

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis Mitte der achtziger Jahre entwickelte PCR-Methode (PCR steht für *polymerase chain reaction*) dient zum Nachweis und zur Vervielfältigung (Amplifizierung) geringster DNA-Mengen. Dabei können einzelne DNA-Abschnitte oder Gene hochspezifisch vermehrt werden.

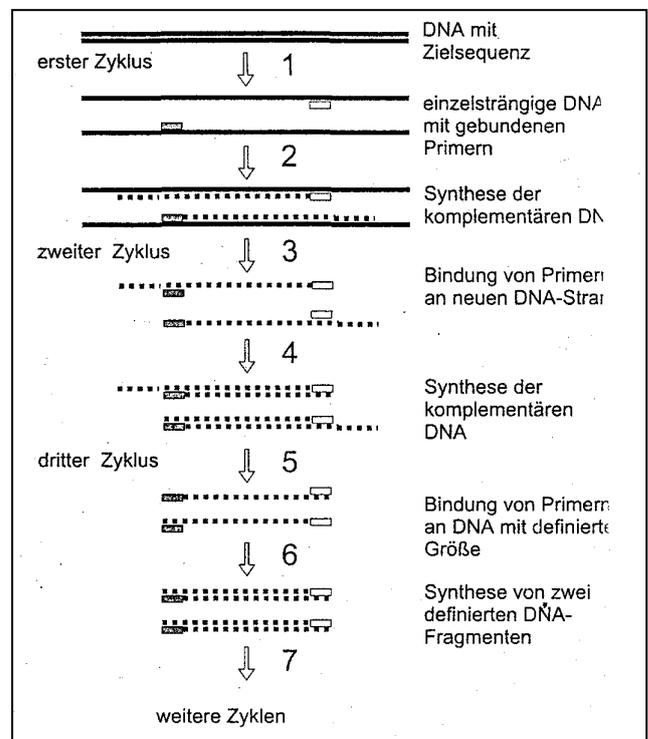
Die Anwendungen dieser neuen, nobelpreisgekrönten Technik reichen von der Grundlagenforschung bis in die forensische Medizin. Bei Pflanzen dient die Methode insbesondere zur Amplifizierung von Genen zur späteren Klonierung sowie zum Nachweis von transgenen Pflanzen bzw. transgenen Nahrungsbestandteilen. Zudem vereinfacht die PCR-Technik die Herstellung „genetischer Fingerabdrücke“ zur Identifizierung von Straftätern oder zum Nachweis der Vaterschaft erheblich. (siehe Folie 14 und Folie 15)

Die Abbildung zeigt die wesentlichen Schritte des PCR-Verfahrens. Für die Durchführung benötigt man bei geeigneten Pufferbedingungen:

1. Eine Probe, die geringe Mengen der zu vermehrenden **DNA** enthält.
2. Zwei kurze einzelsträngige DNA-Stücke (20 - 25 Nucleotide), die als **Primer** bezeichnet werden. Diese haben eine definierte Basensequenz, die komplementär zu benachbarten DNA-Bereichen beiderseits des nachzuweisenden bzw. zu vermehrenden DNA-Abschnitts passen.
Voraussetzung für diese Methode ist also die genaue Kenntnis der Basensequenz, an die der Primer binden soll!
3. Die vier **DNA-Nucleotide** (Desoxyribonukleotidtriphosphate der Basen Adenin (dATP), Cytosin (dCTP), Guanin (dGTP) und Thymin (dTTP)).
4. Ein **Enzym** zur Replikation des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts (DNA-Polymerase).
Man verwendet hitzestabile Enzyme, die auch bei Temperaturen über 90°C nicht denaturiert werden, z.B. die **Taq-Polymerase** aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, das in sehr heißen Quellen (über 70°C) lebt.

Probengefäße, die mit den vier beschriebenen Bestandteilen beschickt wurden, werden in einen mikroprozessorgesteuerten Thermocycler gestellt. Im Thermocycler wechselt die Temperatur für eine voreingestellte Zeit und ermöglicht so einen automatischen Ablauf der PCR:

1. Die Proben-DNA wird durch Erhitzen auf 95°C in ihre Einzelstränge gespalten. (Denaturierung)
2. Die beiden Primer binden nach Abkühlung des Ansatzes auf 55-60°C an die Endsequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.
3. Bei 72°C kann die DNA-Polymerase die DNA-Neusynthese durchführen. Ausgehend von den Primern werden unter Abspaltung von Pyrophosphat die Nucleotidbausteine zu DNA-Molekülen verknüpft. Somit wird ein komplementärer DNA-Strang gebildet. Damit ist ein Replikationszyklus abgelaufen.
4. Nun werden die Schritte 1 – 3, nach Vorgabe des Thermocyclerprogramms, mehrmals wiederholt. Die Vermehrung der DNA erfolgt bei der PCR exponentiell, bis die Primer oder DNA-Nucleotide sich erschöpfen. Aus einem DNA-Molekül werden dabei z.B. nach 32 Zyklen ca. $1,074 \times 10^9$ Moleküle!



Wie die Abbildung zeigt, werden dabei zunächst DNA-Moleküle synthetisiert, die über den Bereich der Primer hinausgehen. Erst ab dem dritten Reaktionszyklus entsteht der gewünschte definierte DNA-Abschnitt, der sich zwischen den beiden Primern befindet. Dieser wird in den Folgezyklen in großer Menge amplifiziert.