

---

# PCR

---

Polymerase Chain Reaction

---

# PCR

- “Kopieren” der DNA via enzymatischer Replikation
  - Exponentielle Amplifikation
    - Riesige Ausbeuten aus geringen Ausgangsmengen
  - 1983 von Karen Mullis entdeckt
    - (Nobelpreis 1993)
    - Die grundlegenden Prinzipien der PCR wurden erstmals 1971 von Kjell Kleppe beschrieben.
-

# PCR

- PCR ist eine der wichtigsten Technologien der Biochemie und Molekularbiologie
  - DNA Amplifikation, Genomanalysen, genetischer Fingerabdruck etc.
- Es ist einfach
  - Anwendung *in vitro*
  - Hat wenige grundlegende Komponenten
  - Der Prozess ist automatisiert

# PCR

## ■ Grundlegende Komponenten

- DNA Template
- Primer
- DNA Polymerase
- dNTP's
- Mg<sup>2+</sup>
- Puffer (pH 8,2 - 8,8 @ 25°C / Na-oder K-Salze / Mg<sup>2+</sup>)

# PCR DNA Template

- Die DNA sollte sauber sein
  - $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$
  - Keine weiteren Nukleinsäuren in der Probe
- Konzentrationen von 10 fg bis 200 ng
- Kontrolle
  - PCR Mix ohne Template (Wasserspür)

# PCR Primer

- Kurze Oligonukleotide (< 30 Basen) die komplementär zu Sequenzen im Template sind
- Anbindung der Primer erzeugt einen kurzen dsDNA Abschnitt
- Die Polymerase bindet an das 3'OH-Ende des Primers

---

# Primer Eigenschaften

- dürfen keine Sekundärstrukturen bilden (Stemloop, Hairpin )
  - Primer dürfen nicht komplementär sein, da sonst Primer-Dimere entstehen
  - beide Primer sollten möglichst die gleiche Schmelztemperatur besitzen
  - G oder C am 3'-Ende des Primers verbessert die Bindung
-

---

Taq-Polymerase -  
DNA abhängige DNA-Polymerase

- Polymerase I aus *Thermus aquaticus* *Deinococci*  
thermophile Bakterien (Optimum bei ca. 72°C)  
1969 isoliert aus heißer Quelle im Yellowstone Nationalpark



- strukturell und funktionell verwandt mit Polymerase I aus *E. coli*
-

---

# PCR Polymerase

- In frühen PCR's musste Polymerase für jeden Zyklus neu hinzugegeben werden
  - Seit 1986 wird hitzebeständige Taq Polymerase (*Thermophilus aquaticus*) benutzt
- Automatisierung der PCR
- Heute sind verschiedene hitzebeständige Polymerasen bekannt
- 
- Synthese von 5' zum 3'-Ende
-

---

# Zyklenanzahl

- zwischen 25 und 40 Zyklen
  - Reaktion setzt sich theoretisch fort bis eine Komponente limitierend wird,
  - ab diesem Zeitpunkt werden unspezifische Produkte zunehmen bzw. Reaktion stoppt
-

# PCR dNTP's

- Desoxynukleotidtriphosphate
  - dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- dNTPs können zur Detektion gelabelt werden
  - $^{32}\text{P}$ , Fluorophore, Biotin, Dioxygenin, usw.
- Im Überschuss zugeben

---

# PCR

# Mg<sup>2+</sup>

- Magnesium Ionen sind ein wichtiger Cofaktor der Polymerase
    - Mg<sup>2+</sup> Ionen bilden lösliche Komplexe mit DNA und dNTPs, den Substraten der Polymerase
    - Konzentration zu niedrig – geringe Ausbeute
    - Konzentration zu hoch – Mg<sup>2+</sup> blockiert den Zugang zur DNA; keine Amplifikation
  - Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 mM
-

# PCR

## ■ Die drei grundlegenden Schritte

- Denaturierung (ca. 95°C) – Wasserstoffbrückenbindungen der dsDNA werden gebrochen
- Annealingtemp.  $T_a$  liegt ca. 3-5°C unter Schmelztemperatur  $T_m$   
Berechnung  $T_m$  (in °C) nach Wallace-Regel:  **$2(A+T) + 4(G+C)$**   
zu niedrige  $T_a$  führt zu unspezifischer Bindung der Primer an Template, zu hohe  $T_a$  verhindert Anlagerung der Primer an Template
- Polymerisation (ca. 72°C) – Polymerase bindet an die dsDNA Sequenzen die durch die Primer gebildet wurden und erzeugt einen neuen komplementären Strang

## Elongation:

- Temperatur und Länge abhängig von

optimaler Arbeitstemperatur der Polymerase  
Polymerisierungsrate  
Länge des zu amplifizierenden Fragmentes

- *Taq* hat Optimum bei 72-78°C und polymerisiert ~2000 nt / min
- Daumenregel für *Taq*-Ansätze: Elongationsdauer von 1 min. pro 1000 nt

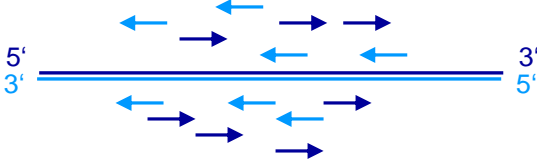
## Zwei Polymerasen im Vergleich:

	5'-3' Exonuklease- Aktivität	3'-5' Proofreading- Aktivität	Fehlerrate	Halbwertszeit bei 95°C	Art der gebildeten DNA-Enden
<i>Taq</i> <i>Thermus</i> <i>aquaticus</i>	ja	nein	$\sim 285 \times 10^{-6}$	50 min.	glatt + 3'-Überhänge
<i>Pfu</i> <i>Pyrococcus</i> <i>furiosus</i>	nein	ja	$\sim 30 \times 10^{-6}$	240 min.	nur glatte Enden

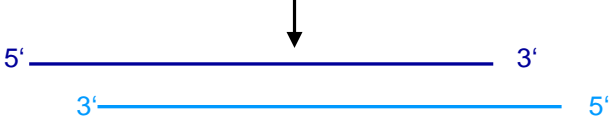
aber: *Pfu* wesentlich teurer als *Taq*, *Taq* arbeitet ca. 6x schneller als *Pfu*

# PCR Schema

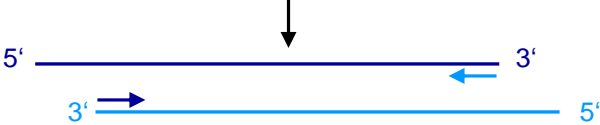
## 1. Zyklus



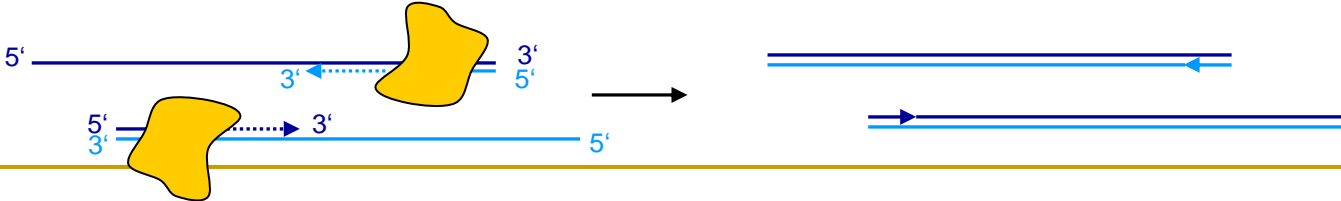
95°C – Denaturierung der DNA-Stränge



52-56°C – Annealing der Primer



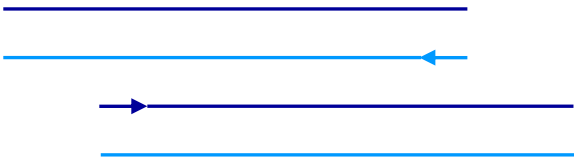
72°C – Elongation



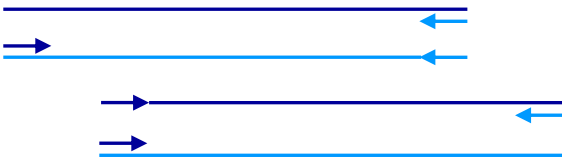
**2. Zyklus**



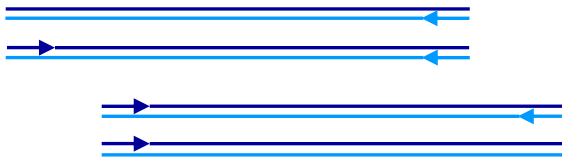
**95°C: Denaturierung der DNA-Stränge**



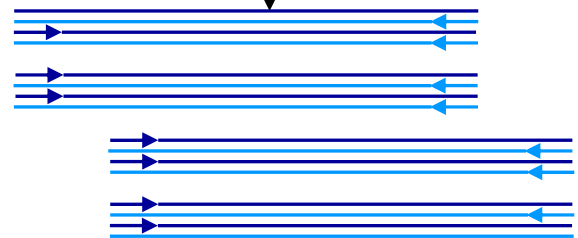
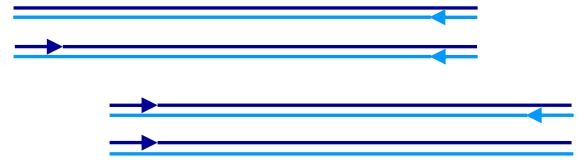
**52-56°C: Annealing der Primer**



**72°C: Elongation**

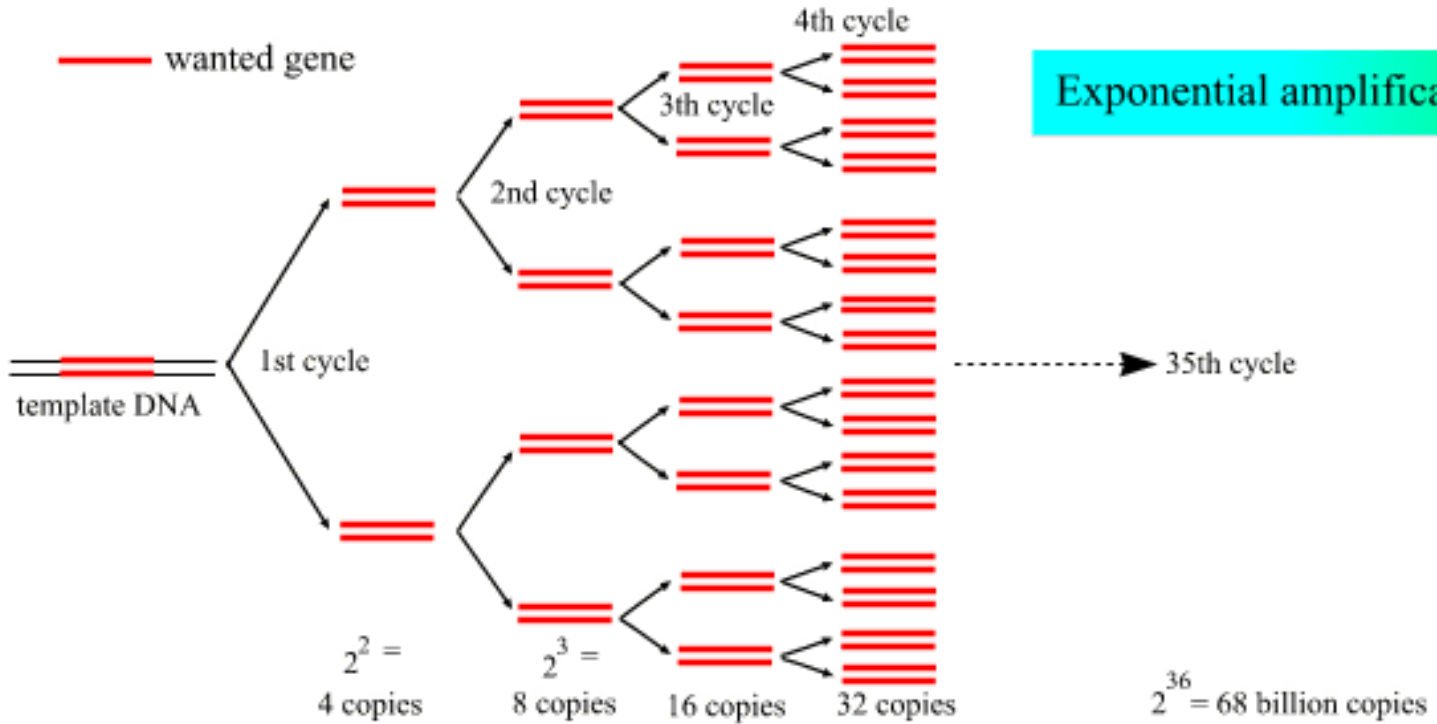


**3. Zyklus**



etc.

# PCR



(Andy Vierstraete 1999)