezifität: Je höher die Spezifität, desto wahrscheinlicher werden gesunde Personen nicht fälschlicherweise als krank erkannt.

ANTIGEN-SCHNELLTESTS – MUSTERLÖSUNG



Aufgabe 3

Vor dem Zutritt zu einem Konzert führt der Konzert-Veranstalter einen Antigen-Schnelltest bei allen Besucherinnen und Besuchern durch. Nur negativ getestete Personen dürfen das Konzert besuchen. Insgesamt erscheinen 10 000 Personen zum Konzert und werden getestet. 99 % der getesteten Personen erhalten ein negatives Testergebnis. Der Hersteller des Tests gibt an, dass nur zu 1 % falsch-positiv und zu 5 % falsch-negativ Testergebnisse angezeigt werden.

a) Die Sensitivität eines Antigen-Schnelltests beträgt circa 95 %. Was bedeutet das?

95 % aller positiven Testergebnisse sind auch wirklich positiv. 5 % der negativen Testergebnisse sind eigentlich positiv (falsch-negativ Ergebnis).

b) Berechnen Sie, wie viele Besucherinnen und Besucher im schlimmsten Fall falsch-negativ getestet wurden.

9 900 Personen wurden negativ getestet. 5 % können falsch-negativ sein. Im schlimmsten Fall sind 495 Personen falsch-negativ getestet worden.

c) Wie viele Besucherinnen und Besucher wurden auf Basis der Herstellerangaben vermutlich falsch-positiv getestet? Berechnen.

100 Personen positiv. 1 % Fehlerquote. Vermutlich 1 Person falsch-positiv getestet.

d) Die Spezifität eines Antigen-Schnelltests beträgt circa 99 %. Was bedeutet das?

Zu 99 % erhält man ein negatives Testergebnis, das auch tatsächlich negativ ist. Zu 1 % erhält man ein positives Testergebnis, das aber eigentlich negativ sein muss (falsch-positives Ergebnis).

e) Nenne Faktoren, die zu einem falsch-negativen Ergebnis führen können.

Falsche Anwendung, Testperson wird zu früh/spät getestet (zu wenig Antigene), Test defekt, ...