

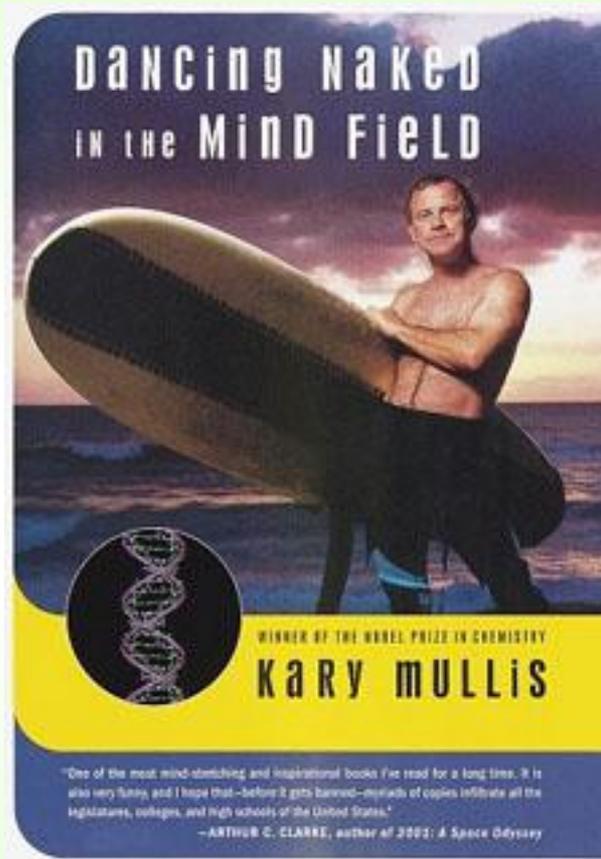
PCR

Was ist das?
(Theorie der PCR)

Was soll das?
(Anwendungsbereiche der PCR)



Kary Mullis



- erfand (optimierte) 1983 das PCR-Verfahren
- erhielt 1993 dafür den Nobelpreis
- Das Patent ist mittlerweile erfolgreich angefochten worden.



PCR =
Polymerase Chain Reaction

Ziel der PCR:

**Spezifische Amplifikation einer
Zielsequenz in großer Menge.**



Voraussetzungen für eine PCR

1. DNA (Template)
2. Oligonukleotide (Primer)
3. Taq-Polymerase
4. Thermocycler
5. Puffer und Nukleotide
6. Programm



1. Template

- Genomische DNA, cDNA sowie rekombinante DNA (Plasmide, Viren, DNA-Konglomerate) können als Templates eingesetzt werden.
- Meist reichen 100 pg Template-DNA aus (viel ist schlecht!!).
- Auch die DNA aus einer einzigen Zelle kann für eine PCR eingesetzt werden (Single-Cell-PCR).
- Häufig braucht die DNA nicht aufgereinigt zu werden. Dabei kann die PCR direkt mit dem Gewebematerial erfolgen.
- Andererseits können Spuren von Inhibitoren (u. a. Tannine, Huminsäuren) die Reaktion komplett inhibieren.



2. Primer

- im Schnitt 17-35 nt lang (6er), zueinander ausgerichtet
- möglichst hohe Übereinstimmung (nicht Homologie) zur Zielsequenz
 - durch Veränderungen der Primer können Mutationen („site directed mutagenesis“) oder Extensionen der Zielsequenz erreicht werden
 - zu geringe Ähnlichkeit führt zu Nicht- oder Falsch-amplifikation
- sollten nicht miteinander paaren können
- beide Primer sollten gleiche Schmelztemperatur (T_m) aufweisen
- GC-Gehalt entscheidend für T_m



T_m = Temperature of melting (Schmelztemperatur)

Die T_m eines Primers ist die Temperatur, bei der 50 % der Oligonukleotide einzelsträngig vorliegen.

Faustregel für die Berechnung der T_m eines Primers:

$$T_m = nA/T + mG/C$$

$$A/T = 2^\circ\text{C} \quad G/C = 4^\circ\text{C}$$



3. Taq-Polymerase

- *Taq* = *Thermus aquaticus*
- hitzestabile 5´-3´ DNA-Polymerase, macht 3´A-Überhang
- Stabilität des Enzyms: >100°C (40 min HWZ bei 94°C)
- Temperaturoptimum: 72-74 °C
- Synthesegeschwindigkeit: 1000 bp/min
- Synthesegenauigkeit: 1 Fehler bei 10⁴ bp
 - höher bei Polymerasen mit sog. „proof-reading“, z.B. *Pfu*
 - proof-reading = 3´-5´Exonuklease, langsamer
 - Gemisch aus beiden – z.B. Elongase



Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

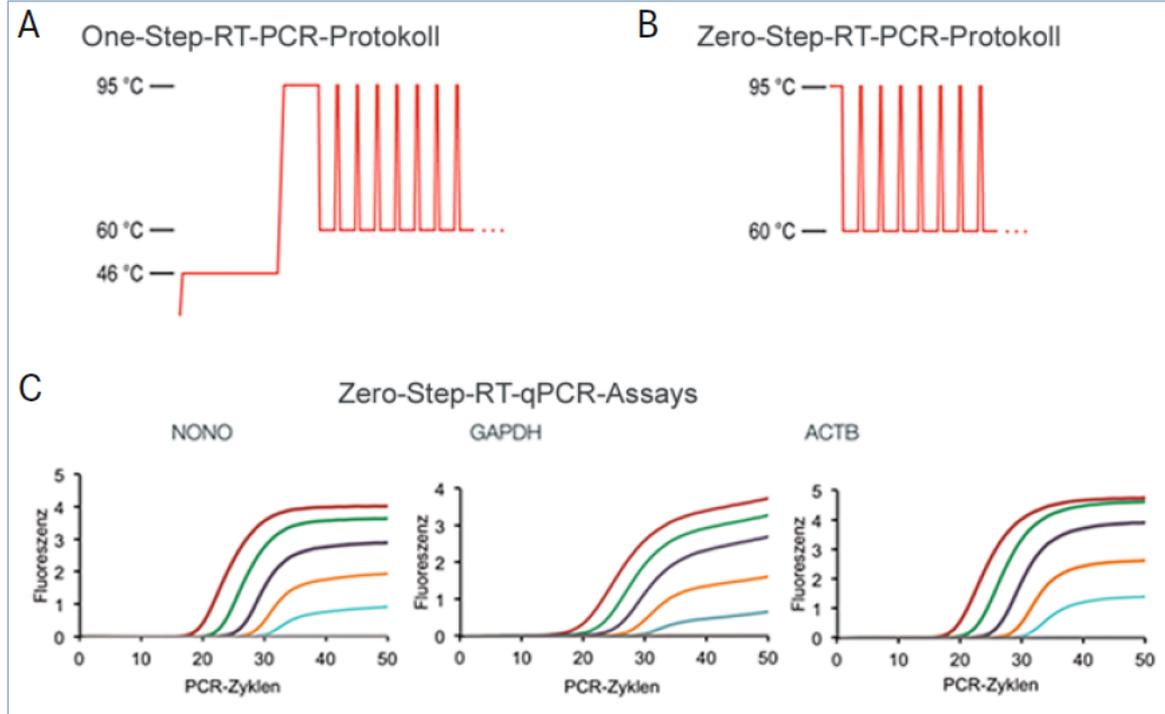
Neues Enzym mit Reverse Transkriptase- und DNA-Polymerase-Funktion

RAMON KRANASTER¹, JESSICA ZELLER¹, BIRGIT KÖHN², ANDREAS MARX^{1,2}

¹myPOLS BIOTEC GMBH, KONSTANZ,

²LEHRSTUHL FÜR ORGANISCHE CHEMIE/ZELLULÄRE CHEMIE, FACHBEREICH CHEMIE, UNIVERSITÄT KONSTANZ

Reverse transcriptions under high temperatures can be performed with a new designed, thermostable DNA polymerase. This DNA polymerase was generated from Taq DNA polymerase by directed evolution in multiple rounds of mutagenesis and screening. The new DNA polymerase combines an artificially induced reverse transcriptase activity with the natural thermostability of Taq DNA polymerase. Potential applications are depicted here.



▲ **Abb. 2:** Reverse Transkriptions-PCR mit Volcano2G DNA-Polymerase. **A**, Standard One-Step-RT-PCR-Protokoll mit isothermaler reverser Transkription, anschließender Hitzedenaturierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung einer DNA-Polymerase. **B**, „Zero-Step“-RT-PCR-Protokoll ohne vorgeschaltete isothermale reverse Transkription. Die reverse Transkription mit der Volcano2G DNA-Polymerase findet stattdessen simultan zur DNA-Amplifikation während der PCR-Zyklen statt. **C**, Drei Beispiele für Zero-Step-RT-PCR mit Volcano2G DNA-Polymerase mit drei ausgewählten Targets (NONO-, ACTB- und GAPDH-mRNAs). Verdünnungsserien mit RNA-Extrakten aus HEK293-Zellen, 100 ng/Reaktion (rot), 10 ng/Reaktion (grün), 1 ng/Reaktion (lila), 0,1 ng/Reaktion (orange), 0,01 ng/Reaktion (hellblau) und Negativkontrolle ohne Templat (grau). Das eingesetzte Zero-Step-RT-PCR-Protokoll (50 Zyklen mit jeweils 95 °C für 10 s, 60 °C für 60 s.) wurde im Vorfeld nicht optimiert.

4. Thermocycler



← beheizbarer Deckel

← Thermoblock (96-well)

← Bedienfeld mit Display



5. PCR-Programm

Bestandteile eines PCR-Programms

- Annealingtemperatur (abhängig von T_m der Primer)
- Dauer der Elongation (abhängig von Fragmentgröße)
- Anzahl der Zyklen (Extrazeit bei den letzten 10 Zyklen)
- Dauer der Endelongation
- Ramping



6. Puffer und Nukleotide

- Tris-HCl
 - puffert den pH
- $MgCl_2$
 - Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor der Taq-Polymerase und dNTPs, Menge bestimmt Spezifität der Reaktion
- KCl
 - optimiert den Salzgehalt für die Taq-Polymerase
- dNTPs
 - Substrat der Taq-Polymerase
- u.v.m.



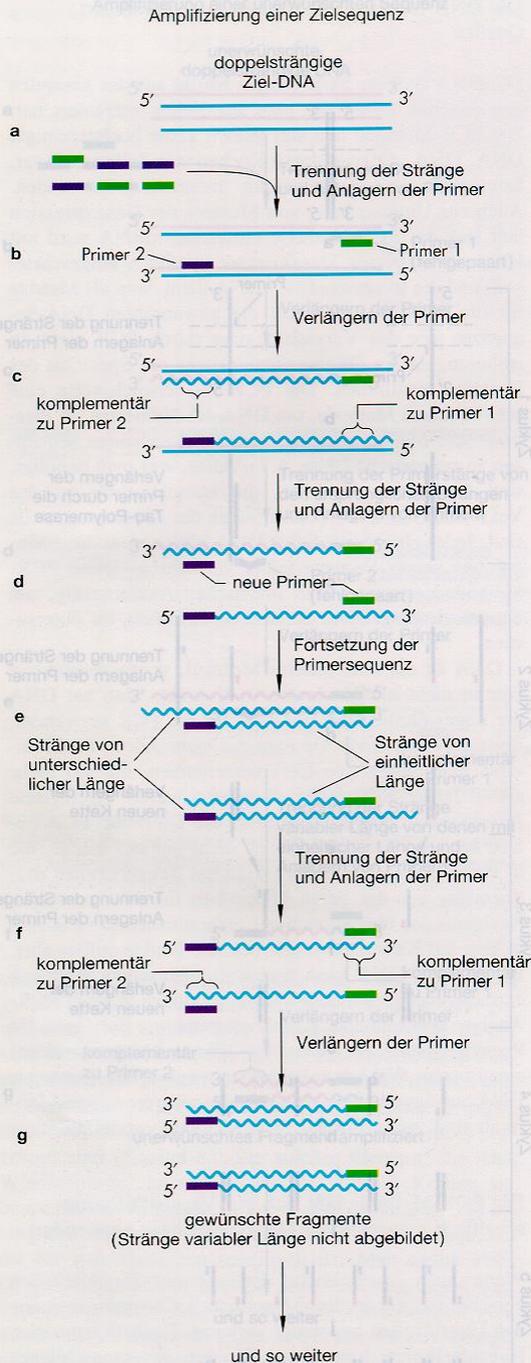
Beispiel für die Zusammensetzung eines PCR-Gemisches

1	μl	Template-DNA
5	μl	10 x Puffer
5	μl	dNTPs (2,5 mM)
1	μl	Primer A (10 μM)
1	μl	Primer B (10 μM)
1-5	U	Taq-Polymerase

- ad 50 μl mit (PCR)Wasser, mitführen von Kontrollen!



7. PCR-Ablauf



Anzahl der Zyklen	Anzahl doppelsträngiger Zielmoleküle
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16384
17	32768
18	65536
19	131072
20	262144
21	524288
22	1048576
23	2097152
24	4194304
25	8388608
26	16777216
27	33554432
28	67108864
29	134217728
30	268435456
31	536870912
32	1073741824



PCR

Was soll das?

**(Anwendungsbereiche und -beispiele der
PCR)**

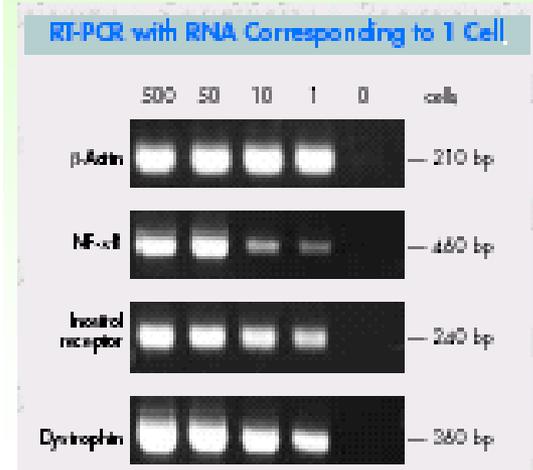
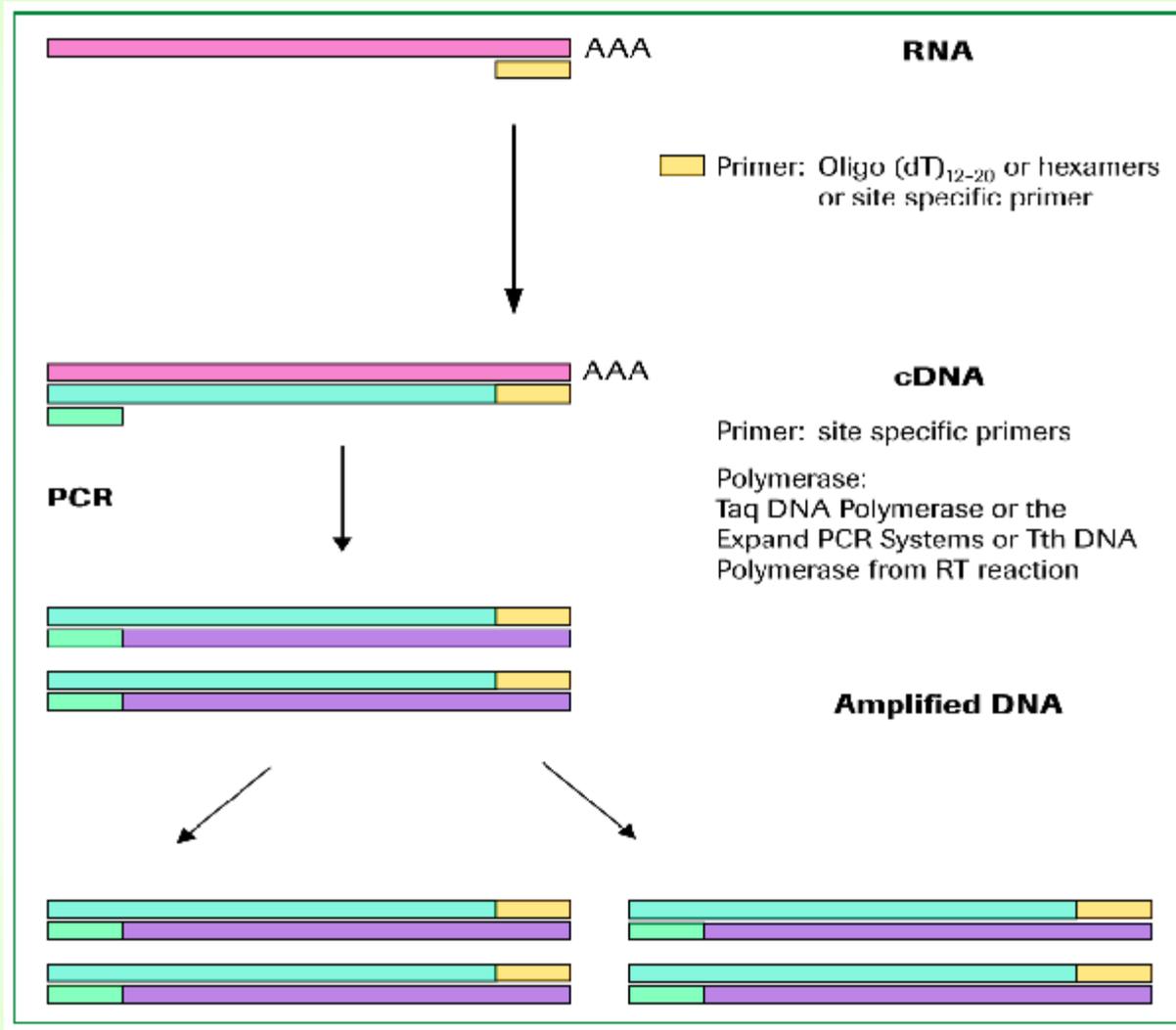


Anwendungsbereiche der PCR

1. Herstellung spezifischer Gensequenzen
2. Vaterschaftsanalysen, forensische Diagnostik
3. Saatgut- und Lebensmittelkontrolle
4. Viren- und Bakteriendiagnostik
5. Diagnostik von Erbkrankheiten
6. Populationsgenetik
7. Molekulare Evolution
8. Funktionelle Genomanalyse

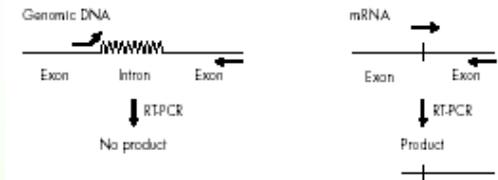


1. RT-PCR = Reverse transcribed PCR



DNA-Kontamination?

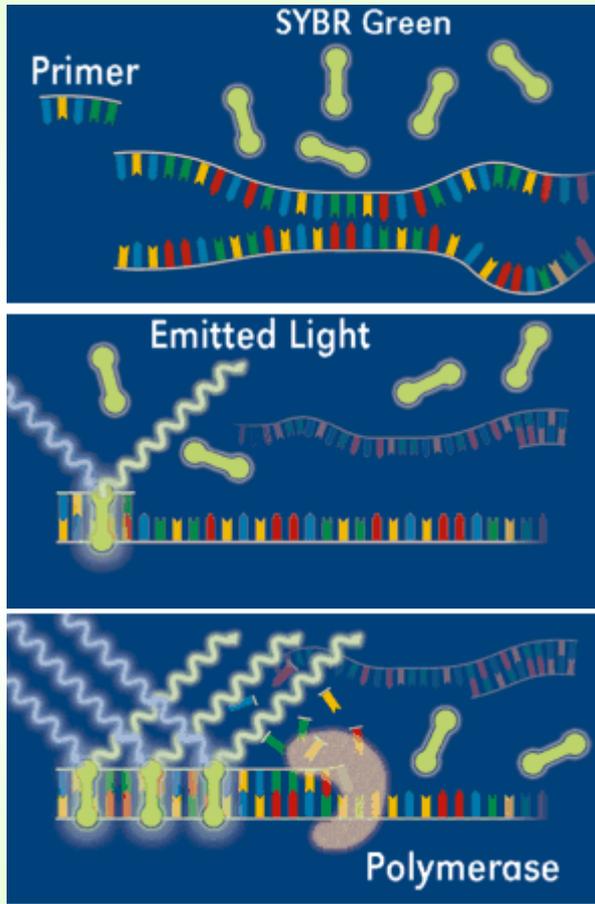
A Primer spans an intron/exon boundary



B Primers flank an Intron



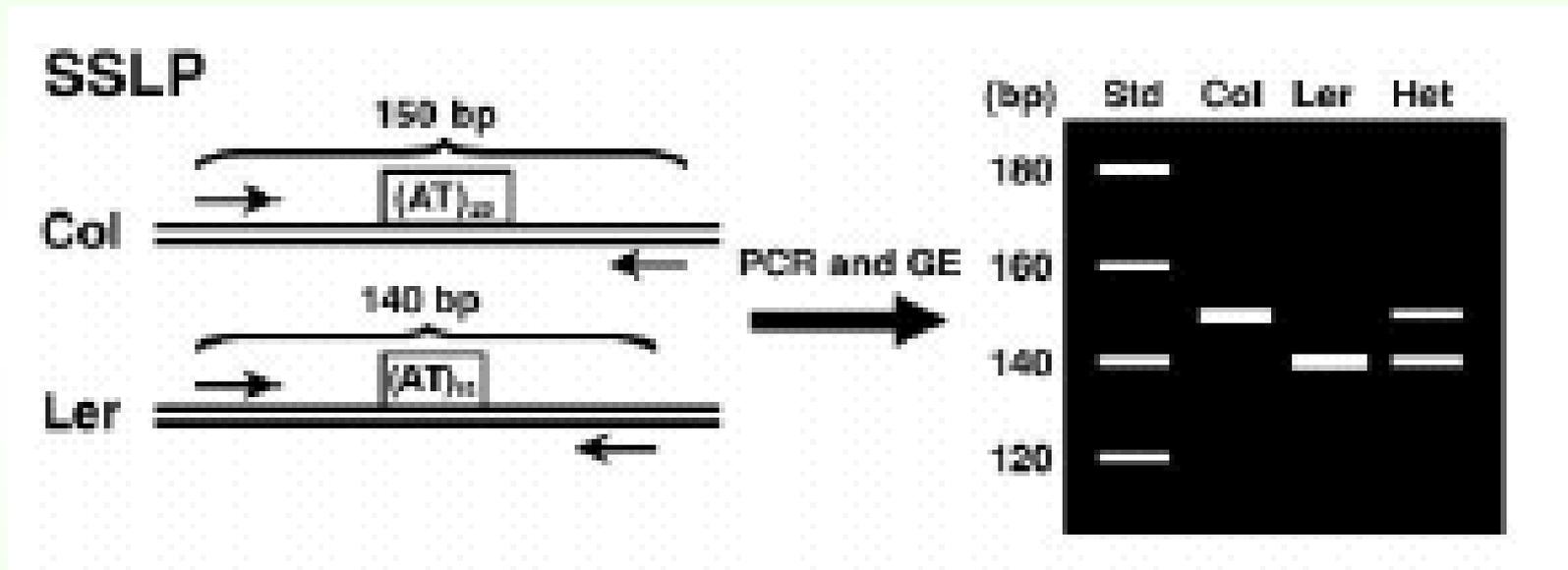
2. Real time-PCR (qPCR)



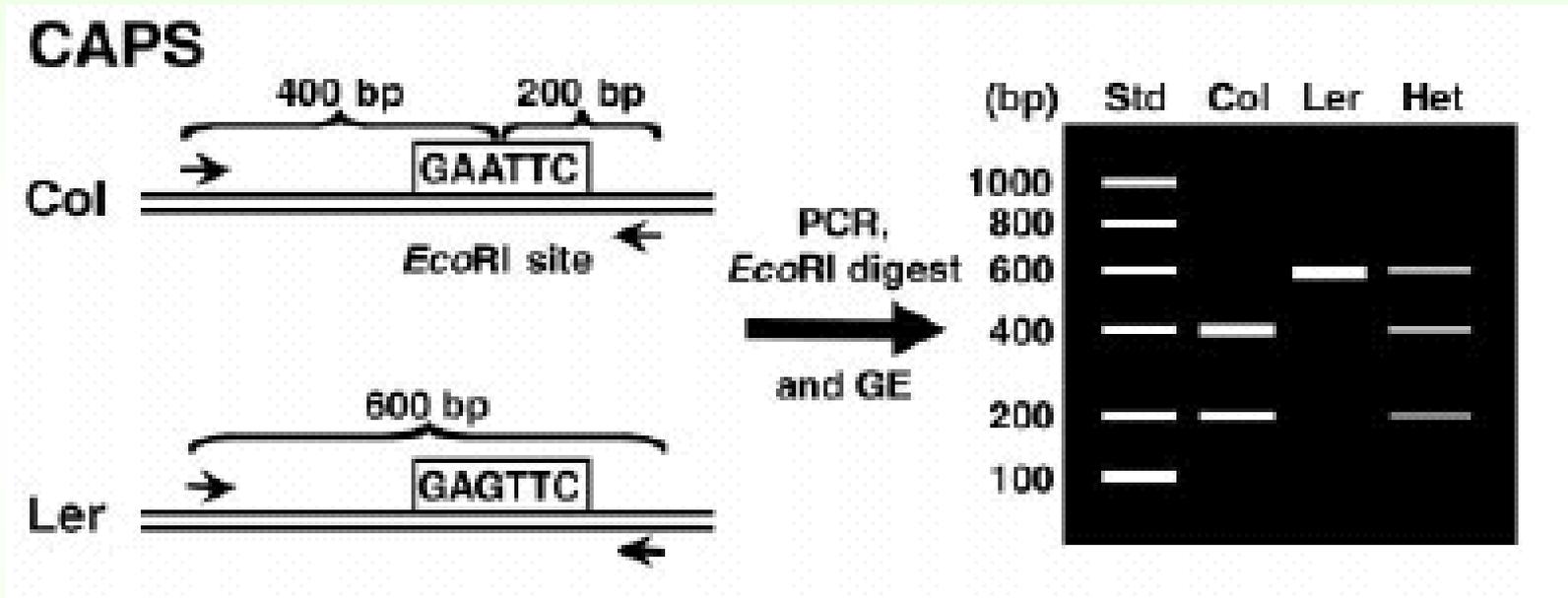
- Methode zur genauen Quantifizierung von mRNAs
- beruht auf Einbau eines Farbstoffs, der bei Interkalation in DNA-Doppelstränge fluoresziert



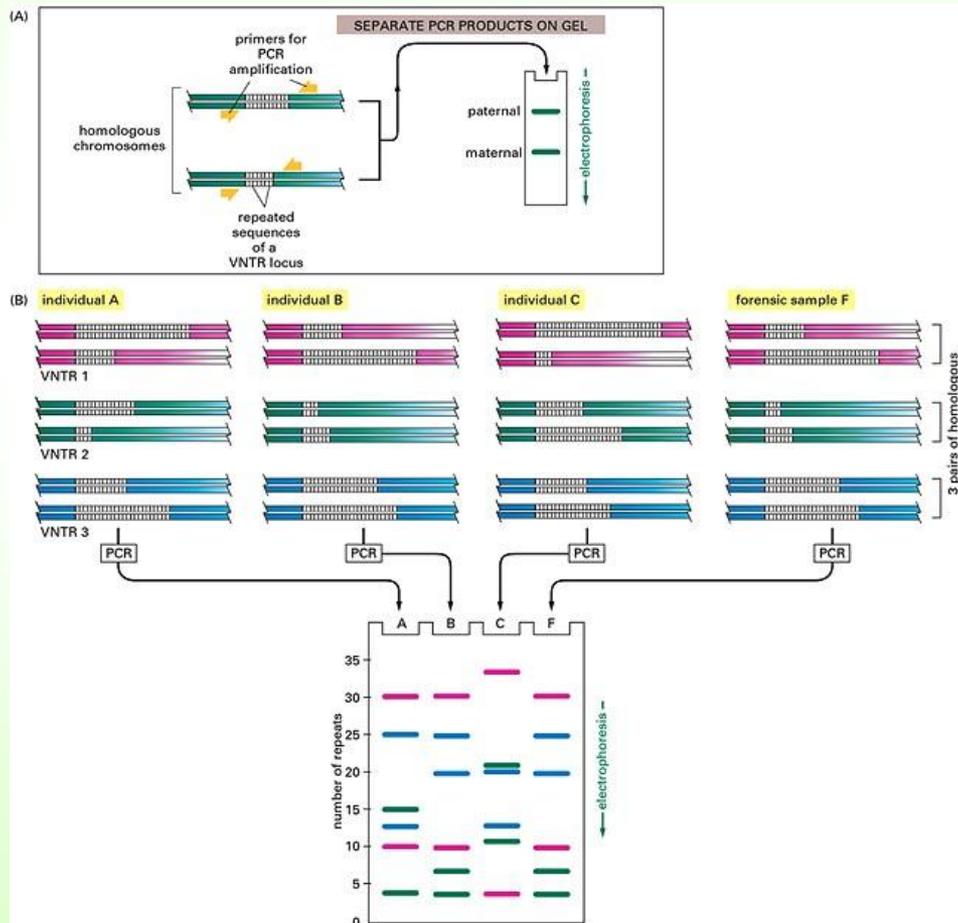
3. SSLP = Short Sequence Length Polymorphism (Fingerprint)



4. CAPS = Cleaved amplified polymorphic sequence (Fingerprint)



5. AFLP = Amplified fragment length polymorphism (Fingerprint)

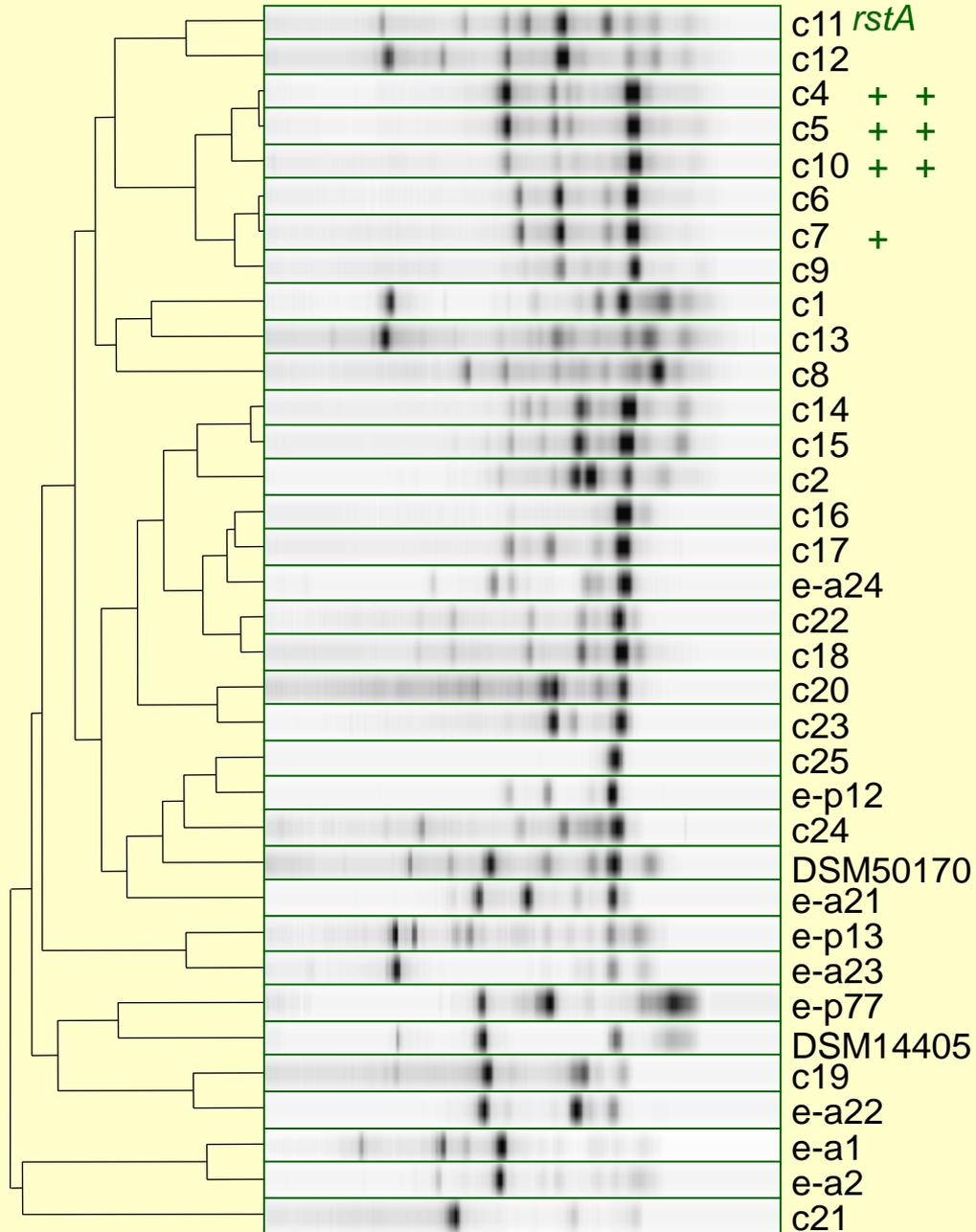


VNTR – variable number tandem repeats
STR – short tandem repeats

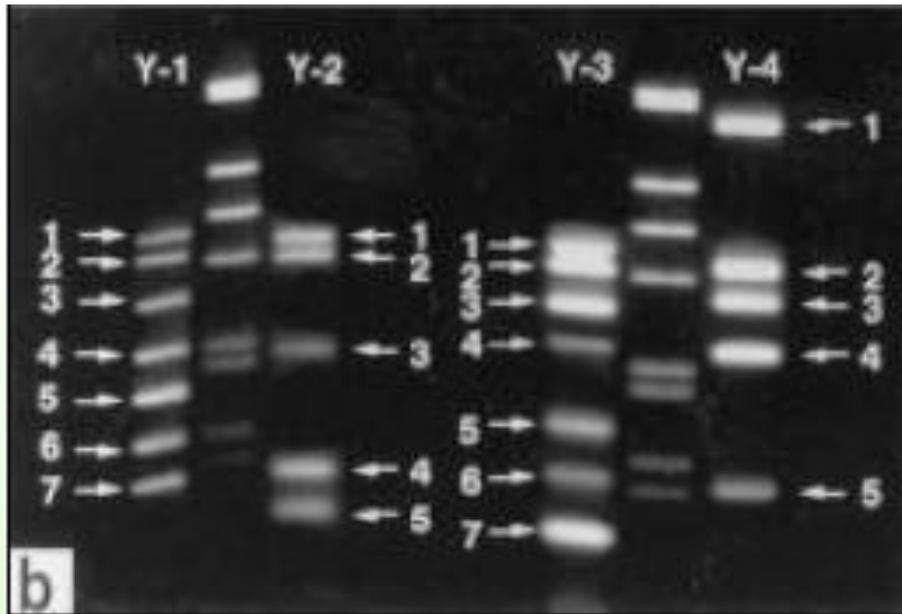


1 Primer ge

20 40 60 80 100 (%)



7. Multiplex-PCR

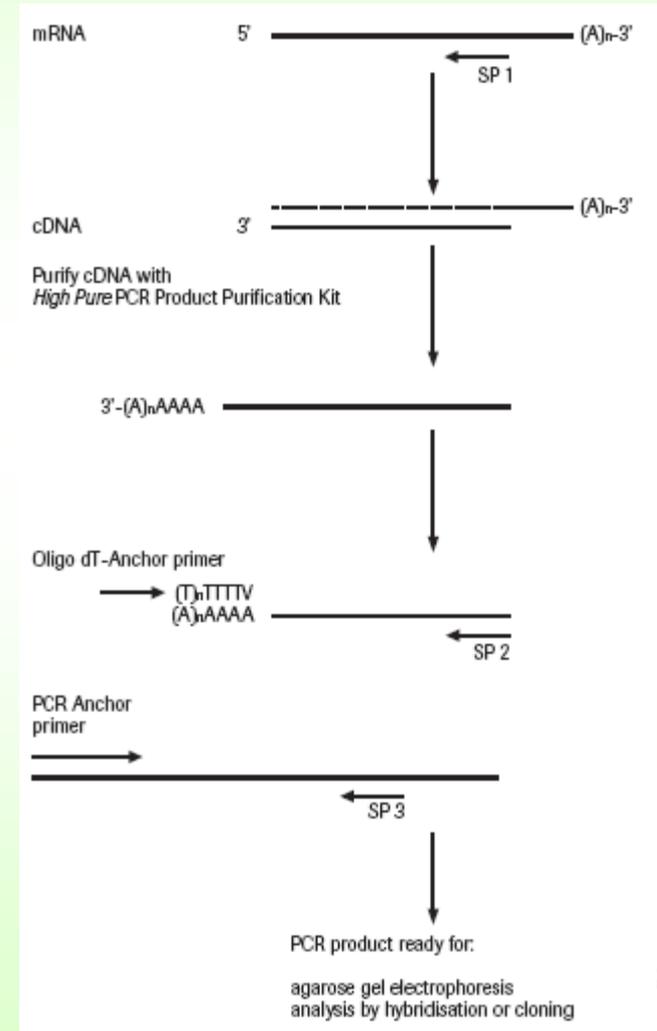


Bei einer Multiplex-PCR werden mehrere Primerpaare in einen Reaktionsansatz eingesetzt. Dabei müssen die Primer kompatibel zueinander sein (d.h. T_m vergleichbar, keine unerwünschten Selbstpaarungen, etc.).



8. RACE = Rapid amplification of cDNA ends

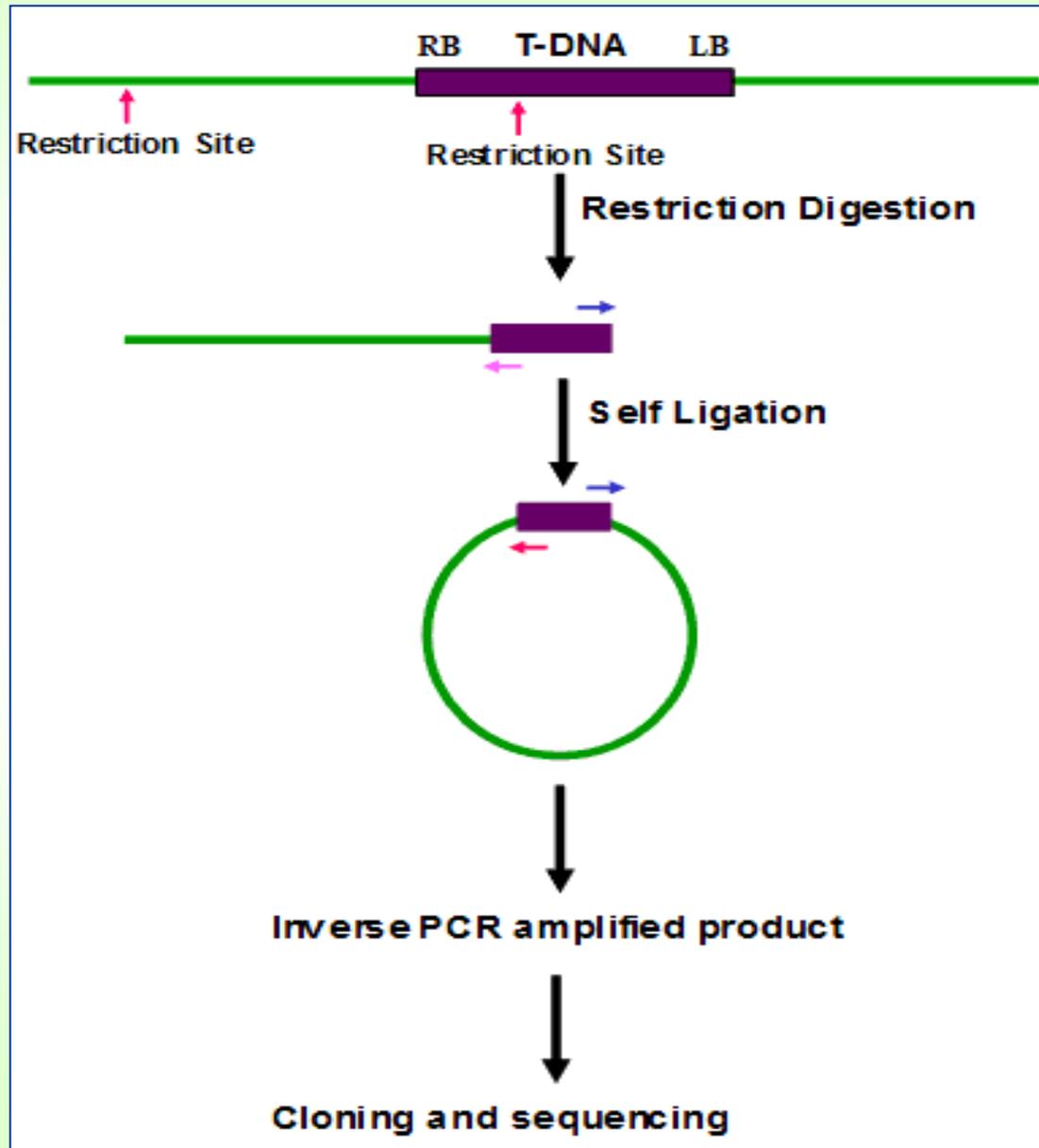
3'-RACE



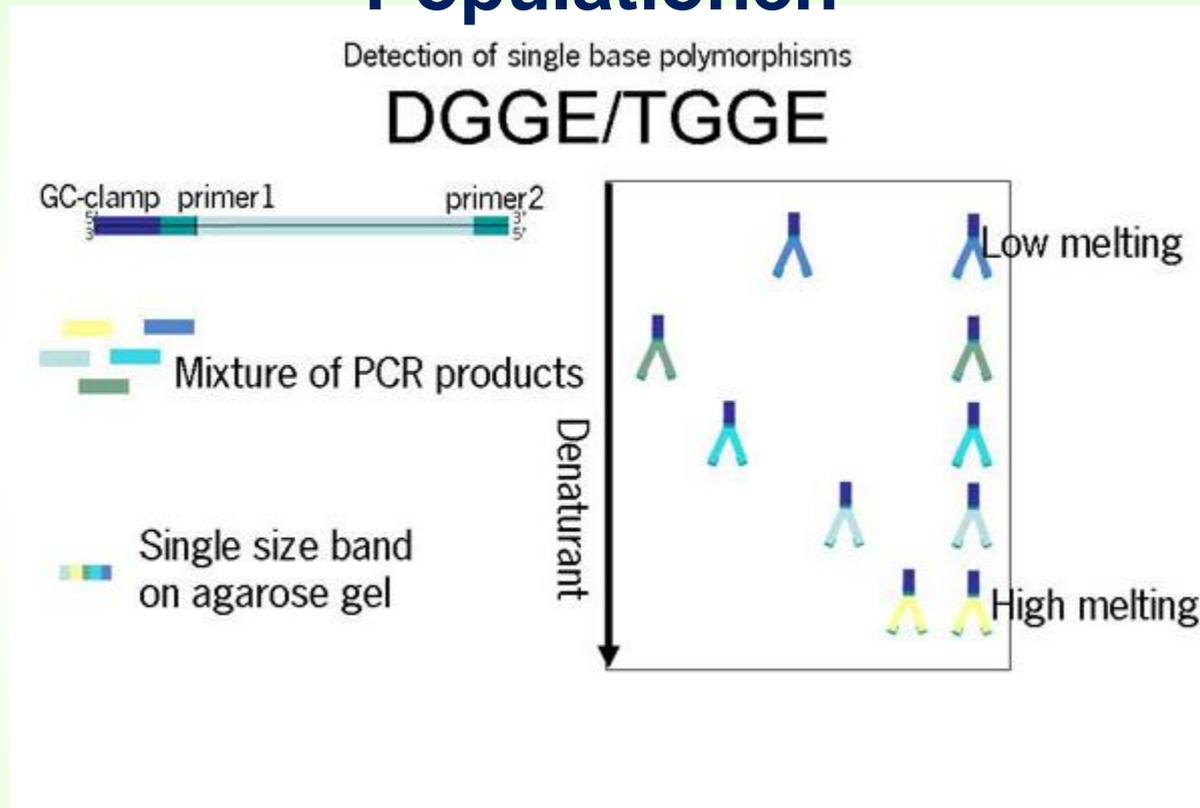
5'-RACE



9. Inverse PCR, Klonierung flankierender DNA



10. Denaturing (Temperature) gradient gel electrophoresis zur Unterscheidung mikrobieller Populationen



11. Nested-PCR

Vermehrung von internen Sequenzen aus einem primären PCR-Fragment, Spezifität des Nachweises nimmt zu.



Aminosäuresequenzmotive zur Primerableitung

ISIA_PCC7942	-----	W	W	A	G	N	-----	94
ISIA_PCC6803	-----	W	W	A	G	N	-----	94
ISIA_PCC7002	-----	W	W	A	G	N	-----	93
ISIA	-----	W	W	A	G	N	-----	94
PCC_73103	-----	W	W	A	G	N	-----	94
PCB_Pmar	-----	W	W	A	G	N	-----	95
PCB_Pro	-----	W	W	A	G	N	-----	94
FSBC_PCC6803	-----	W	W	A	G	N	-----	115
FSBC	-----	W	W	A	G	N	-----	102
FSBC_PCC7942	-----	W	W	A	G	N	-----	104

Region für den 5'-Primer

ISIA_PCC7942	-----	W	W	A	G	N	-----	199
ISIA_PCC6803	-----	W	W	A	G	N	-----	199
ISIA_PCC7002	-----	W	W	A	G	N	-----	198
ISIA	-----	W	W	A	G	N	-----	199
PCC_73103	-----	W	W	A	G	N	-----	199
PCB_Pmar	-----	W	W	A	G	N	-----	199
PCB_Pro	-----	W	W	A	G	N	-----	198
FSBC_PCC6803	-----	W	W	A	G	N	-----	228
FSBC	-----	W	W	A	G	N	-----	215
FSBC_PCC7942	-----	W	W	A	G	N	-----	217

Region für *isiA*-spezifischen 3'-Primer

ISIA_PCC7942	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	273
ISIA_PCC6803	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	273
ISIA_PCC7002	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	272
ISIA	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	273
PCC_73103	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	273
PCB_Pmar	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	276
PCB_Pro	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	275
FSBC_PCC	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	342
FSBC_PCC	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	329
FSBC_PCC	-----	P	Y	F	A	D	T	-----	331

Region für den 3'-Primer

ISIA_PCC7942	-----	H	L	W	H	A	-----	334
ISIA_PCC6803	-----	H	L	W	H	A	-----	334
ISIA_PCC7002	-----	H	L	W	H	A	-----	333
ISIA	-----	H	L	W	H	A	-----	334
PCC_73103	-----	H	L	W	H	A	-----	335
PCB_Pmar	-----	H	L	W	H	A	-----	337
PCB_Pro	-----	H	L	W	H	A	-----	336
FSBC_PCC6803	-----	H	L	W	H	A	-----	459
FSBC	-----	H	L	W	H	A	-----	446
FSBC_PCC7942	-----	H	L	W	H	A	-----	448

