

Die Polymerase-Kettenreaktion – eine Labortechnik der DNA-Replikation

Die Mechanismen, die der DNA-Replikation in den Zellen zugrunde liegen, dienten dazu, eine wichtige Labormethode zu entwickeln, die für die Analyse von Genen und Genomen unentbehrlich geworden ist. Dieses Verfahren ermöglicht es, von **kurzen** DNA-Sequenzen zahlreiche Kopien herzustellen.

Warum ist es für gentechnische Anwendungen notwendig, von einer DNA-Sequenz zahlreiche Kopien zu erzeugen? Das liegt daran, dass die DNA-Menge, die sich aus einer biologischen Probe isolieren lässt, häufig zu gering ist, um damit arbeiten zu können.

Im April 1985 hatte Kary B. MULLIS auf einer Fahrt in sein Wochenendhaus in Kalifornien eine bahnbrechende Idee zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten *in vitro*¹. Voraussetzung für seine Entwicklung war die Entdeckung thermostabiler DNA-Polymerase, die zum Beispiel aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* (als sog. Taq-Polymerase) isoliert werden kann. Nach Umsetzung seiner Überlegungen in die Laborpraxis entstand die heute weltweit erfolgreich angewandte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction* = PCR), für die MULLIS 1993 den Nobelpreis erhielt.

Das Ausgangsmaterial für die PCR ist eine in Lösung befindliche kurze doppelsträngige DNA, welche die zu vermehrende DNA-Sequenz enthält. Diese Sequenz kann entweder ein Gen oder einen nichtcodierenden Bereich enthalten. Unter Hitzeeinwirkung (ca. 94 °C) wird die doppelsträngige DNA in die beiden Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Den Reaktionsansatz kühlt man anschließend auf ca. 55 °C ab, damit sich die Primer über Wasserstoffbrückenbindungen an ihre Zielsequenzen an den Enden der zu vervielfältigenden DNA binden können, und zwar jeder Primer an einen Strang. Durch die Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge sind zwei kurze doppelsträngige DNA-Regionen entstanden, die als Substrat für die hitzebeständige Taq-Polymerase dienen. Durch Temperierung auf ca. 72 °C erreicht die Taq-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum und verlängert die Primer durch Anhängen von Nucleotiden (dNTPs), wobei sie den Matrizenstrang als Vorlage benutzt. Auf diese Weise werden beide Matrizenstränge *in vitro* repliziert. Ein Abbruch dieser ersten



Befüllen eines PCR-Reaktionsgefäßes. Der Reaktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

- doppelsträngige DNA (Matrize, Template-DNA)
- thermostabile (Taq-) DNA-Polymerase
- 2 Arten von Primern (chemisch synthetisierte DNA-Einzelstränge aus wenigen (z.B. 25) Nucleotiden)
- 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate (dNTPs): dATP, dTTP, dGTP, dCTP

¹ *in vitro* [lat. „im Glas“] im Reagenzglas bzw. im künstlichen System durchgeführt, Gegenbegriff zu *in vivo* [lat. „im Leben“] am lebenden Objekt beobachtet oder durchgeführt

Replikationsrunde erfolgt durch ein kurzfristiges Erhitzen auf ca. 92 °C, wobei die entstandenen DNA-Doppelstränge sich erneut in Einzelstränge trennen. Damit hat ein erneuter Replikationszyklus begonnen, bestehend aus Strangtrennung (Denaturierung), Primer-Bindung (Hybridisierung/Annealing) und DNA-Synthese (Polymerisieren/Elongation). Die drei Reaktionsschritte werden so lange wiederholt, bis der gewünschte DNA-Bereich in ausreichender Menge vorliegt (25 bis 40 Zyklen). Die Reaktionen finden in einem einzigen Reaktionsgefäß (siehe Abb. 1) statt, das während der Gesamtdauer des Versuchs in einem programmierten Thermoblock steht.

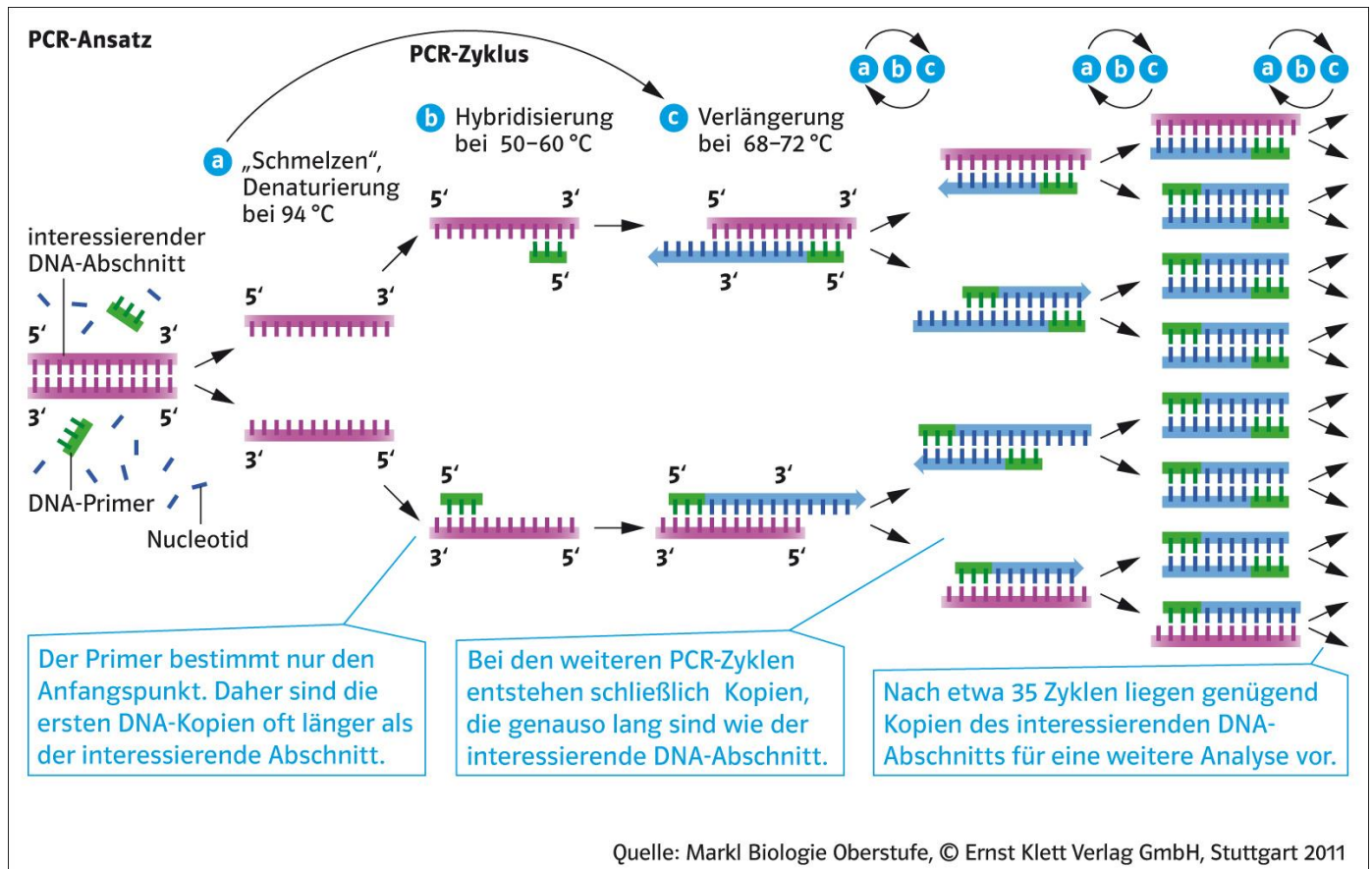


Abbildung 2: Ablauf der PCR

Aufgaben:

1. Lesen Sie den Text und stellen Sie die bei den unterschiedlichen Temperaturen ablaufenden Vorgänge in Form einer Tabelle dar.
2. Erläutern Sie mit Hilfe der Textinformationen das in Abb. 2 dargestellte Ablaufschema der PCR (siehe Abb.2).
3. Vergleichen Sie das PCR-Verfahren mit dem natürlichen Prozess der DNA-Replikation (Vergleich = Herausstellen von Gemeinsamkeiten und Unterschieden).