

Polymerasekettenreaktion (PCR)

(engl.: polymerase chain reaction)

1983 entwickelte Kary Mullis das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), die es erlaubt, definierte Abschnitte der DNA *in vitro* zu vervielfältigen.

Grundlage dieser Technik ist die DNA-Replikation innerhalb sich teilender Zellen. Für die PCR werden Teile der Replikationsmaschinerie kopiert bzw. simuliert.

Ziel der PCR ist aus wenig Ausgangsmaterial, identische DNA-Molekül zu synthetisieren, die dann für nachfolgende Untersuchungen in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen (Überschreitung der Nachweisgrenze).

Zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Zielsequenz wird ein Temperaturprofil durchlaufen, das drei grundlegende Temperaturabschnitte umfasst.

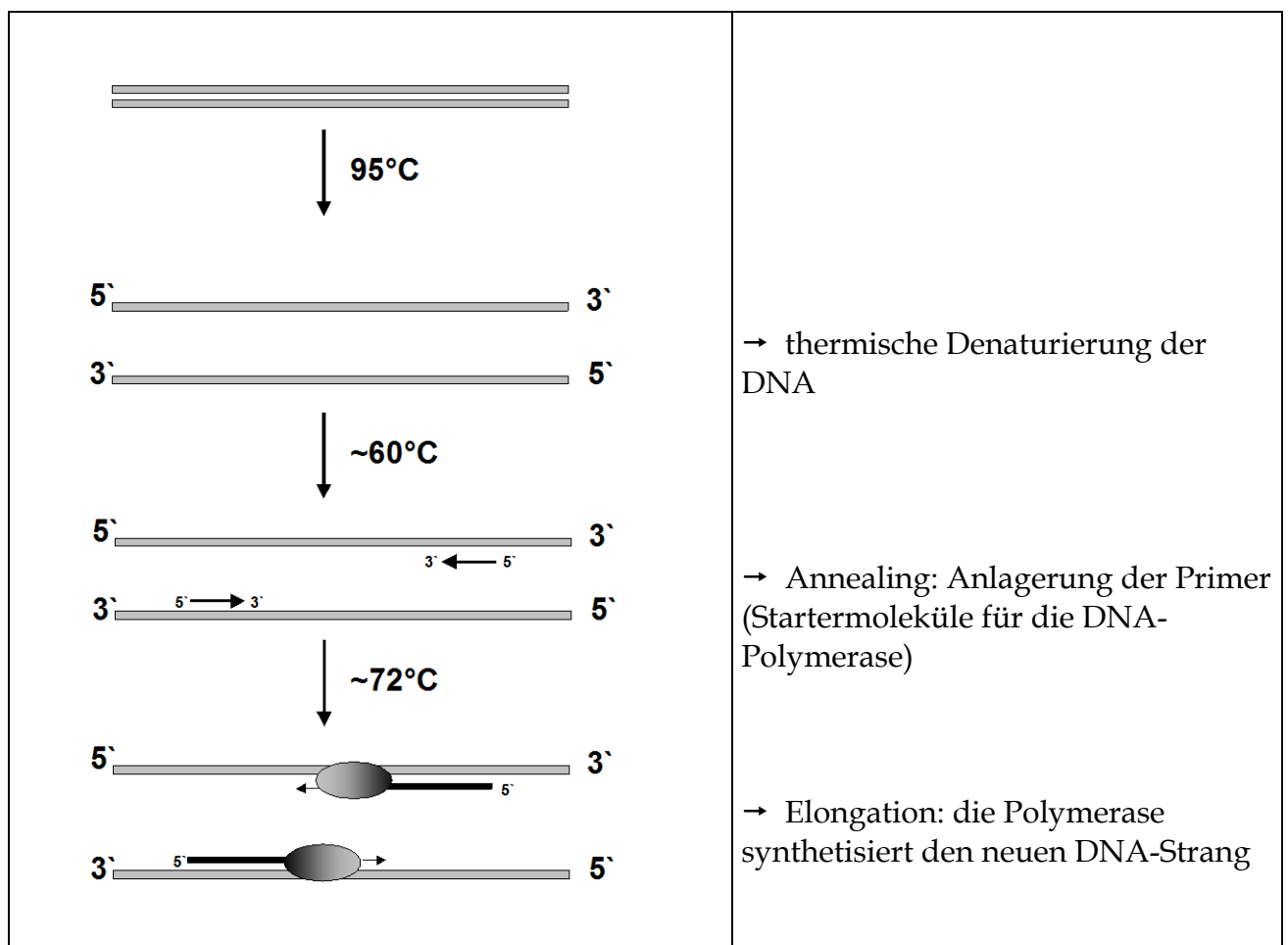
Zuerst wird die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge aufgespalten. In lebenden Zellen wird die Überführung des Doppelstranges in Einzelstränge durch die sogenannte „Helicase“ realisiert, die die DNA entwindet und die Stränge enzymatisch voneinander trennt. In der PCR bedient man sich eines 95°C Hitzeschrittes (thermische Denaturierung), was stark zur Vereinfachung der Reaktionsdurchführung beiträgt. Die DNA-Polymerase führt die Verdopplung der DNA durch, indem sie den DNA-Einzelstrang als Matrize abliest und einen komplementären Strang am Ursprungsstrang synthetisiert. Dadurch entstehen hybride Doppelstränge, die aus dem ursprünglichen Matrizenstrang und dem neu synthetisierten Strang bestehen. Die Polymerase kann den DNA-Strang ausschließlich in eine Richtung verlängern (5' → 3'), wodurch dieser Schritt gerichtet ist. Die optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase liegt bei den meisten kommerziell verfügbaren Polymerasen bei 72°C. Damit die DNA-Polymerase allerdings die Synthese starten kann, benötigt sie einen doppelsträngigen DNA-Abschnitt (Startstelle), an dem sie andocken kann, um die Synthese zu initiieren. Diese Startstellen werden vor der Synthese dadurch bereitgestellt, indem sog. Primer an die DNA-Einzelstränge angelagert werden. Durch Auswahl der Primersequenz (kurze einzelsträngige DNA-Moleküle) kann die Spezifität der Zielsequenz definiert werden, was extrem wichtig für den Nachweis von unterschiedlichsten Erregern ist!

Somit entsteht ein Temperaturprofil von 95°C → ca. 50-60°C → 72°C.

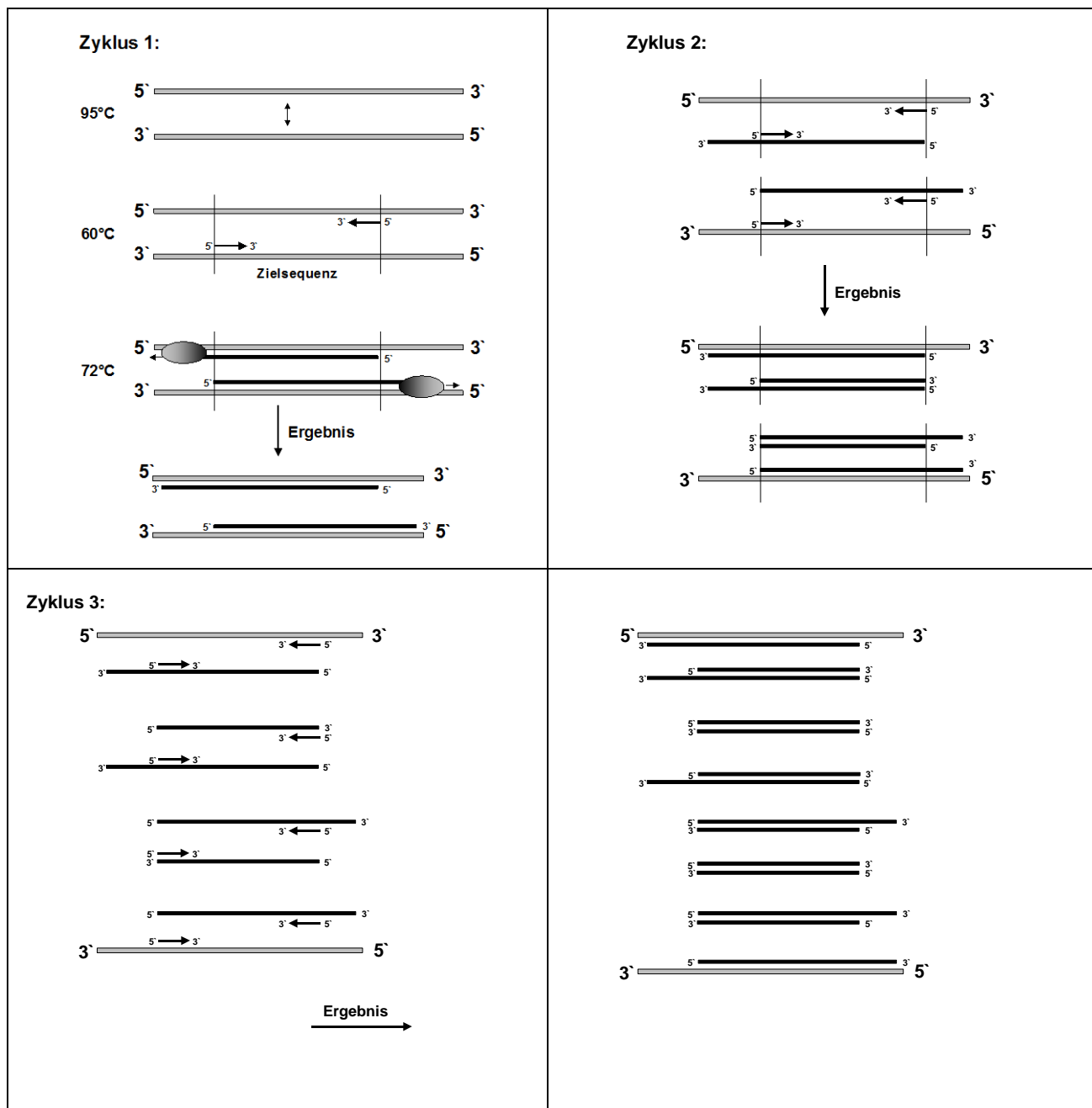
Zu Beginn dieser Methode waren thermostabile DNA-Polymerasen noch nicht kommerziell verfügbar. Diese Polymerasen entstammen Organismen, die sich an extrem heiße Umweltbedingungen, wie sie z.B. in heißen Quellen vorherrschen, angepasst haben. Ein

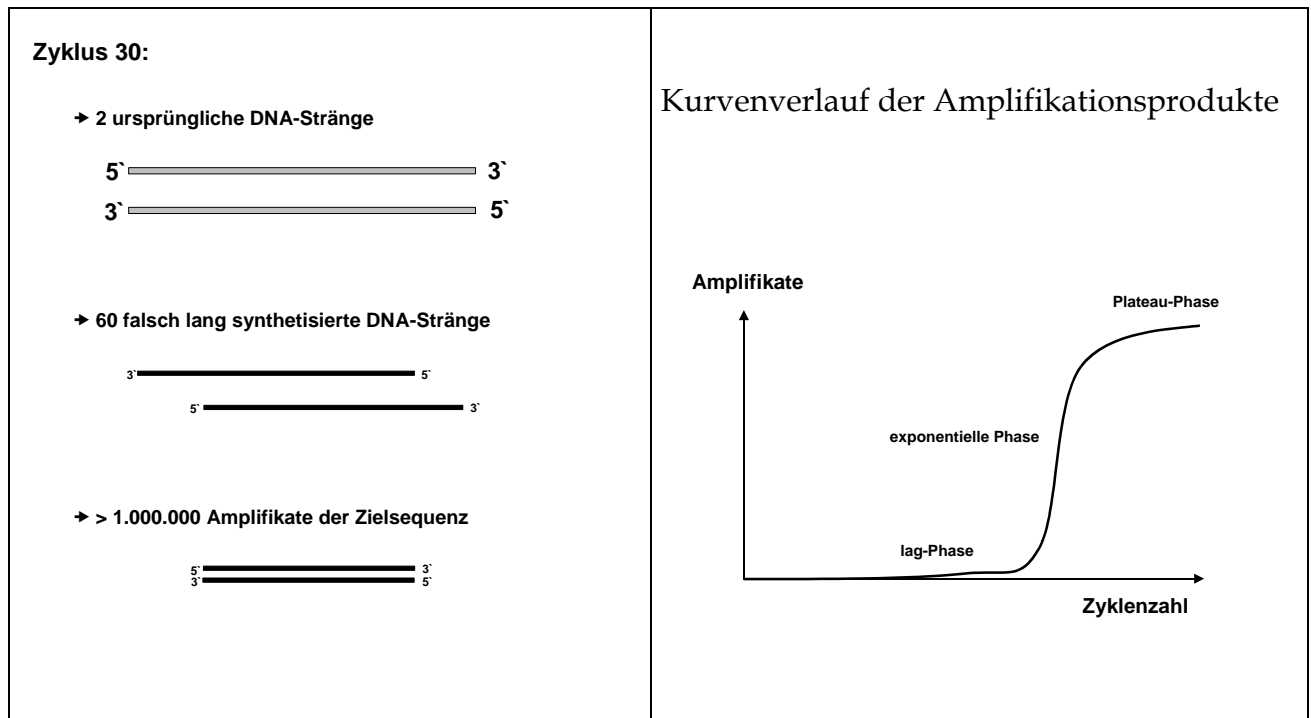
Organismus, den man sich hier besonders zunutze gemacht hat, ist das Bakterium Thermus aquaticus, aus dem die wohl am häufigsten verwendete **Taq**-Polymerase stammt. Andere bevorzugte Organismen sind sog. Archaea, die sich überwiegend an extreme Lebensweisen angepasst haben. Der Vorteil von diesen Enzymen ist, dass sie im Gegensatz zur beispielsweise humanen Polymerase bei 95°C nicht funktionell zerstört werden, so dass die zyklische Abfolge des oben genannten Temperaturprofils ohne stetige Zugabe von neuem Enzym nach dem Denaturierungsschritt (95°C) erfolgen kann. Ein weiterer Fortschritt in der PCR-Technik war die Entwicklung von Thermocyclern, die in relativ kurzer Zeit auf die gewünschten Temperaturen abkühlen bzw. aufheizen können (zuvor mussten die Reaktionsgefäße manuell von einem Thermoblock zum anderen überführt werden), so dass die Methode nun automatisierbar war.

Auf der folgenden Seite ist der schematische Ablauf der PCR dargestellt:



Durch zyklische Wiederholung des Temperaturprofils kann die Zielsequenz nur weniger DNA-Ausgangsmoleküle milliardenfach vervielfältigt werden.





Die PCR erzeugt neben gewünschten Amplifikaten der Zielsequenz auch längere Amplifikate, die über die Zielsequenz hinausgehen. Dies ist darin begründet, dass die Polymerase auf dem Ursprungsstrang keinen definierten Abbruch vollführt, sondern den Strang solange weiter verlängert bis sie willkürlich die DNA verlässt oder durch den folgenden Denaturierungsschritt abdiffundiert. Die gewünschten Amplifikate werden erst ab dem zweiten Zyklus erzeugt, da hier die im ersten Zyklus neusynthetisierten Stränge durch die Primer ein Matrizenende zeigen, wodurch die DNA-Polymerase ins Leere läuft. Im Gegensatz zu den falschen Amplifikaten, die nur linear vervielfältigt werden, verläuft die Steigerungsrate der gewünschten Amplifikate exponentiell. Nachdem eine limitierende Komponente (z.B. Primer oder eines der Nukleotide) im Mangel vorkommt, verläuft die Reaktion suboptimal und die Verlaufskurve flacht in eine Plateau - Phase ab.

Die PCR bietet die Grundlage für zahlreiche Anwendungen, die durch nachgeschaltete Verfahren noch ausgeweitet werden können:

- bakterieller und viraler Erregernachweis
- Bestimmung von Genmutationen
- Sequenzierung (Bestimmung der DNA-Basenabfolge) z.B. zur Typisierung
- quantitative Bestimmung von DNA-Molekülen im Ausgangsmaterial
- genetischer Fingerabdruck / Vaterschaftstest
- Diagnostik bestimmter Tumoren
- ...

Beispielhafte Zusammensetzung einer PCR (Endvolumen 20 µl):

2 µl Reaktionspuffer (10-fach konzentriert)
 2 mM MgCl₂
 1 µl Primer vorwärtsgerichtet (5 µM)
 1 µl Primer rückwärtsgerichtet (5 µM)
 1 µl dNTP-Mix (je 2 mM)
 < 500 ng DNA-Matrize
 0,5 Unit DNA-Polymerase
 H₂O

Beispielhaftes Temperaturprofil der PCR im Thermocycler:

Zyklenzahl	Dauer	Temperatur	Beschreibung
1	5 min	95°C	Initiale Denaturierung, da der anfängliche Doppelstrang sehr lang ist
30	30 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	50-65°C *	Anlagerung der Primer (Annealing)
	1 min	72°C	Neusynthese der DNA (Elongation)
1	5 min	72°C	Finale Elongation

* die Annealing-Temperatur hängt im Wesentlichen von der Primerlänge, der Zusammensetzung des Primers (GC-Gehalt) und des Salzgehaltes und andere Zusätze (z.B. DMSO, Formamid) in der Reaktion ab.