

Polymerase-Kettenreaktion

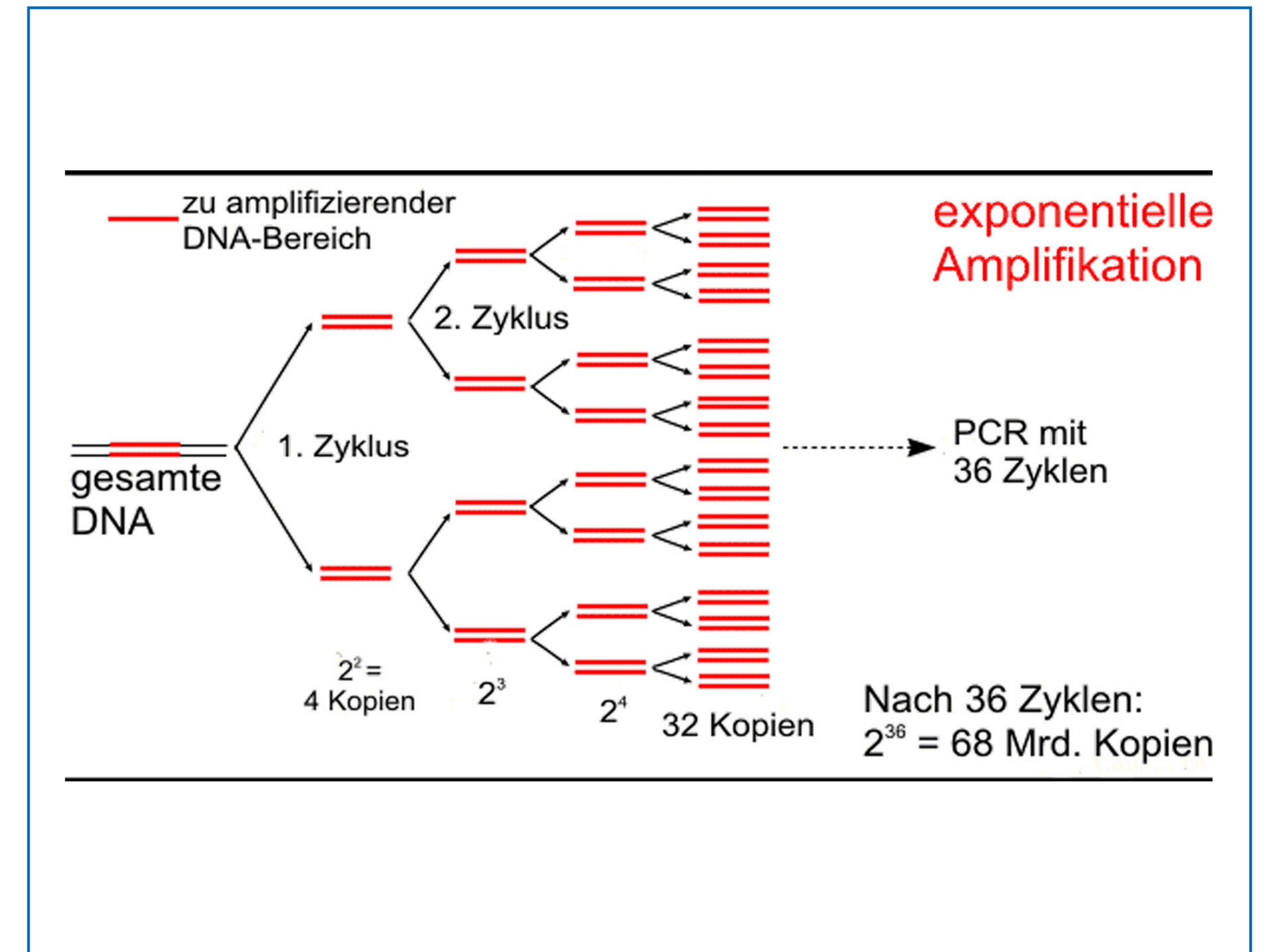
Dr. Christian Beuret
Dr. Olivier Engler
Dr. Marc Strasser

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)?

PCR (engl. polymerase chain reaction) ist eine Methode um einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Damit können kleinste, sonst unbestimmbare DNA-Mengen nachgewiesen werden. Als «Kopiermaschine» braucht es ein Enzym namens **Polymerase**, welches in einer Kettenreaktion aus sich wiederholenden Temperatur-Zyklen den gewünschten DNA-Abschnitt immer wieder verdoppelt und so eine messbare DNA-Menge generiert. Die PCR findet in einem **PCR-Mastermix** mit einem Volumen von 1–50 µl statt.

Vorteile: Schnelligkeit; in 45 min können kleinste DNA-Mengen vervielfältigt und nachgewiesen werden. Sensitivität; Die PCR erreicht dabei eine Nachweisgrenze von 10 DNA-Kopien.

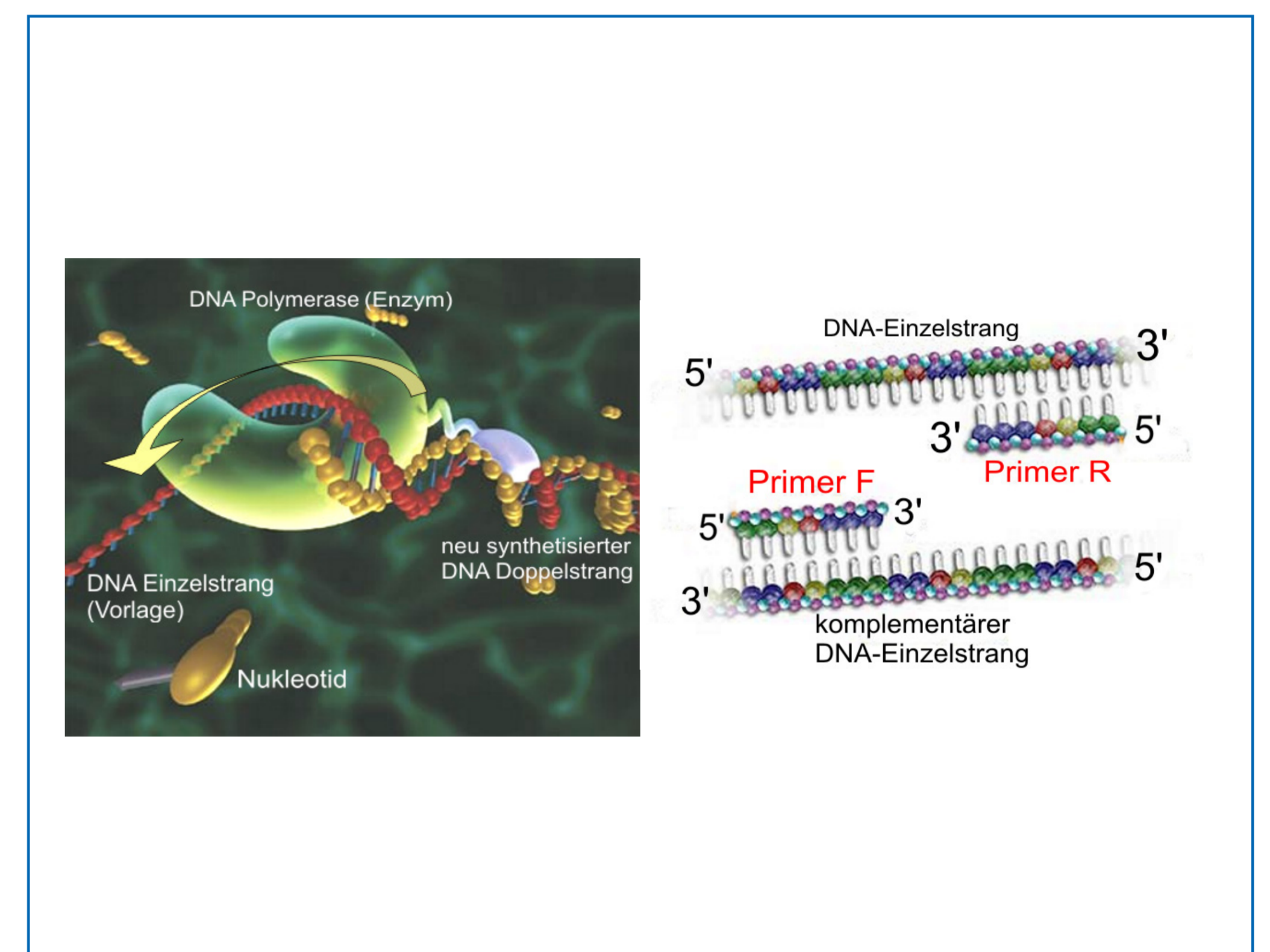
Nachteile: Es kann nicht nachgewiesen werden, ob der Mikroorganismus infektiös (virulent, «lebendig») ist oder nicht. Die Gen-Sequenz des Mikroorganismus muss bekannt sein.



DNA-Polymerase und Oligonukleotide

Die Vervielfältigung der DNA (**Amplifikation**) wird durch die **DNA-Polymerase** durchgeführt. Diese verknüpft einzelne **Nukleotide** zu einer **DNA-Kette**. Die DNA-Polymerase nutzt stets einen bereits bestehenden DNA-Einzelstrang als Vorlage für die Synthese eines **komplementären** Stranges. Dabei bindet das Enzym aber nur dort an den DNA-Einzelstrang, wo eine kurze Doppelstrangstruktur als Startpunkt vorliegt. Diese Eigenschaft nutzt man in der PCR mit der Zugabe von spezifischen Primern aus.

Ein **Primer (Oligonukleotid)** ist ein kurzes DNA-Stück bestehend aus 15-30 Nucleotiden. Für beide komplementären DNA-Einzelstränge wird je ein Primer (Forward & Reverse) bestimmt. Die Primer werden mit Hilfe von Softwares festgelegt (**DNA des Zielorganismus muss bekannt sein**) und über Internet bei spezialisierten Firmen bestellt.

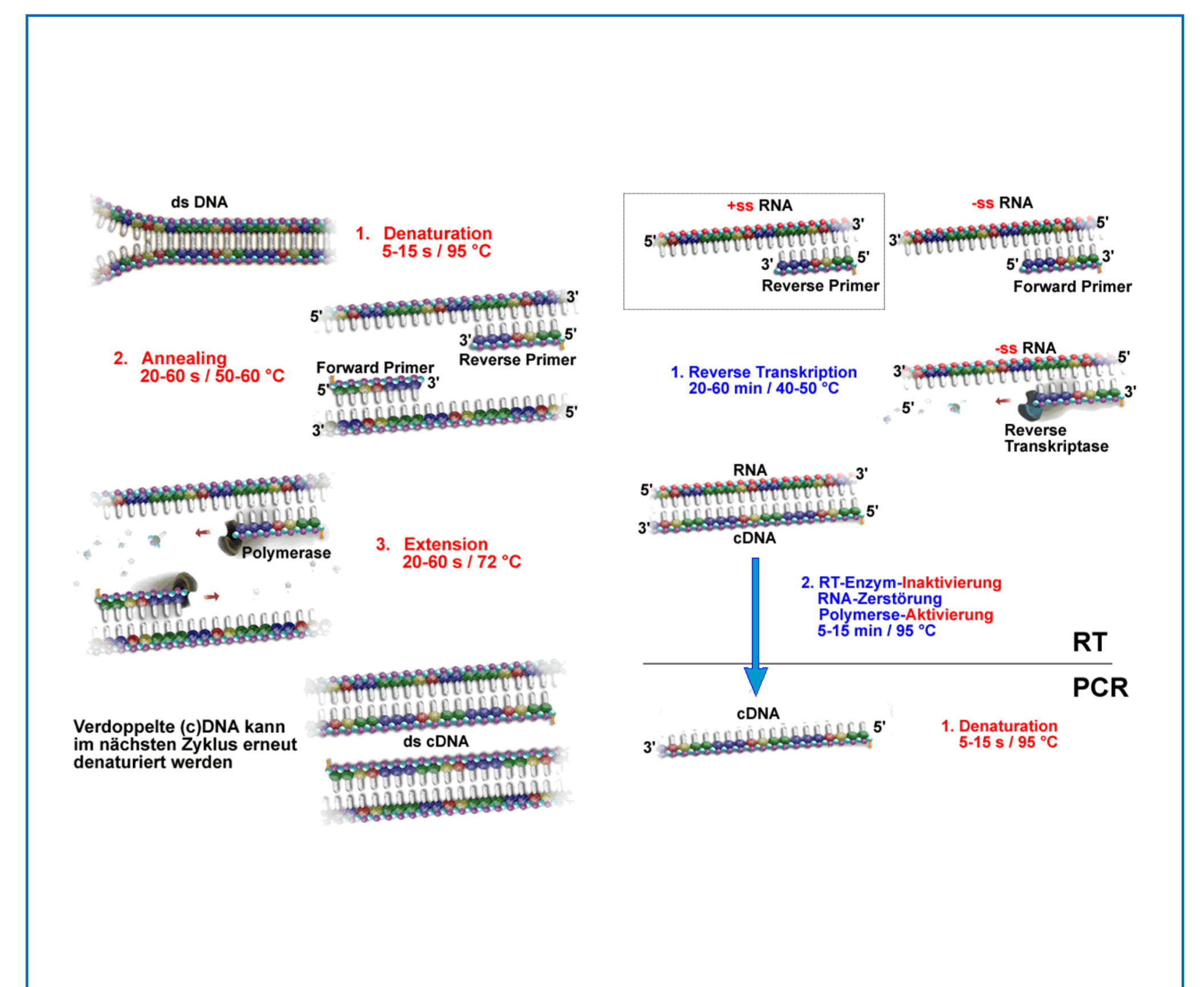


PCR & RT-PCR – Die Kettenreaktion

Die PCR besteht aus einer Serie (Kettenreaktion) von 30 bis 45 Temperatur-Zyklen und wird in einem so genannten Thermocycler durchgeführt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten (siehe Abbildung):

- **Denaturierung:** Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt um die Stränge zu trennen. Somit stehen der DNA-Polymerase zwei Vorlagen zur Verfügung.
- **Annealing** (Anlagerung): Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt (Primer-abhängig), damit sich die Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern können.
- **Extension** (Elongation): Schliesslich lagert sich DNA-Polymerase (bei 60–76°C) an die kurzen doppelsträngigen Bereiche und repliziert den komplementären Strang.

Da die Genome vieler Virenarten aus RNA bestehen, muss diese für die PCR zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird **Reverse Transkription (RT)** genannt und kann im selben Ansatz der PCR vorgeschaltet werden.



Quantitative real-time PCR

Bei der quantitativen real-time PCR wird zusätzlich nach jedem PCR-Zyklus die neu amplifizierte DNA durch eine Fluoreszenz-Messung **quantifiziert**. Die Zunahme der kopierten DNA korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz.

Eine Möglichkeit ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen (z.B. **SYBR Green**). Diese binden nach jedem PCR-Zyklus spezifisch an doppelsträngige DNA, wobei ihre Fluoreszenz nach Anregung messbar ansteigt. Nachteil: Auch unspezifische DNA-Produkte werden «gefärbt».

Eine spezifischere Methode beruht auf die Zugabe eines dritten Primers (**TaqMan-Sonde**). Dieser ist mit einem **Reporter**-Fluoreszenzfarbstoff und mit einem Fluoreszenz-absorbierenden **Quencher** markiert. In jedem PCR-Zyklus wird die Sonde durch die Polymerase (**5'-3'-Exonuklease-Aktivität**) abgebaut, Die Fluoreszenz des abgetrennten Reporters kann nach jedem PCR-Zyklus quantitativ gemessen werden.

