

Die rekombinante DNA-Technologie 6

Polymerase-Kettenreaktion – die exponentielle Vermehrung der DNA

Barbara C. Biedermann

Ein weiteres, wichtiges Verfahren zur Bearbeitung von DNA ist die Polymerase-Kettenreaktion (engl. «polymerase chain reaction» = PCR). Die Polymerase-Kettenreaktion dient – wie der Name antönt – der exponentiellen Vermehrung von DNA. Das Reaktionsgemisch einer Polymerase-Kettenreaktion besteht im wesentlichen aus einer DNA-Vorlage (hier reicht ein einziges Molekül!), 2 verschiedenen Primern (das sind kurze, ca. 20 Nukleotide lange sogenannte Oligonukleotide, die zu 2 gegenüberliegenden Abschnitten der DNA-Vorlage komplementär sind und die im Überschuss vorliegen sollten), einem Nukleotidgemisch aus den 4 Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) und der DNA-Polymerase. Ein Zyklus einer Polymerase-Kettenreaktion besteht aus 3 Phasen: in der ersten Phase (Denaturierung) wird das Nukleotidgemisch auf fast 100 °C aufgeheizt, damit praktisch alle Doppelstrang-DNA in die Einzelstränge getrennt und entfaltet wird. In der zweiten Phase (Hybridisierung) wird das Reaktionsgemisch auf eine bestimmte Temperatur abgesenkt, bei der sich die Primer optimal an ihre komplementäre DNA-Sequenz anlagern

können. In der dritten Phase (Elongation) verlängert die DNA-Polymerase bei ihrer optimalen Arbeitstemperatur die Primer – komplementär in 5'-3'-Richtung – wie bei der Chromosomenreplikation. In jedem Zyklus wird die DNA-Vorlage verdoppelt. Wenn eine PCR-Reaktion über 30 Zyklen durchgeführt wird, werden aus einer einzigen DNA-Vorlage $2^{30} = 536\,870\,912$ (!) DNA-Moleküle. Die Auswahl der Primer bestimmt die Spezifität der Reaktion. Bei sorgfältigem Primer-Design (auch hier helfen einfache Computerprogramme) wird aus einem komplexen DNA-Gemisch, wie z.B. der Gesamt-DNA aus einem menschlichen Gewebe, ausschliesslich die gewünschte Sequenz amplifiziert. In den Anfängen der PCR-Anwendung war die verwendete DNA-Polymerase hitzelabil. Sie musste nach jedem Denaturierungsschritt neu zugegeben werden. Die DNA-Polymerase von Bakterien, die in den heissen Quellen der Erde leben (Taq von *thermophilus aquaticus*), ist hitzestabil, überdauert Denaturierungsschritte am Siedepunkt problemlos und muss deshalb nur vor Beginn der Reaktion einmal zugegeben werden.

Korrespondenz:
PD Dr. med.
Barbara C. Biedermann
Medizinische Universitätsklinik
Kantonsspital
CH-4101 Bruderholz
barbara.biedermann@unibas.ch

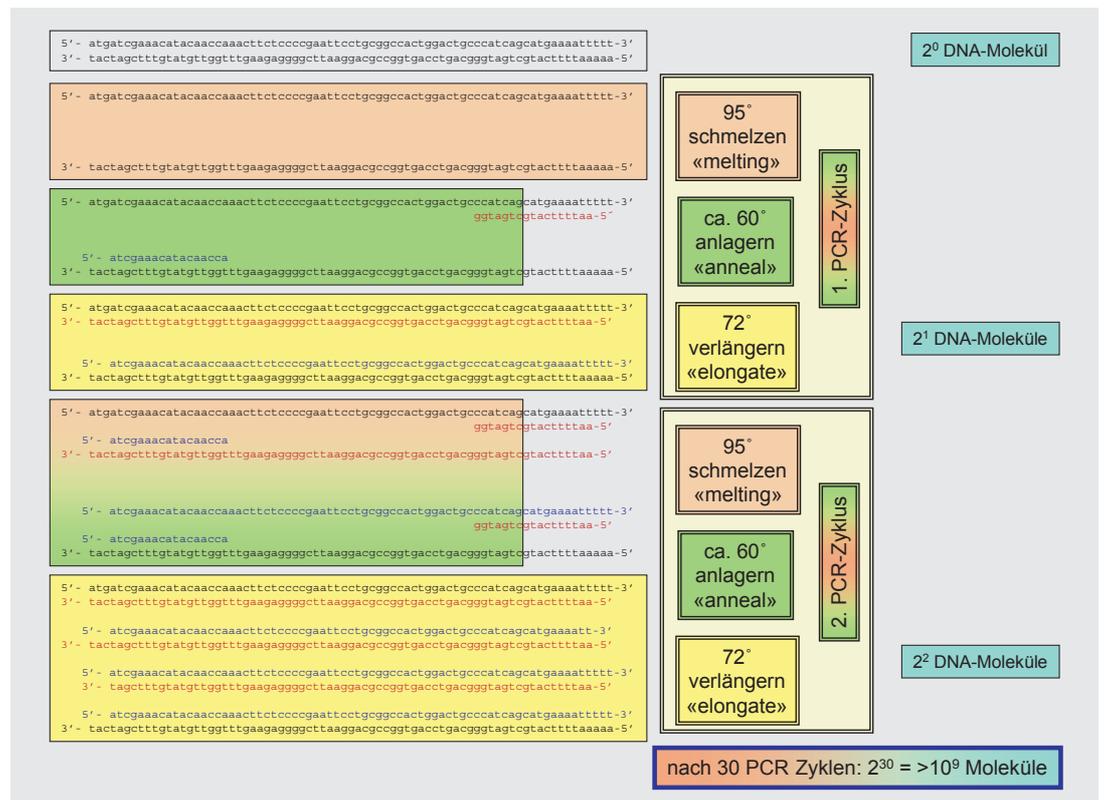


Abbildung 1. Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNA. So werden auch seltene DNA-Moleküle sicht- und bearbeitbar gemacht.