



Schülerversuch „PCR“

Theorie

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode, um die Erbsubstanz DNA *in vitro* zu vervielfältigen, d.h. ohne einen lebenden Organismus wie z.B. das Bakterium *Escherichia coli* oder die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zu benutzen. Die PCR wird in biologischen und medizinischen Laboratorien für eine Vielzahl verschiedener Aufgaben verwendet, z.B. für die Erkennung von Erbkrankheiten und Virusinfektionen, für das Erstellen und Überprüfen genetischer Fingerabdrücke, für das Klonieren von Genen und für Abstammungsgutachten. Die PCR zählt zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie und viele wissenschaftliche Fortschritte auf diesem Gebiet (z.B. im Rahmen des Humangenomprojekts) wären ohne diese Methode nicht denkbar gewesen.

Die PCR wird eingesetzt um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Dabei kann es sich um ein Gen oder auch nur um einen Teil eines Gens handeln oder auch um nicht kodierende DNA-Sequenzen. Im Gegensatz zu lebenden Organismen kann der PCR-Prozess nur relativ kurze DNA-Abschnitte kopieren. Bei einer Standard-PCR können dies bis zu etwa 3.000 Basenpaare (3 kbp) lange DNA-Fragmente sein. Mit Hilfe bestimmter Polymerasen-Gemische, weiterer Additive in der PCR-Reaktion und optimalen Bedingungen können sogar Fragmente mit einer Länge von über 20–40 kbp vervielfältigt werden, was immer noch sehr viel kürzer ist als die chromosomale DNA einer eukaryotischen Zelle. Das menschliche Genom enthält beispielsweise etwa drei Milliarden Basenpaare.

In ihren momentanen Anwendungsgebieten benötigt die PCR mehrere grundlegende Komponenten:

- Die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält
- Zwei Primer, um auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt wird.
- DNA-Polymerase, die bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird, um den festgelegten Abschnitt zu replizieren (kopieren) (z. B. Taq-Polymerase)
- Desoxynukleosidtriphosphate, die Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang

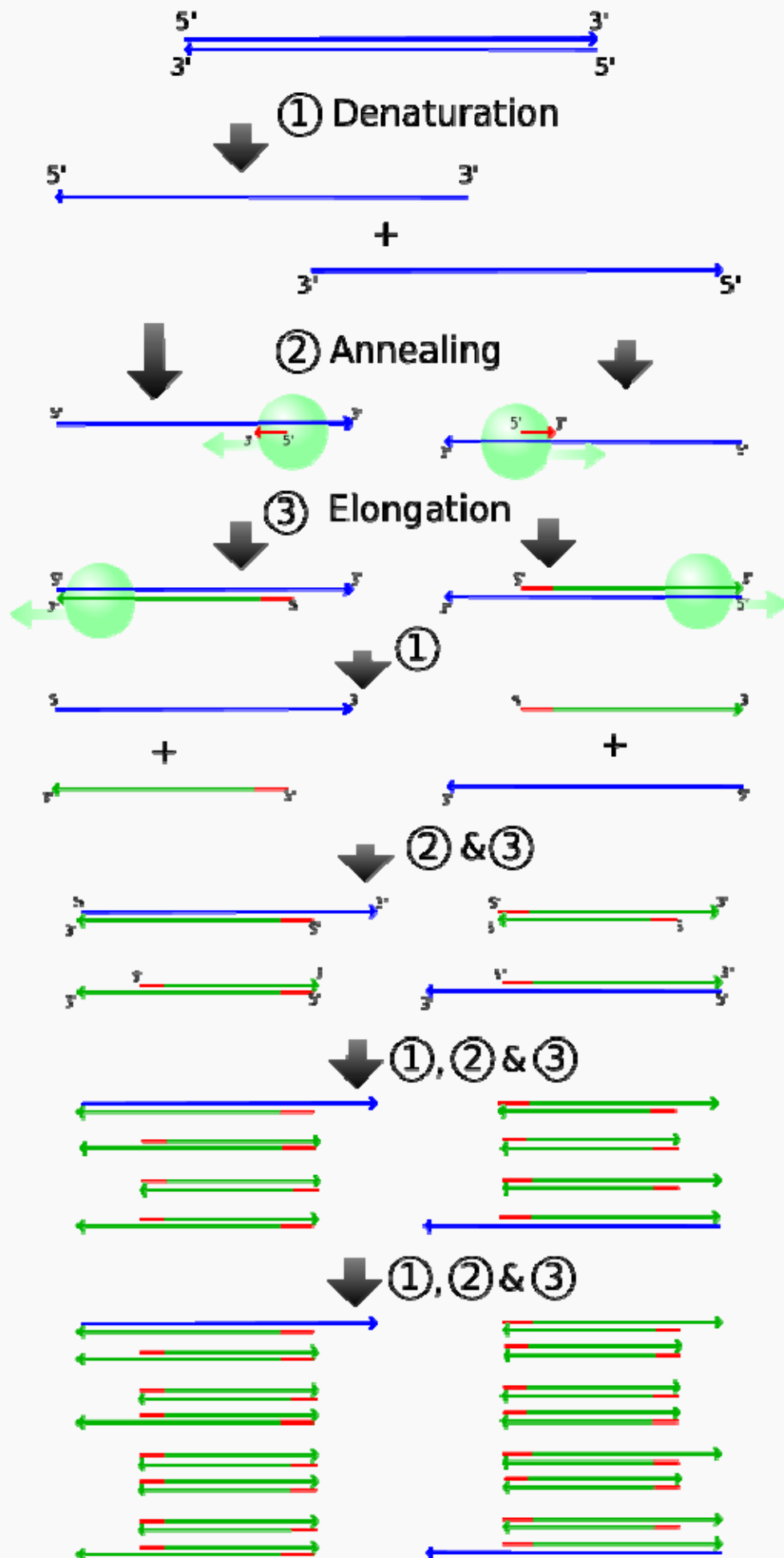
- Mg^{2+} -Ionen, für die Funktion der Polymerase essentiell
- Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen

Die Polymerase-Kettenreaktion findet in einem so genannten Thermocycler statt. Diese Maschine erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird. Um Verdunstung zu verhindern, wird ein dicht schließendes Reaktionsgefäß oder eine Ölschicht auf dem Reaktionsgemisch verwendet. Etwaige Kondensatbildung im Deckel des Gefäßes wird durch einen beheizbaren Gerätedeckel (über 100 °C) verhindert. Die Verwendung einer Pyrophosphatase kann unter Umständen die Effektivität der PCR steigern. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse des von den Nukleotidtriphosphaten abgespaltenen Pyrophosphat zu Orthophosphat. Pyrophosphat kann als Inhibitor bei der PCR wirken.

Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 25 bis 50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten (siehe Abbildung unterhalb):

1. Denaturierung (o. a. Melting, Schmelzen): Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94–96 °C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.
2. Primerhybridisierung (primer annealing): Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2–3 °C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 °C und 65 °C. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann das dazu führen, dass die Primer sich nicht (Temperatur zu hoch) oder an falschen Stellen (Temperatur zu niedrig) an der Ausgangs-DNA anlagern.
3. Elongation (Polymerisation, Verlängerung): Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Die Temperatur hängt nun von der verwendeten DNA-Polymerase ab (zwischen 68 °C und 72 °C); die Zeit, die dieser Schritt benötigt, hängt ebenfalls von der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll ab.

(Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>)



Versuchsdurchführung

Die Teilnehmer setzen eine PCR an, bei der das Sec62-Gen, das zuvor in ein Plasmid kloniert wurde, amplifiziert werden soll. Sec62 steht im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom, eine häufige Erkrankung des Menschen. Am Uniklinikum in Homburg werden u.a. Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten dieser Krankheit erforscht. Der Erfolg der PCR wird gelelektrophoretisch überprüft.

Pipettierschema:

template-DNA: pAcGFP-N1-Sec62 Midi

PCR-Mix:

pAcGFP-N1-Sec62	0,5 µl
PCR-Puffer +MgCl ₂	10,0 µl
dNTPs	2,0 µl (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
Q-H ₂ O	85,0 µl
Pfu-Polymerase	0,5 µl
Primer RZ170	1,0 µl (RZ170 Sec62 SacI +Strang ATG)
Primer RZ172	1,0 µl (RZ172 Sec62 KpnI -Strang stop)
Summe	100,0 µl

PCR-Programm:

94°C	2:00 min
94°C	0:30 min x 30
55°C	0:30 min x 30
72°C	2:00 min x 30
72°C	2:00 min
4°C	∞

Kompetenzzentrum Molekulare Medizin



Dr. Gabriele Amoroso
Fachrichtung 2.3 - Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes
Universitätskliniken Geb. 44
D-66424 Homburg/Saar
Phone: +49(0)6841-16-26541
Fax: +49(0)6841-16-26288
Email: amoroso@mx.uni-saarland.de
<http://www.uni-saarland.de/komm>