



Universität für Bodenkultur Wien
Interuniversitäres Department für
Agrarbiotechnologie Tulln

Polymerase-Kettenreaktion

Ein Einblick über eine der wohl bekanntesten
Analysemethoden der Neuzeit

Martin Kellner

Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und
Ernährungsphysiologie
Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie



Überblick

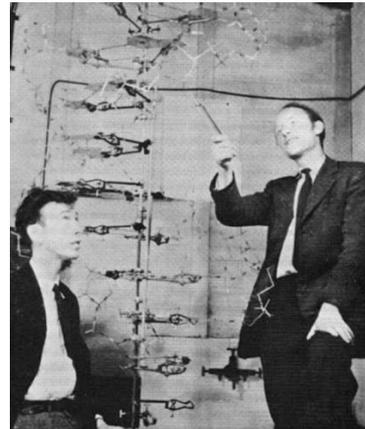


- I **Geschichte**
- II DNA
- III PCR-Grundlagen
- IV PCR-Techniken
- V PCR-Anwendungen
- VI Anforderungen
- VII Diskussion

Überblick



I Geschichte



The ongoing evolution... (I)

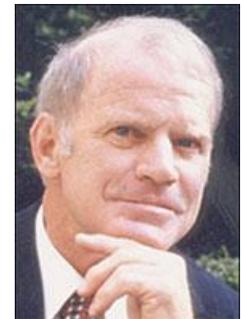
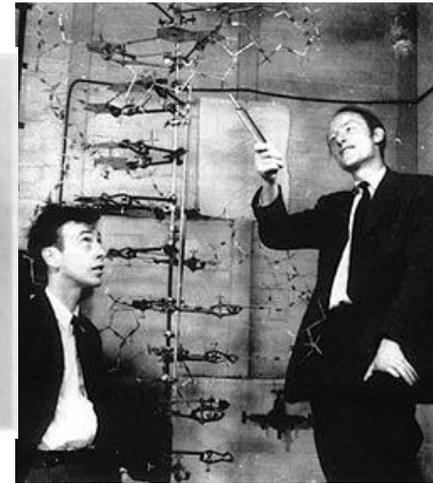
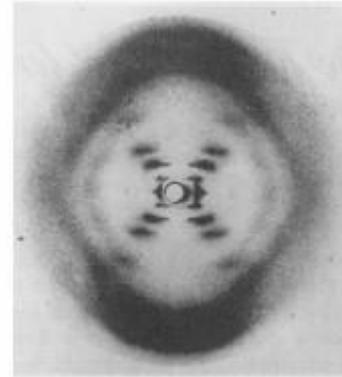


- Vor mehr als 4 mrd. Jahren
- 1869 Schweizer Arzt Friedrich Mischer „Nuklein“
- 1919 Phoebus Levene identifiziert DNA-Bausteine
- 1943 Transformationsexperimente von Oswald Avery

The ongoing evolution... (II)



- 1953 James Watson und Francis Crick entdecken DNA-Struktur
- 1962 Nobelpreis für Watson & Crick
- 1983 Kary Mullis erfindet Prinzip der PCR
- 1993 Nobelpreis für Kary Mullis
- 2013 Jubiläum: 60 Jahre DNA-Struktur



Überblick



- I Geschichte
- II DNA**
- III PCR-Grundlagen
- IV PCR-Techniken
- V PCR-Anwendungen
- VI Anforderungen
- VII Diskussion



II

Desoxyribonukleinsäure



Begriffe (I)



- *DNS*...Desoxyribonukleinsäure, engl. DNA; die chemische Substanz, aus der unser Erbgut besteht
- *RNS*...Ribonukleinsäure, engl. RNA; die chemische Substanz, aus der unter anderem die Arbeitskopien der Gene (mRNS) bestehen
- *Nukleinsäuren*...Der chemische Überbegriff für DNS und RNS; Nukleinsäuren sind kettenförmige Moleküle, deren einzelne Bausteine die Nukleotide sind
- *Nukleotide*...Die Bausteine der DNS; sie bestehen aus den vier Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin (A, T, C, G; in der RNS kommt statt Thymin die Base Uracil mit dem Kürzel U vor), einem Zucker- und mindestens einem Phosphatrest; ohne Phosphatrest spricht man von Nukleosiden

Begriffe (II)

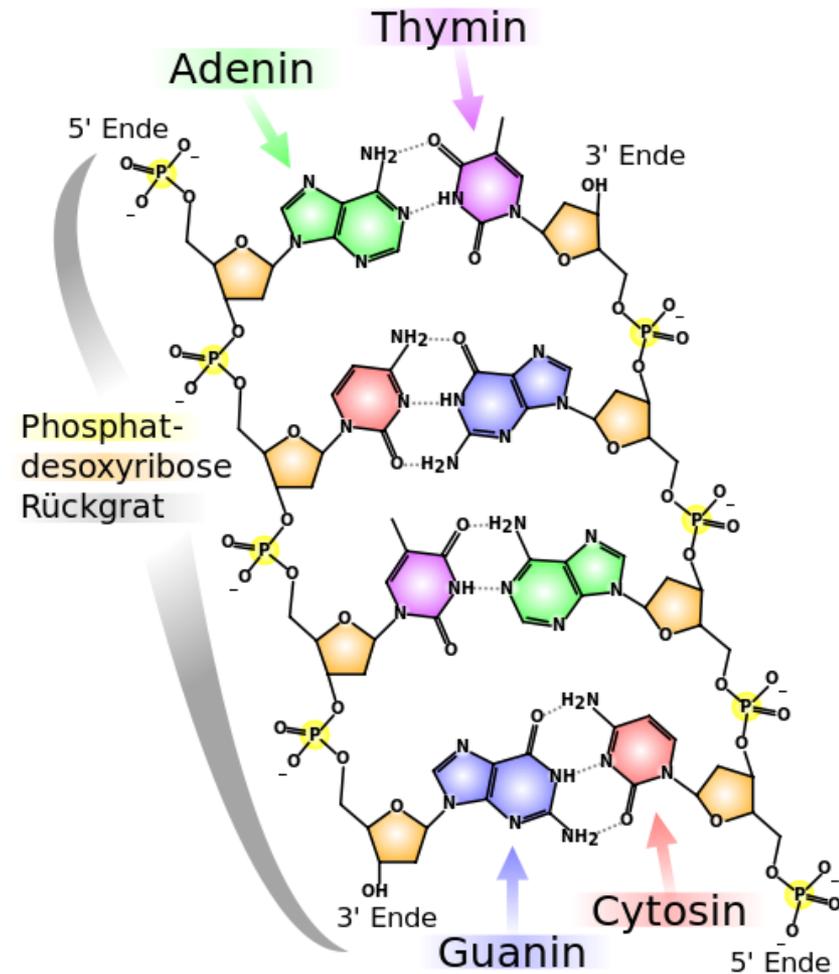


- *Sequenz*...Abfolge der Bausteine der DNS (DNS-Sequenz) oder der RNS (RNS-Sequenz)
- *Primer*...Eine kurzes Stück DNS mit definierter Sequenz, das als Verlängerungspunkt für Polymerasen dient
- *Polymerasen*...Enzyme, die aus den einzelnen Nukleotiden lange DNS- oder RNS-Ketten knüpfen
- *Hybridisierung*...Die Verbindung zweier komplementärer DNS- (oder RNS-)Stränge zu einem Doppelstrang
- *Komplimentäre DNS*...Zwei Stränge, deren Bausteine jeweils perfekte Paare bilden, nennt man komplementär; sie können einen stabilen Doppelstrang bilden.

Desoxyribonukleinsäure-DNS



- ...ist eine Doppelhelix
- ...zwei komplementäre Stränge
- ...zwei Basenpaare
- ...5' & 3'-Ende
- ...rechtsgängig



Überblick

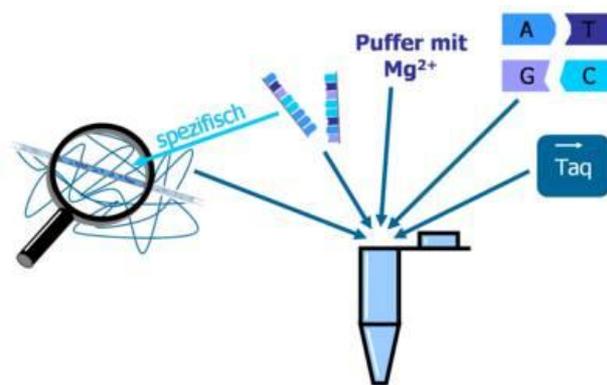


- I Geschichte
- II DNA
- III PCR-Grundlagen**
- IV PCR-Techniken
- V PCR-Anwendungen
- VI Anforderungen
- VII Diskussion



III

PCR-Grundlagen



Das Kochrezept



- **DNA/RNA Vorlage:** zu amplifizierende Probe
- **Primer:** Startpunkt für die Reaktion
- **DNA polymerase:** synthetisiert die DNA
- **dNTPs:** Bausteine für die Polymerase
- **Pufferlösung:** stellt die optimale Umgebung für die Reaktion
- **MgCl₂:** aktiviert die Polymerase

→ Mastermix sehr beliebt

Probe

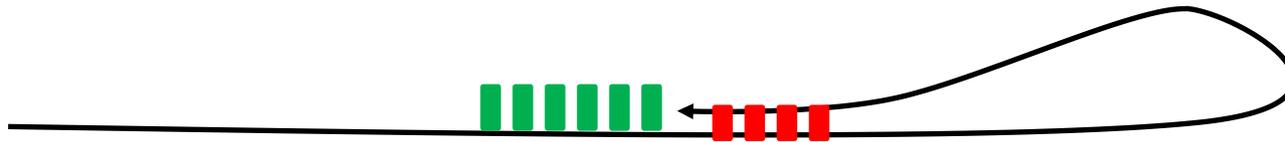


- Sollte reich an DNA / RNA sein → organisch
- Man kann so gut wie alles verwenden
 - Zellkompartimente
 - Zellen
 - Definierte Gewebsbereiche (z.B.: Darmzotten)
 - Ganze Gewebe
- IDEAL: Nukleinsäuren leicht extrahierbar → keine störende Matrix
- Abhilfe durch spezielle Aufreinigungskits

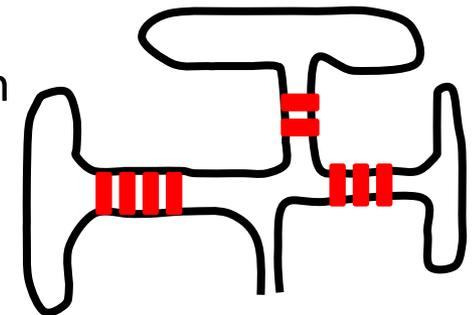
Primer



- meistens 15 – 30 Nukleotide lang
- „uniqueness“ am besten mit Computerprogramm überprüfen
- besonders am 3' Ende des Primer muss Basenpaarung optimal sein



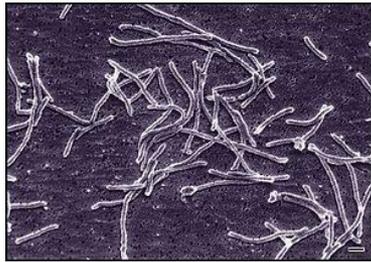
- Basen sollten zufällig verteilt sein, G+C Gehalt möglichst nicht extrem
- lange A+T bzw. G+C Abschnitte wenn möglich vermeiden
- interne Sekundärstrukturen minimieren



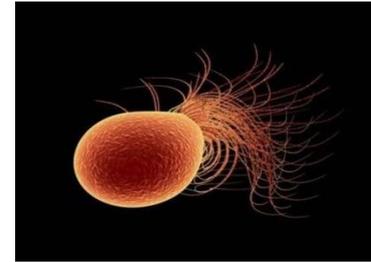
Thermostabile DNA Polymerase



- Katalysieren Polymerisation von Nukleotiden
- Von einem thermophilen Mikroorganismus



Thermus aquaticus



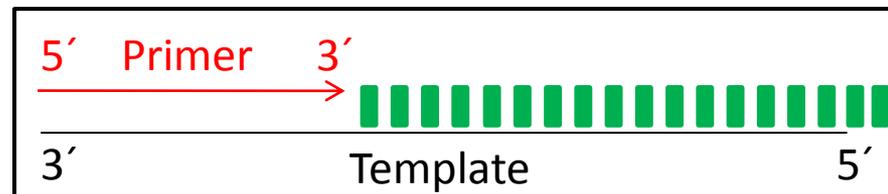
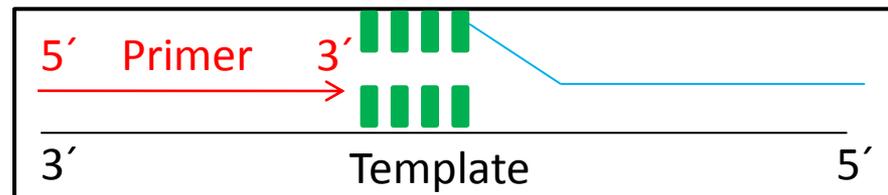
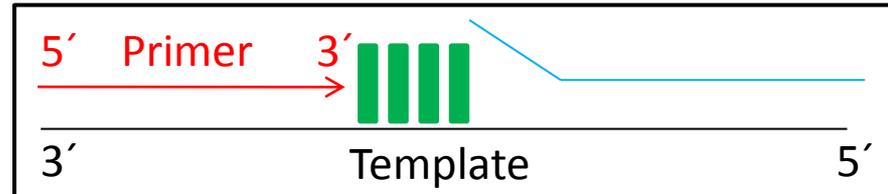
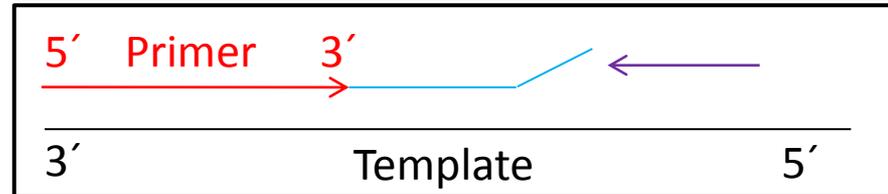
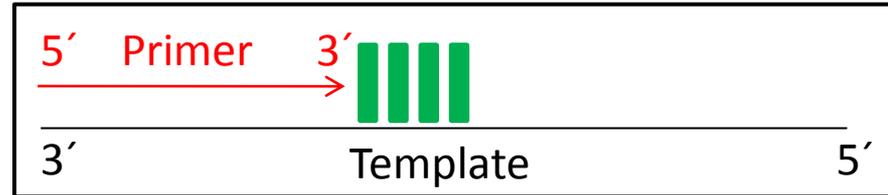
Pyrococcus furiosus

| Typ | Vorlage → Produkt | Funktion |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|
| DNA-abhängige DNA-Polymerasen | DNA → DNA | Replikation |
| RNA-abhängige DNA-Polymerasen | RNA → DNA | Reverse Transkription |
| DNA-abhängige RNA-Polymerasen | DNA → RNA | Transkription |
| RNA-abhängige RNA-Polymerasen | RNA → RNA | Replikation RNA-Viren |

Thermostabile DNA Polymerase



- 5' - 3' Polymerase
- 3' - 5' Exonuklease (proof reading)
- Strangverdrängung
- Verdrängung 5' - 3' Exonukleaseaktivität
- Terminale Transfere



Prozessivität und Fehlerrate



| Enzym | Temp.Opt. | Prozessivität | 3'-5' Exonuclease | Fehler (*10 ⁴) |
|---------|-----------|---------------|-------------------|----------------------------|
| Taq | 72°C | 40 nt | - | 110 |
| Tli | 72°C | 7 nt | + | 14 |
| Pfu | 72°C | 7 nt | + | 0,1 |
| Pol I | 37°C | 50 nt | + | - |
| Klenow | 37°C | 12 nt | + | 11 |
| T4 | 37°C | 50 nt | + | 8 |
| T7 | 37°C | > 1000 nt | + | 14 |
| Pol III | 37°C | > 5000 nt | + | - |

Prozessivität korreliert nicht mit Fehlerrate!!!

Taq vs. Pfu



| | 5'-3' Exonuklease | 3'-5' Exonuklease | Enden |
|-----|-------------------|-------------------|-------|
| Taq | Ja | Nein | 3'A |
| Pfu | Nein | Ja | Blunt |

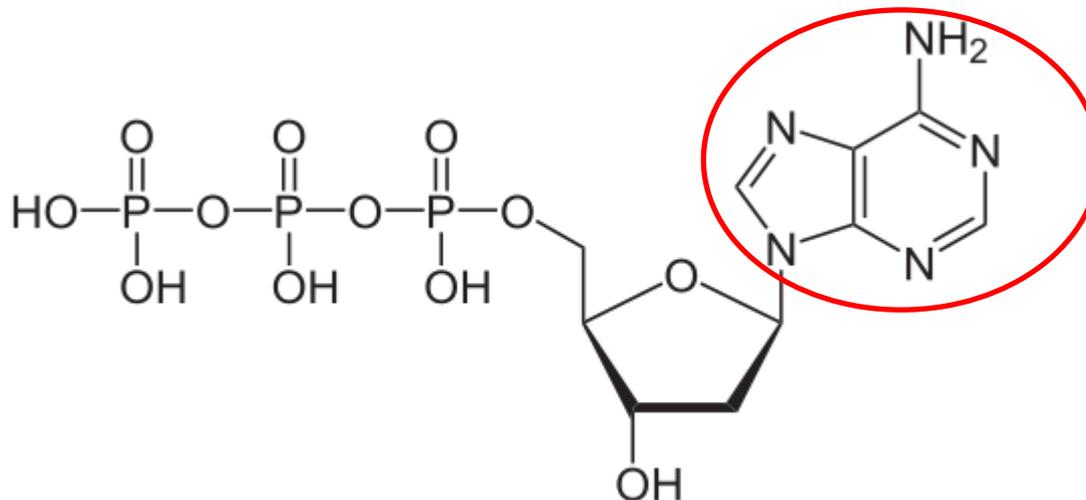
Zahlreiche andere thermostabile DNA-Polymerasen stehen zur Verfügung

→Spezialanwendungen

dNTP's



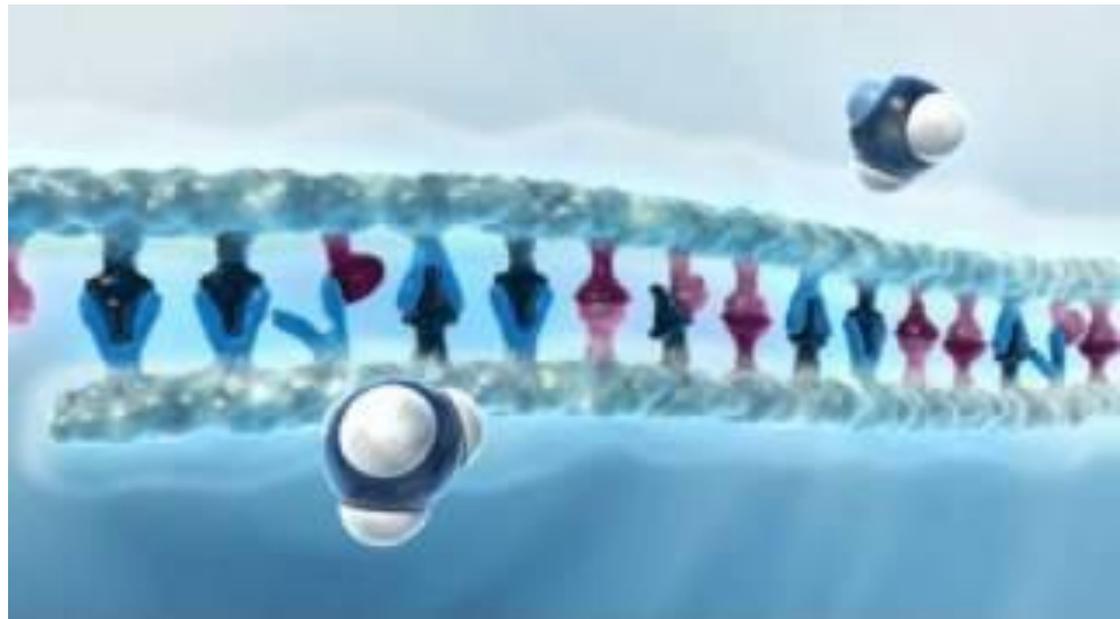
- Desoxyribonukleosidtriphosphate: Sammelbegriff für:
 - dATP Desoxyadenosintriphosphat
 - dCTP Desoxycytidintriphosphat
 - dGTP Desoxyguanosintriphosphat
 - dTTP Desoxythymidintriphosphat
- Finden lediglich bei der Nukleinsäure-Synthese Verwendung



Pufferlösung



- Stellt die optimale Umgebung für die Reaktion dar
- Typische Komponenten
 - TRIS-Cl
 - KCl
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - MgCl_2
 - pH $\sim 8,5$

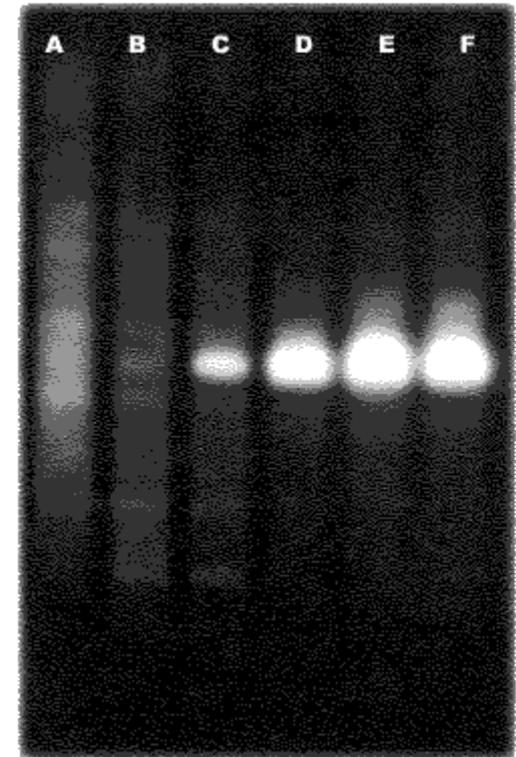


Magnesiumchlorid – $MgCl_2$



- Kofaktor für DNA-Polymerasen
- Bildet lösliche Komplexe mit dNTPs
- Stabilisierend auf die Anlagerung des Primers

| Spur | A | B | C | D | E | F |
|--------------|-----|---|-----|---|-----|---|
| Mg^{2+} mM | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 |

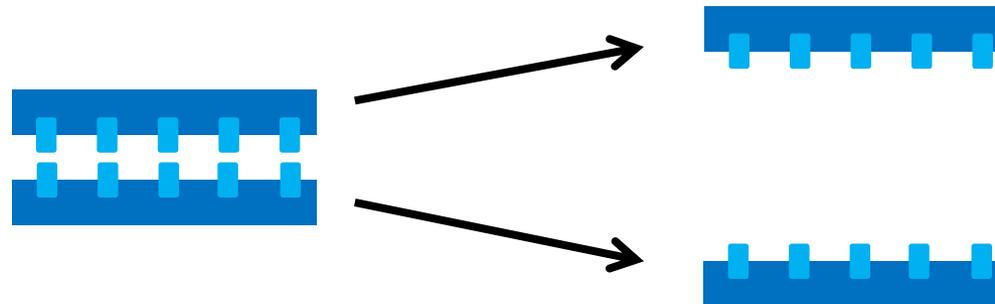


Der Ablauf (I)



Denaturierung:

- DNA wird auf rund 95°C erhitzt
- Wasserstoffbrücken werden aufgebrochen
- es resultieren Einzelstränge

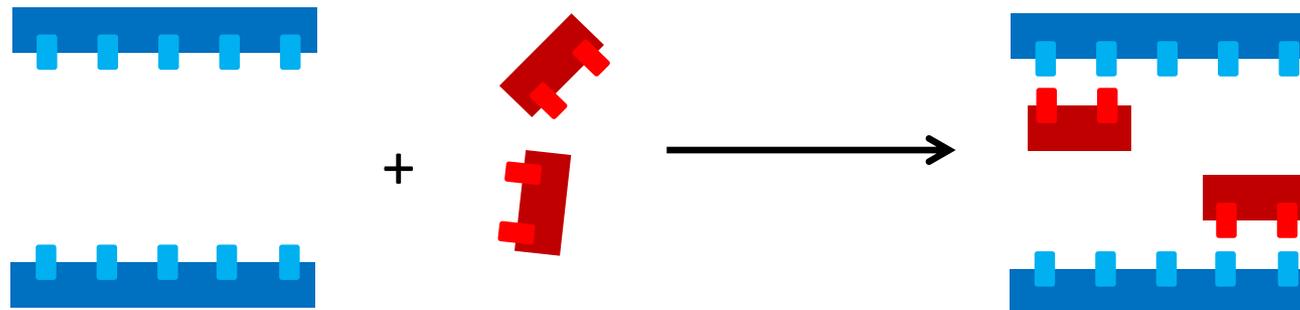


Der Ablauf (II)



Annealing:

- Reaktion wird auf $\sim 68^{\circ}\text{C}$ abgekühlt
- Für kurze Zeit konstant gehalten (30s)
- Primer binden an die Einzelstränge

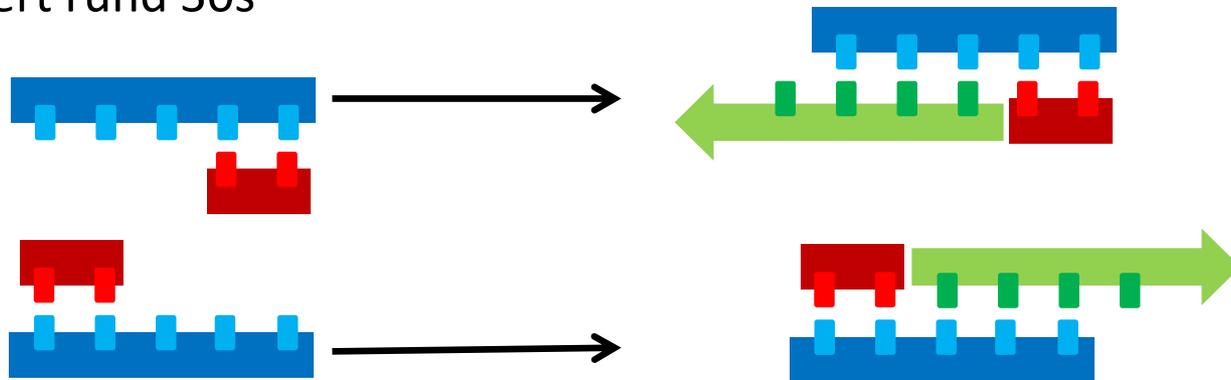


Der Ablauf (III)



Elongation:

- Polymerase synthetisiert Komplementärstrang
- Findet bei rund 70°C statt
- Schritt dauert rund 30s



Revolution in der Wissenschaft



- ▶ Rasante Vermehrung
- ▶ 2^n -Zyklen

→ Innerhalb kürzester Zeit eine große Menge an DNA!

$$E = b * 2^n$$

E= Zahl an gebildeten Molekülen
b= Ausgangszahl von Molekülen
n= Zahl der PCR Zyklen

| Anzahl der Zyklen | Anzahl der DNA-Stränge |
|-------------------|------------------------|
| 1 | 2 |
| 2 | 4 |
| 3 | 8 |
| 5 | 32 |
| 10 | 1024 |
| 20 | 1 048 576 |
| 30 | 1 073 741 824 |
| 40 | $1,1 * 10^{12}$ |
| 45 | $3,5 * 10^{13}$ |

Fehlerrate



| | geringe Fehlerrate | hohe Fehlerrate |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| dNTP-Konzentration | 40-50 mM | 1-2 mM |
| Mg ²⁺ -Konzentration | 1:1 mit dNTPs | 6-8 mM, +0,5 mM Mn |
| Annealing Temperatur | höher | niedriger |
| Enzymkonzentration | niedriger | höher |
| Extensionszeit | kürzer | länger |
| Zahl an Zyklen | weniger | mehr |

„High fidelity PCR“: benötigt 3′-5′ Exonuklease
Reaktion soll eher langsam ablaufen
Konzentration (Reagenzien) fördert korrekte Basenpaarung

→ Hohe Ausbeute und niedrige Fehlerrate sind Gegensätze!

Überblick



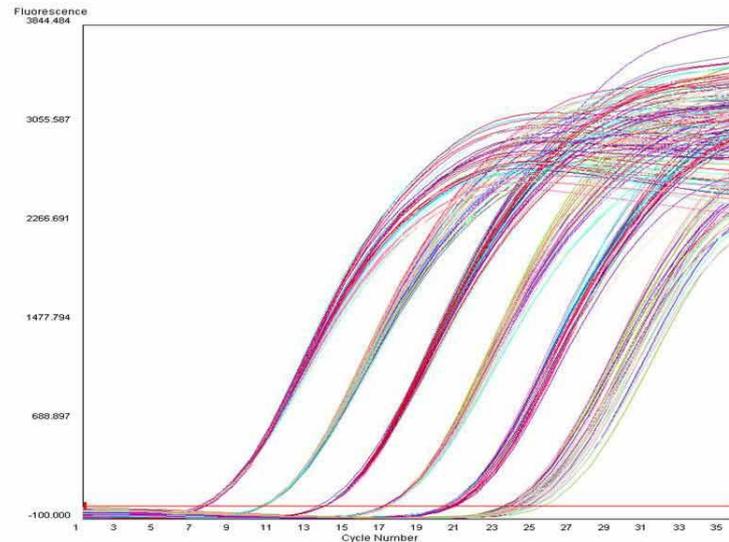
- I Geschichte
- II DNA
- III PCR-Grundlagen
- IV PCR-Techniken**
- V PCR-Anwendungen
- VI Anforderungen
- VII Diskussion

Überblick



IV

PCR-Techniken



Hot-start PCR



- Erster Schritt: halten hoher Temperaturen (rund 97°C) für rund 5 Minuten
- Nicht-spezifische Amplifikationen werden verhindert
- Inaktiviertes Enzym, welches durch Hitze aktiviert wird
- Primer-Dimere werden verhindert
- Primer binden spezifischer an DNA
- Veraltet: Wachsschicht, die Polymerase von DNA trennt und schmilzt

RT-PCR



- RNA wird statt DNA als template eingesetzt
- Amplifikation von einzel- oder auch doppelstrangigen RNA-Molekülen
- Sehr oft bei der Genexpressionsanalyse eingesetzt
- 1. Schritt: RNA wird durch reverse transcriptase in cDNA umgeschrieben
- 2. Schritt: normale PCR mit cDNA als template

differential-display-PCR

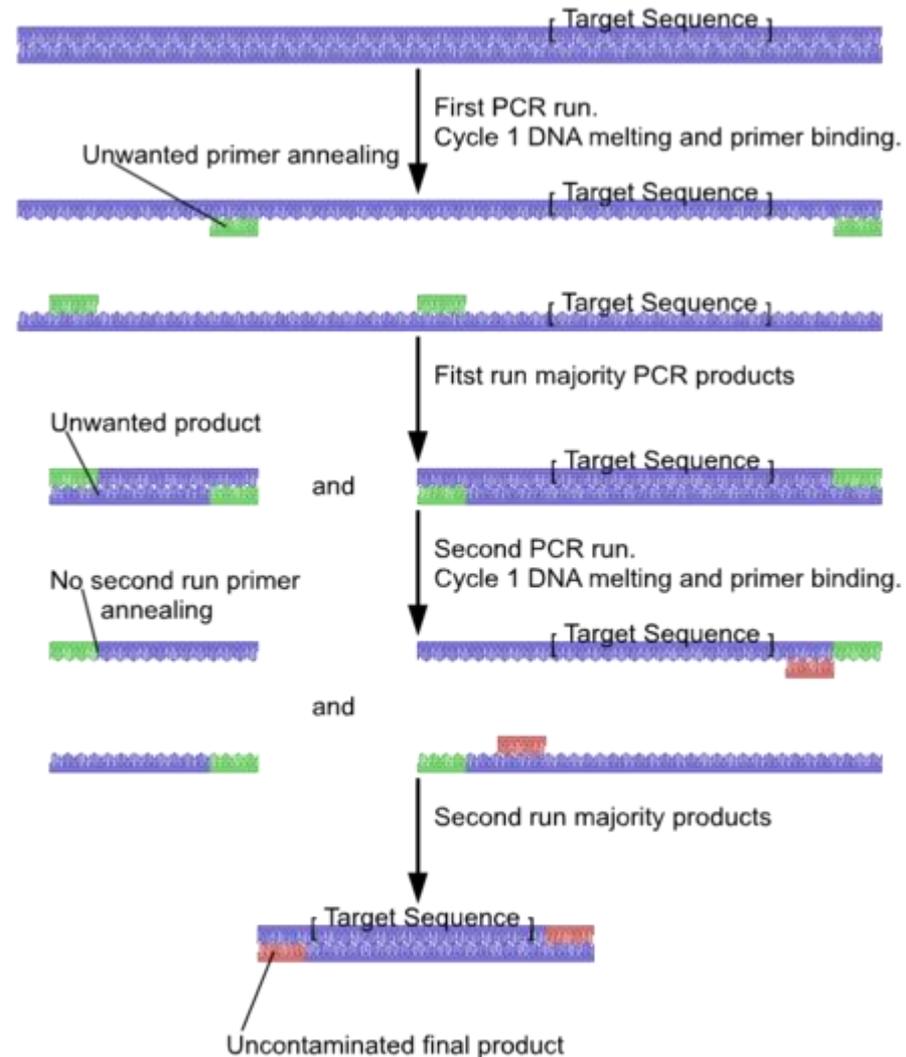


- Eine Variante der RT-PCR
- Zunächst die mRNA in cDNA umgeschrieben
- Anschließend amplifiziert (mit degenerierten Primern)
- Produkte werden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und verglichen
- Nachteil: Reproduzierbarkeit nicht hoch

nested-PCR



- Erhöht Spezifität der Reaktion
- Produkt der ersten Amplifikation entnommen
- Für zweite PCR eingesetzt (mit anderen Primern)
- Unspezifische Produkte werden nicht mehr amplifiziert



touchdown-PCR

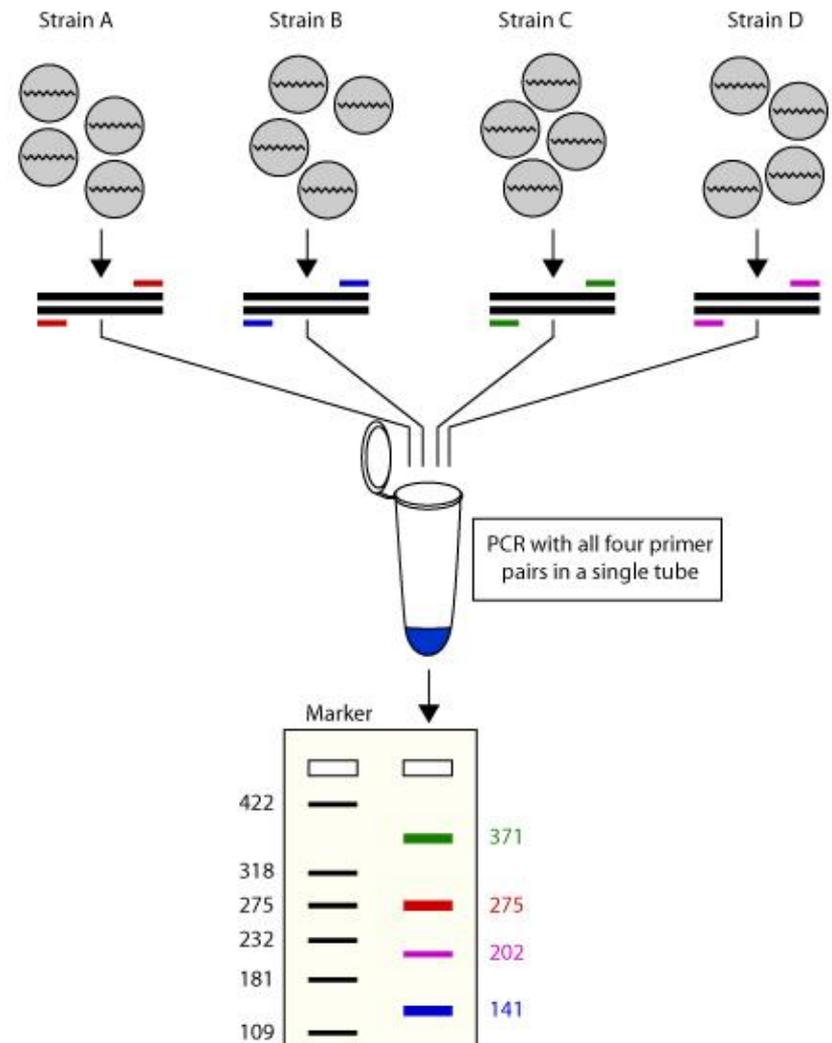


- Annealing-Temperatur (1. Schritt) rund 10°C höher als errechnete
 - Es wird eine hohe Spezifität „erzwungen“
- Temperatur wird schrittweise gesenkt (1°C pro Zyklus)
- Im Anschluss 20-25 Zyklen bei errechneter annealing-Temperatur
- Optimal: mit hot-start Methode verbinden

Multiplex-PCR



- Einzelne PCR-Verfahren werden zusammengefasst
- Aufwand, Kosten und zeit wesentlich verringert
- ABER: Entwicklung der Methode mit erhöhten Aufwand verbunden
- Wechselwirkungen müssen erkannt und vermieden werden
- Verfahren, dem immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt wird



real-time PCR / qPCR



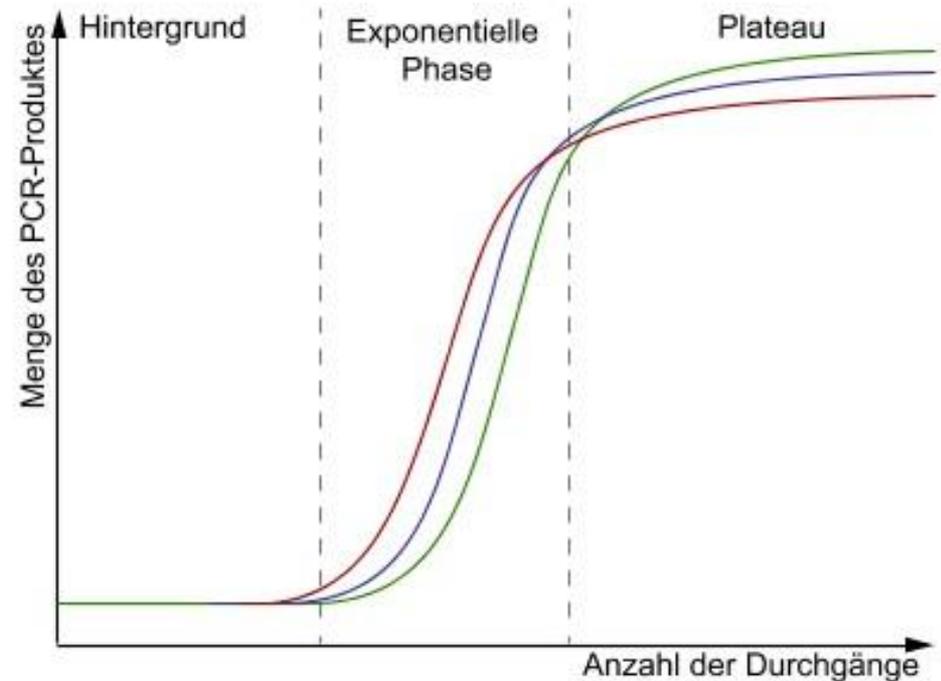
- Meilenstein in der PCR-Technologie
- Man kann „online“ die Menge an neu gebildeten Produkt verfolgen
- Aussagen über den Erfolg der PCR im Vorfeld
- **Es können Rückschlüsse auf Anfangskonzentration getroffen werden**



real-time PCR / qPCR



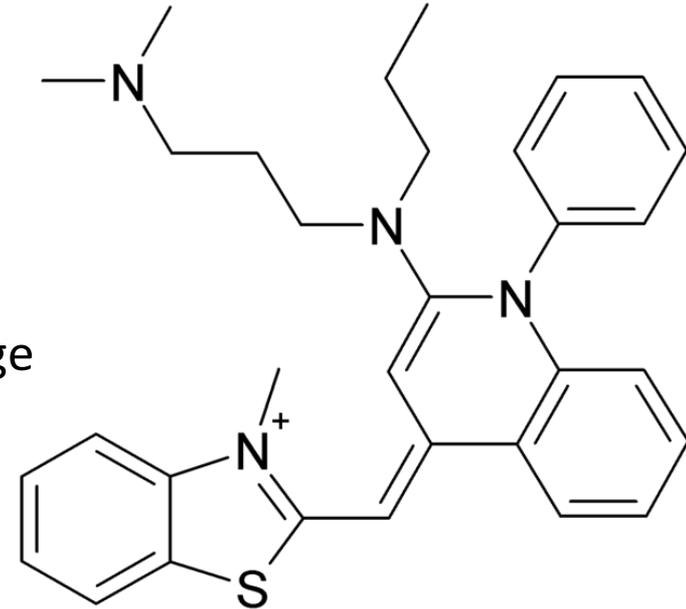
- Präzise, und relativ leicht durchführbar
- Quantifizierung der Produkte bei jedem einzelnen PCR-Zyklus
- Breiter dynamischer Bereich
- Basieren auf Detektion und Quantifizierung eines fluoreszierenden Reporters



SYBR® Green



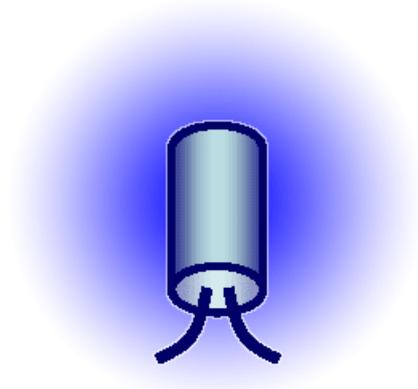
- Bindet an doppelstrangige DNA
- Fluoresziert im gebundenen Zustand
- Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge
- **Vorteile:** billig, sensitiv, einfach zu verwenden
- **Nachteil:** bindet an jeden DNA-Doppelstrand (Primer-Dimere!!!)



FRET – fluorescence resonance energy transfer



- Reporter (Donor) und Quencher (Akzeptor) in unmittelbarer Nähe (wichtig!!!)
- Reporter wird angeregt und fluoresziert
- Quencher absorbiert Fluoreszenz des Reporters



Donor



Akzeptor

Anwendungsbeispiel



Probennahme

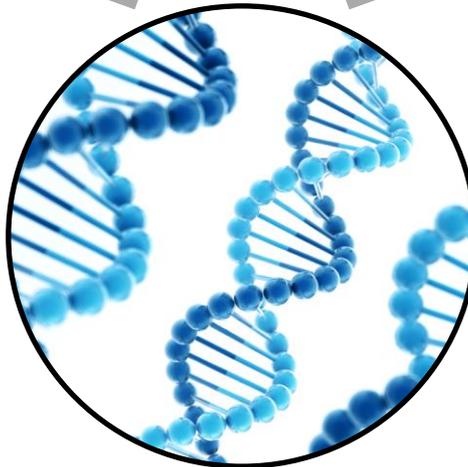
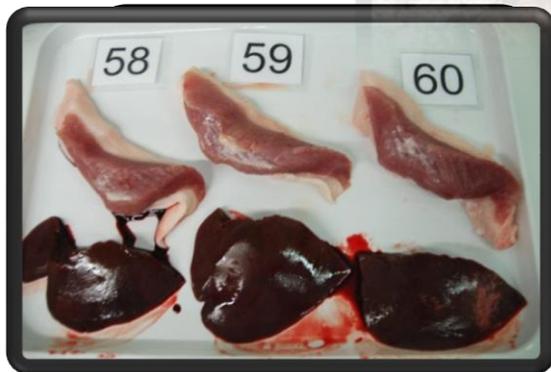
Aufarbeitung

Aufreinigung

cDNA-Synthese

Analyse

1. Schritt: Probennahme



1. Schritt: Probennahme



- Sollte sehr rasch durchgeführt werden
- Mögliche unerwünschte Effekte vermeiden
 - Einfluss durch Temperatur
 - Einfluss durch (mechanische) Kräfte
- Einsatz von...
 - ...flüssigen Stickstoff
 - ...RNA-stabilisierende Reagenzien

2. Schritt: Aufarbeitung



Probenmaterial

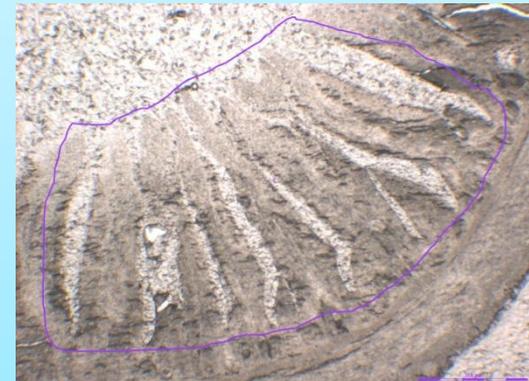
Gesamtes Gewebe

- „Einfache“ Homogenisierung
- Für alle Proben geeignet
- Besonders für Kot und Blut



Spezielle Bereiche

- Gewebe muss eingebettet sein
- Nicht für alle Proben geeignet
- Bessere Differenzierung



2. Schritt: Aufarbeitung



- Proben unter „sterilen“ Bedingungen entnehmen
- So gut wie möglich säubern
 - Blut abwaschen
 - Schmutz „beseitigen“
- Proben fixieren (Formaldehyd, HOPE®, Kälte...)
 - Haltbarmachung
 - Nukleinsäuren in nativen Zustand
- Proben in Paraffin einbetten
 - Bessere Handhabung
 - Leichtere Lagerung



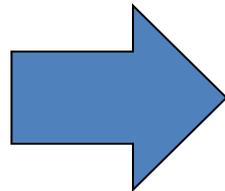
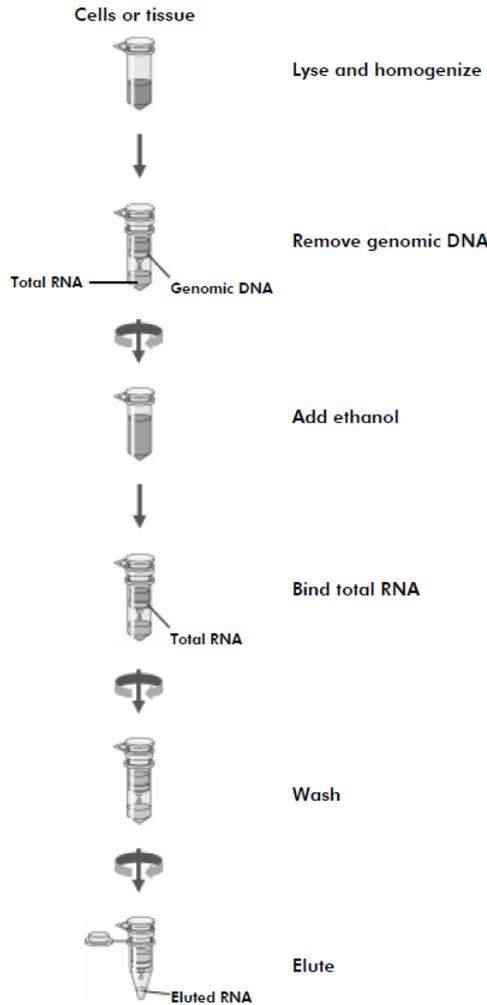
3. Schritt: Aufreinigung



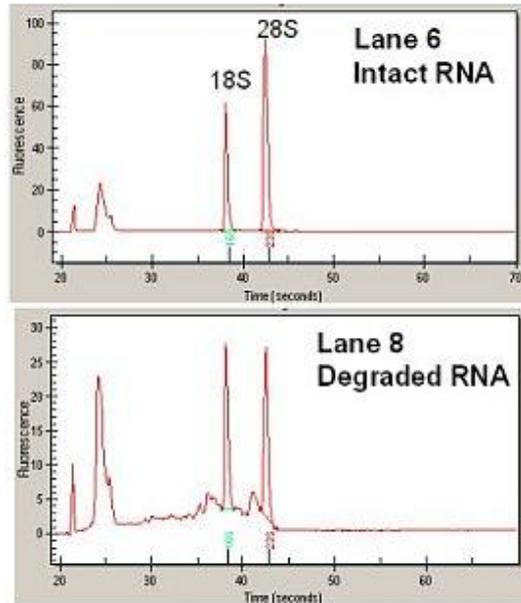
- Nukleinsäuren (RNA/DNA) von Matrix „befreien“
- Viele verschiedene Möglichkeiten
 - Phenol-Chloroform Extraktion
 - Alkohol-Fällung (EtOH, IPA)
 - Methode nach Chomczynski und Sacchi (TriFast™)
 - Kit Systeme
- Konzentration und Reinheitsgrad bestimmen

Kontamination mit DNAsen und RNAsen vermeiden!

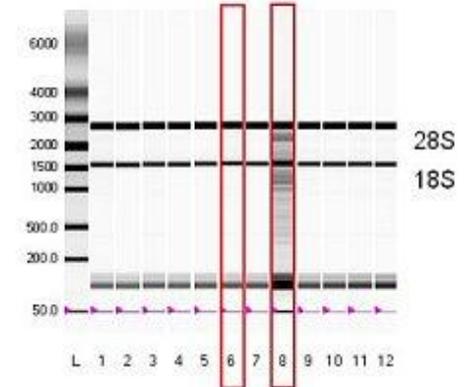
3. Schritt: Aufreinigung



Electropherogram Traces From Human RNA 50 ng/μl



Virtual Gel Image is generated from the electropherograms



Automatically Calculated Ribosomal RNA Ratios

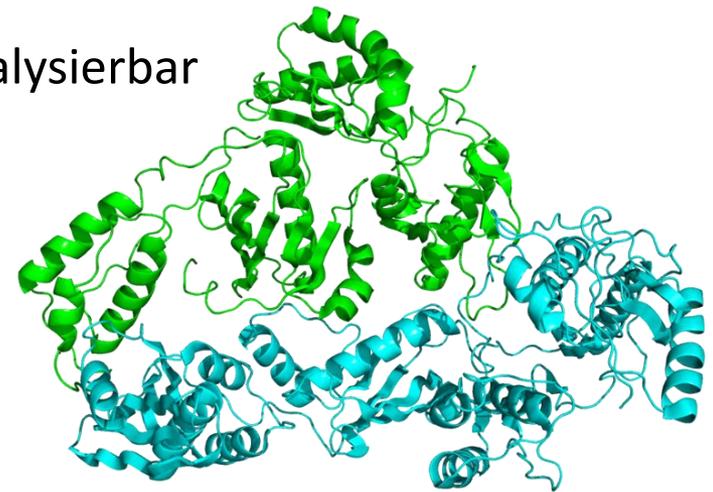
23S/16S Ratio in "A" = 1.65

23S/16S Ratio in "B" = 1.04

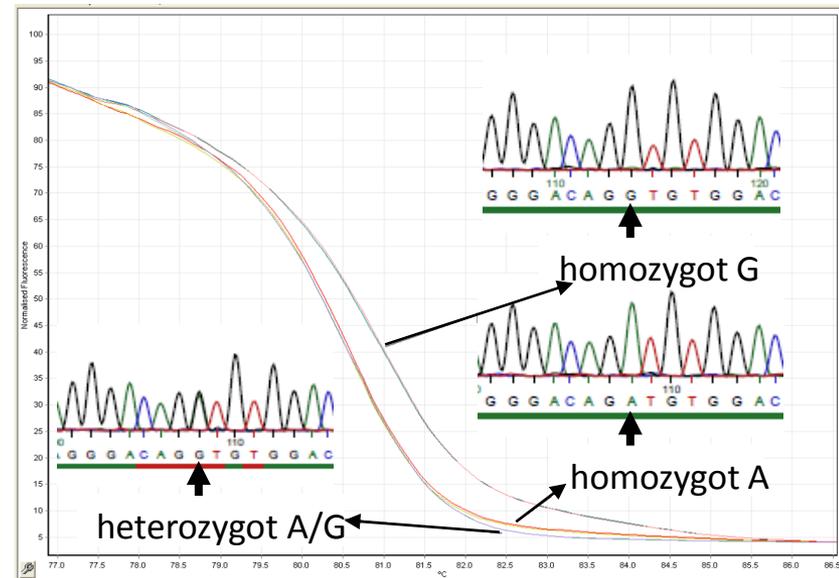
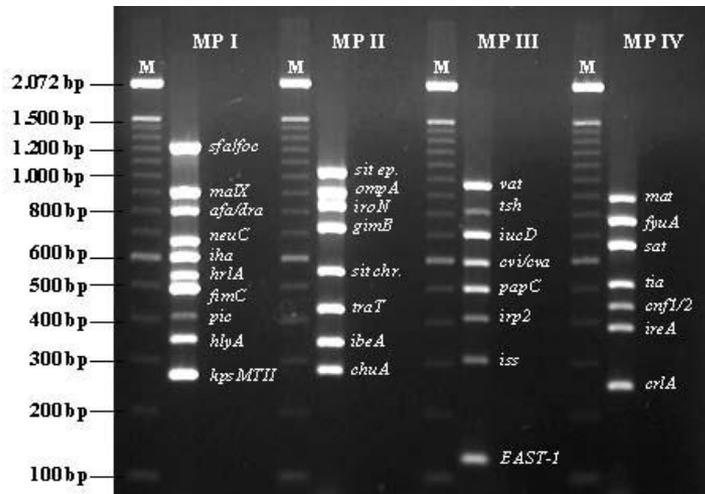
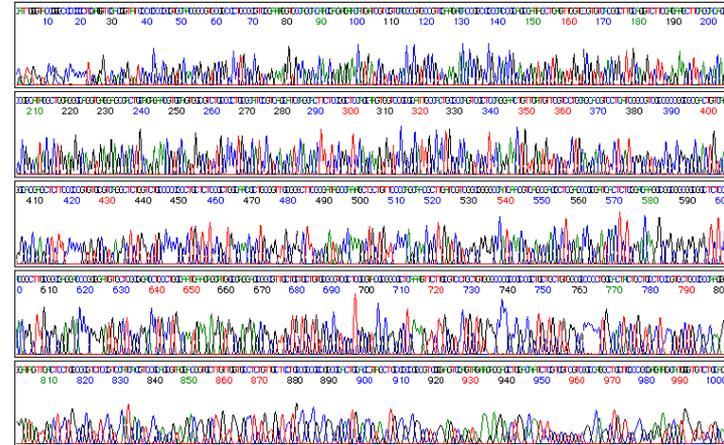
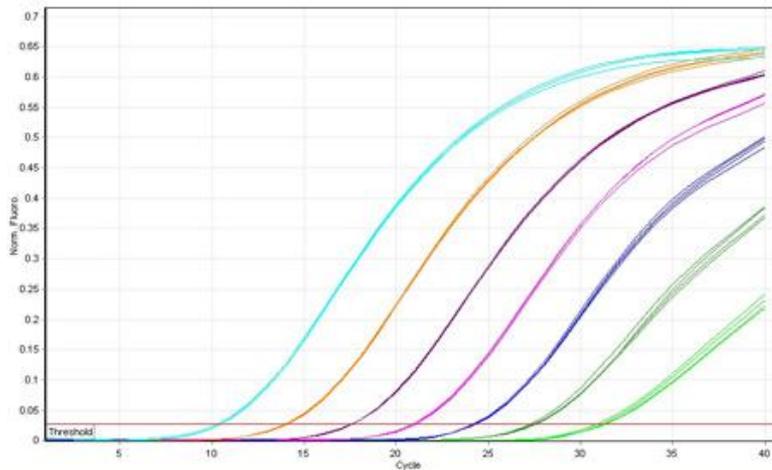
4. Schritt: cDNA-Synthese



- RNA muss in (copy)-DNA umgeschrieben werden
- Enzym: Reverse Transcriptase (RNA-Abhängige DNA-Polymerase)
- Letzter Schritt vor der Analyse
- Aminosäuresequenz eines Proteins genau analysierbar
- Auch in der Diagnostik (z.B. HIV) eingesetzt
- Meist mit kommerziellen Kits durchgeführt



5. Schritt: Analyse



Überblick



- I Geschichte
- II DNA
- III PCR-Grundlagen
- IV PCR-Techniken
- V PCR-Anwendungen**
- VI Anforderungen
- VII Diskussion



V

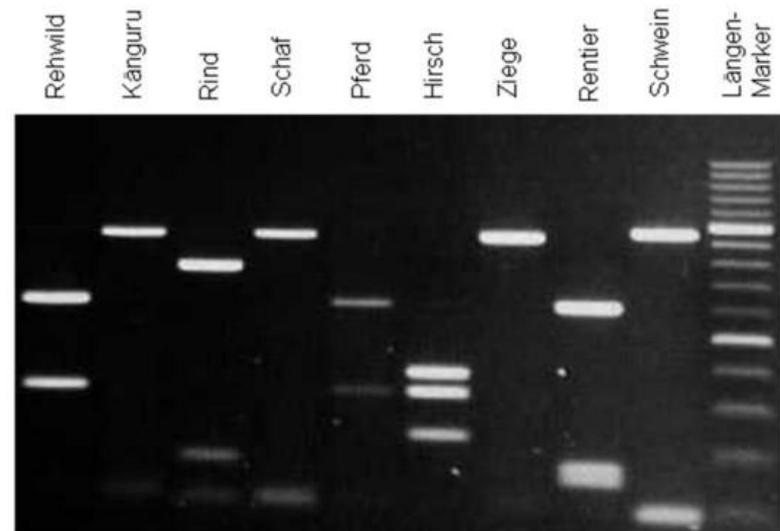
PCR-Anwendungen



Pferdefleischskandal



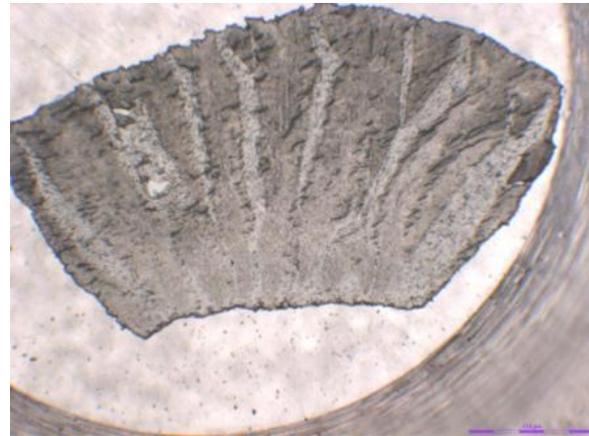
- Mit Pferdefleisch „kontaminierte“ Lebensmittel (nicht deklariert)
- Proben werden gezogen
- Extraktion & Analyse mit PCR
- Restriktionsverdau



Genexpressionsanalyse Darmzotten beim Broiler



- Probenziehung Darmabschnitte bei Schlachtung
- Konservierung in flüssigen Stickstoff
- In spezielles Medium einbetten
- Gewebebereich dissektieren
- Extraktion und Analyse



Analyse von SNPs

Beispiel: Zartheit von Rindfleisch



DNA-Extraktion



Lyse



Binden



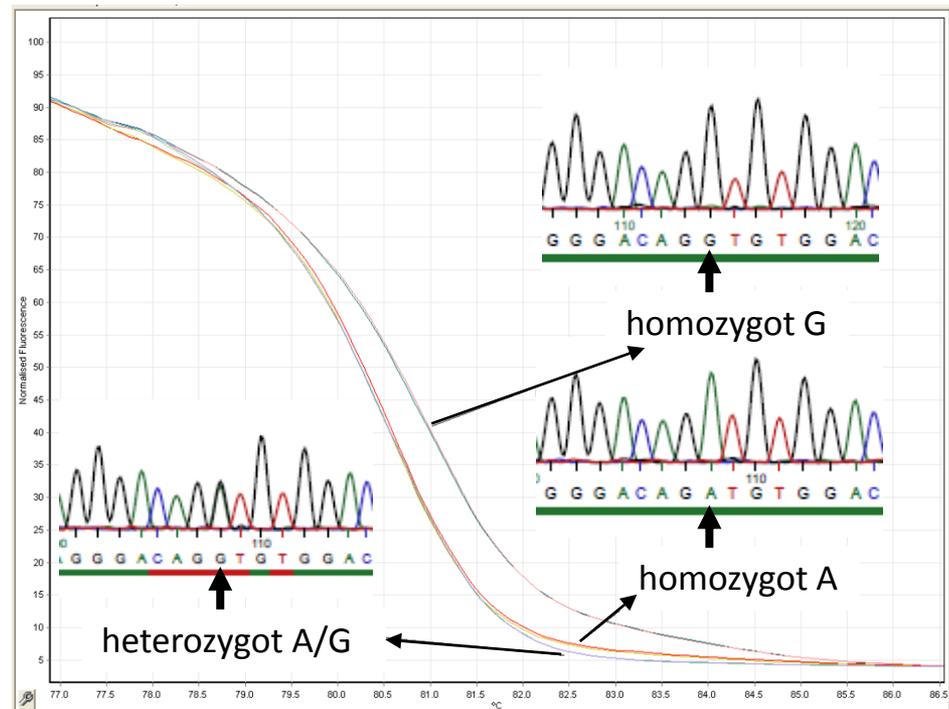
Waschen



Eluieren

SNPs in Protease μ -Calpain (Fleischreifung)

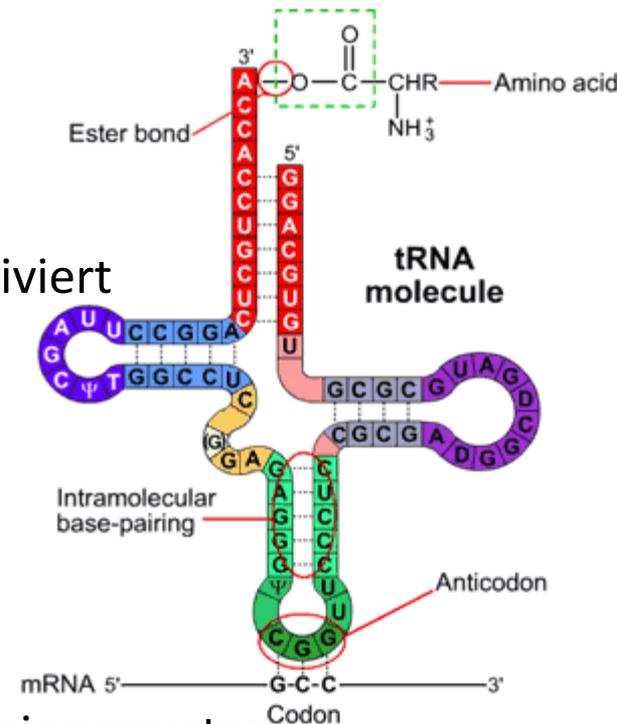
- qPCR inklusive High Resolution Melting (HRM)



RNA-Analytik



- Sehr schwierige auf zeitaufwendige Analysen
- Kontaminationsgefahr durch RNAsen sehr groß
 - RNAsen werden durch autoklavieren nicht inaktiviert
 - Behandlung mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)
- Wird hauptsächlich in der Zellbiologie angewandt
- Anwendungsfelder
 - *in-situ*-Hybridisierung zur Aufnahme von Expressionsmustern
 - Posttranskriptionelle Analysen



Pflanzlicher Bereich



- PCR- Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate- resistenten transgenen Pflanzen
- Qualitative PCR zum Nachweis transgener Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel oder Schädlingsresistenz
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von gentechnisch verändertem Mais
- Nachweis von Pflanzen-spezifischer DNA (Pflanzenarten-Nachweis)
- Nutzung eines molekularbiologischen Verfahrens für den Schaderreger-Nachweis an Pflanzen

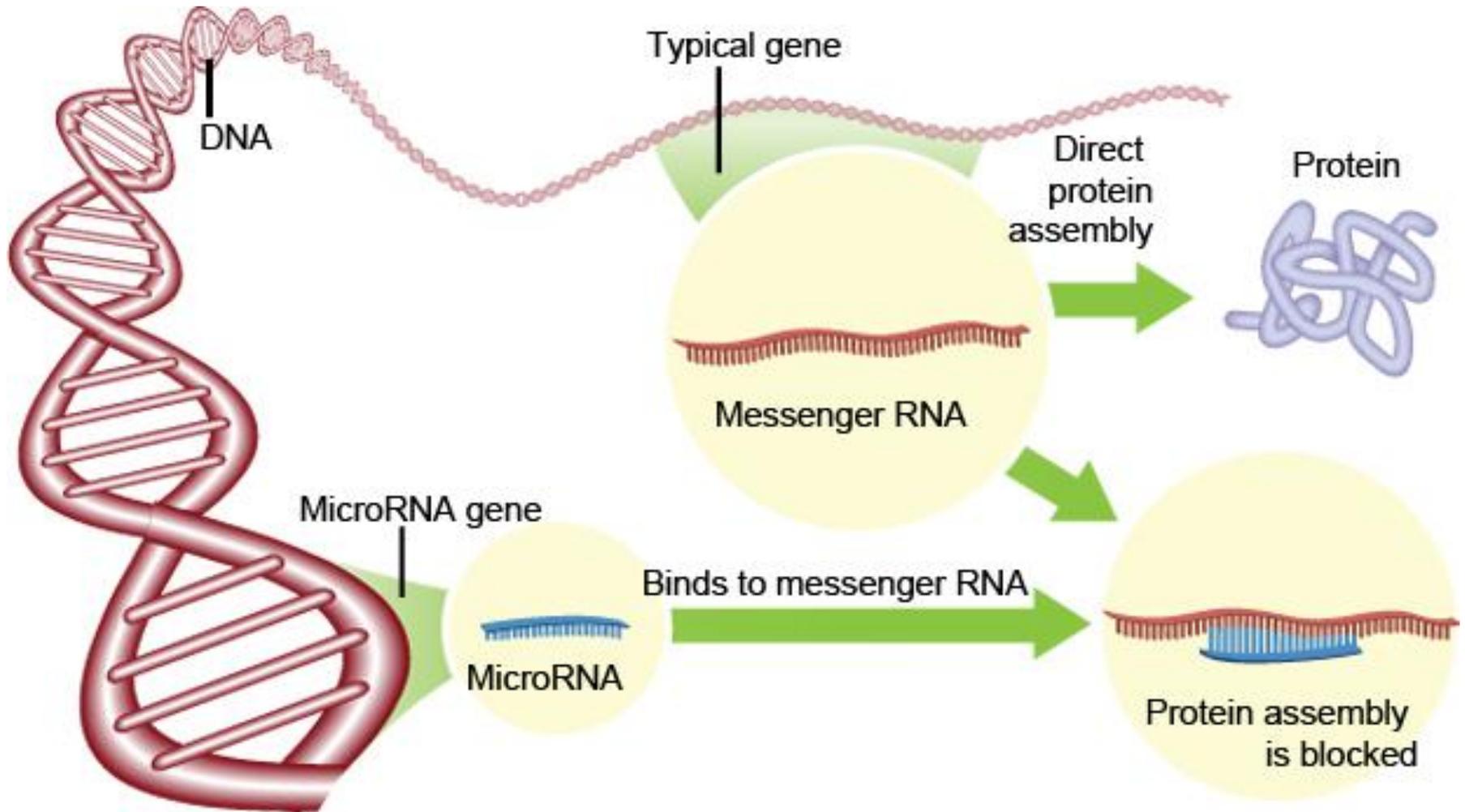
micro-RNA



- Kurze, hoch konservative, nicht kodierende RNAs
- Wichtige Rolle im komplexen Netzwerk der Genregulation (Gen-Silencing)
- Größe von rund 21 bis 23 Nukleotiden
- Sehr aktuelles Thema in der Zell- und Molekularbiologie
- Schwierige Handhabung (werden schnell degradiert)
- Zukunftshoffnung in der Stammzellenforschung



Überblick



Genmodulation

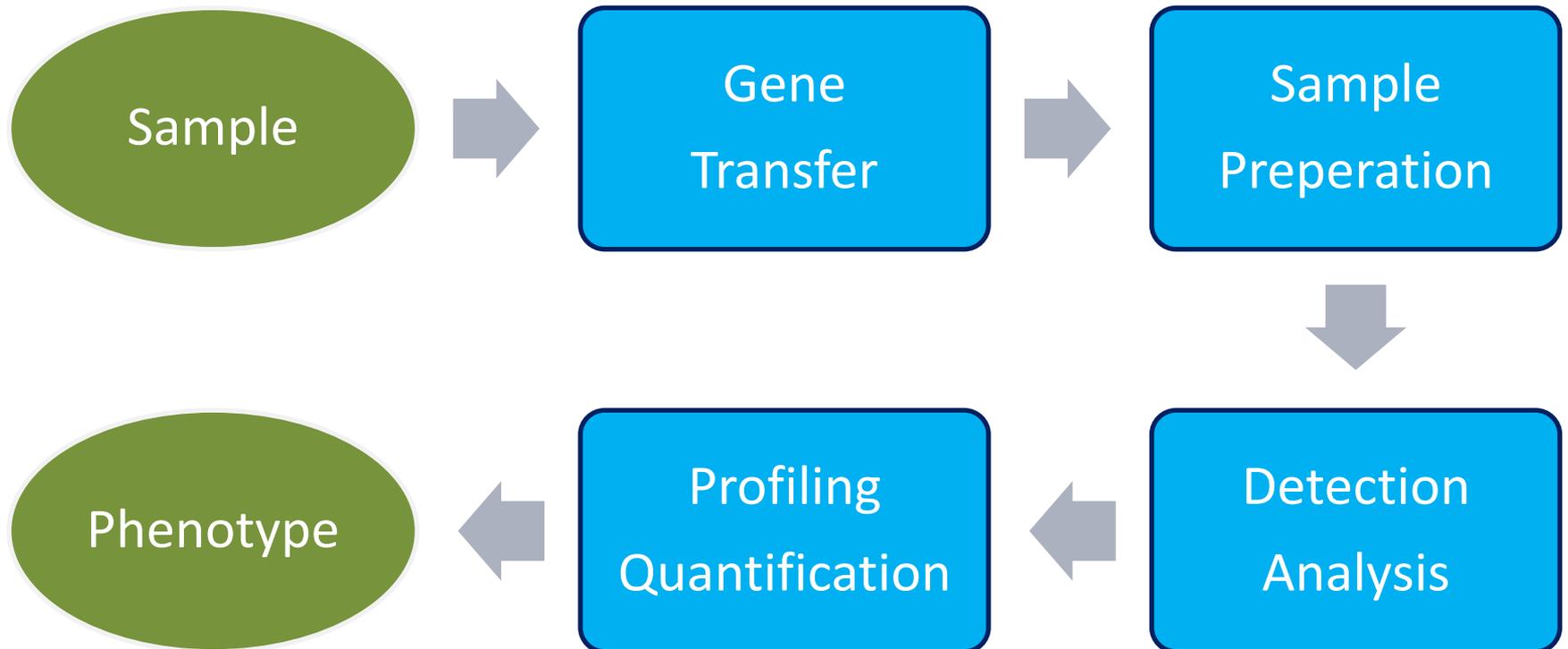


Modulation

Abwandeln, abändern, verändern

- Veränderung der Expression eines Gens
- Einführung eines Gens, das ein Protein „moduliert“
- Großer Anwendungsbereich in der Medizin → therapeutische Genmodulation

Genmodulation





- I Geschichte
- II DNA
- III PCR-Grundlagen
- IV PCR-Techniken
- V PCR-Anwendungen
- VI Anforderungen**
- VII Diskussion

Überblick

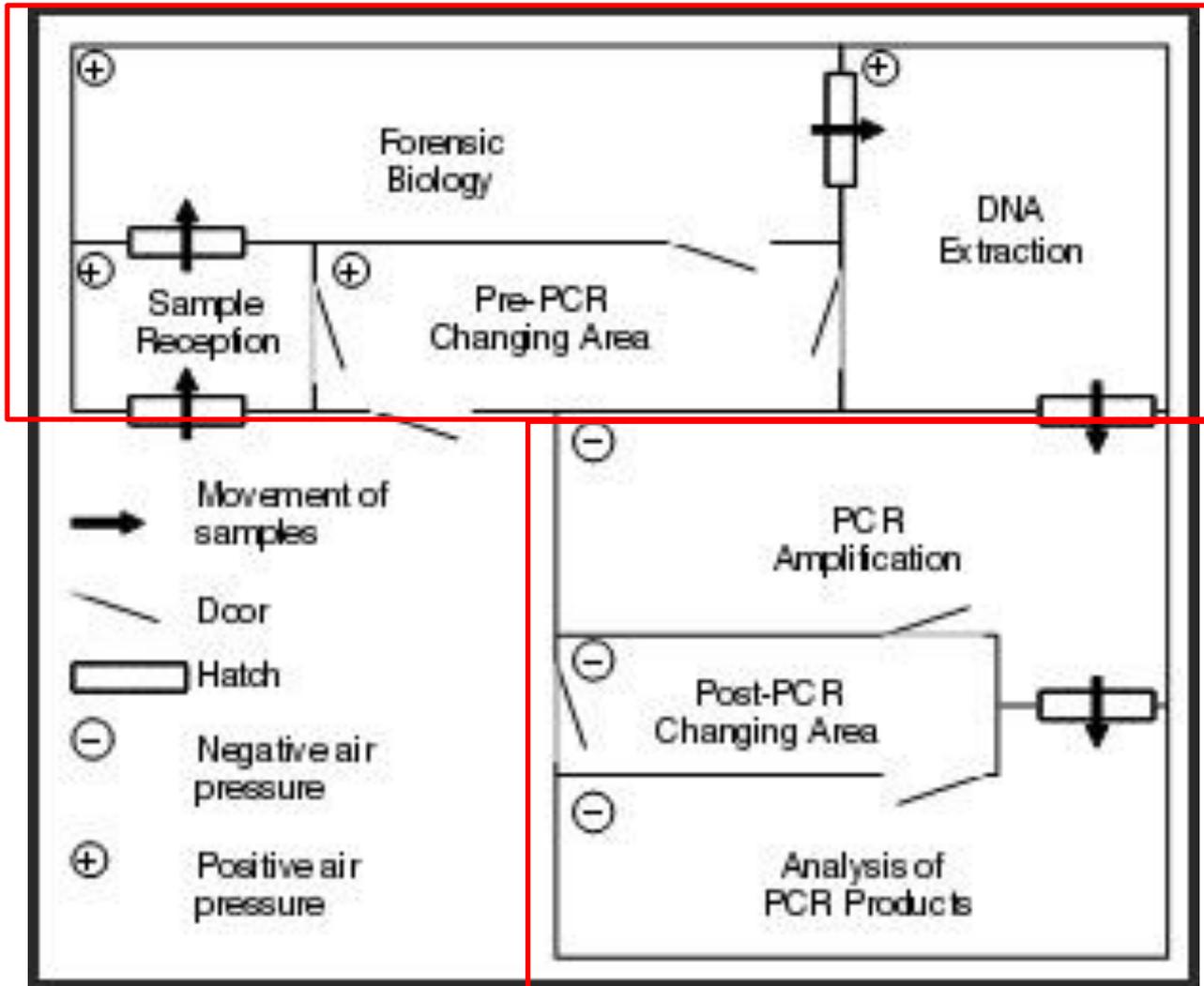


VI

Anforderungen



Räumlichkeiten



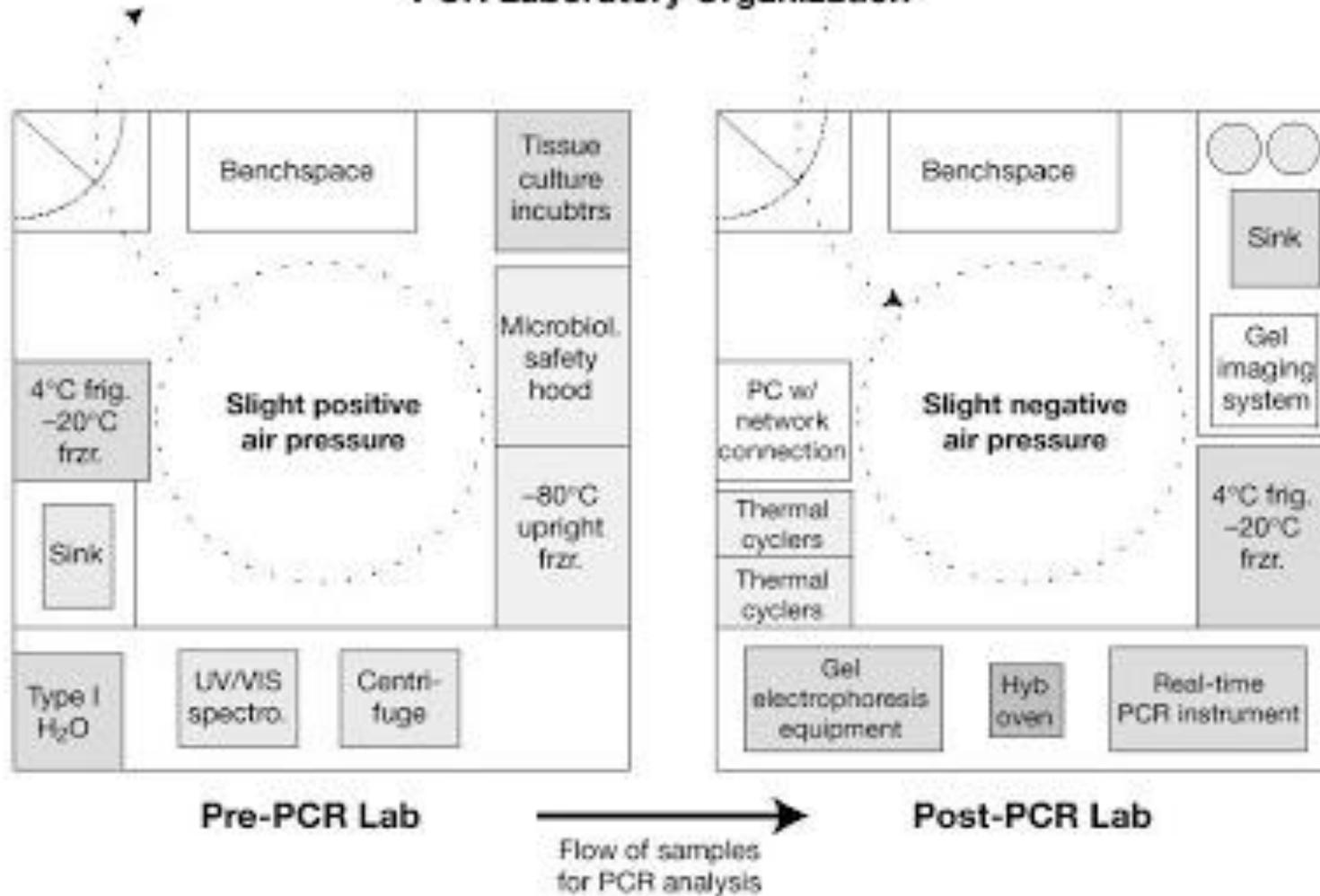
**Pre-PCR
Lab**

**Post-PCR
Lab**

Räumlichkeiten



PCR Laboratory Organization



Räumlichkeiten



- PCR ist sehr sensitiv → Kontaminationen vermeiden
- Arten der Kontamination
 - PCR-Produkte anderer Amplifikationen
 - „sample-to-sample“ Kontamination
 - Kontamination durch „fremde“ DNA (Personal,...)
- Räumliche Trennung (Pre-/Post-PCR lab)
- „Disposables“ verwenden



Personal



- Geschultes Fachpersonal
- Sauberes und genaues Arbeiten
- Belastbarkeit & Ausdauer → es funktioniert nicht alles bei ersten Mal
- Konzentrationsrechnungen MÜSSEN beherrscht werden
- FREUDE am Arbeiten



Grundausstattung



- Pipettensatz
(6-fach; rund € 150,- bis € 200,- pro Stück)



- Zentrifugen (ab € 750,-)



Grundausstattung



- Thermoblock (€ 2.300,-)



- Quantifizierung (€ 10.000,-)



Grundausrüstung



- PCR-Cycler (ab € 8.000,-)



Grundaustattung



- Tiefkühlschrank für Lagerung (-20°C bzw. -80°C)
- Arbeitsfläche
- Gasanschlüsse
- Abstellflächen
- Genügend Steckdosen
- Laptop für Steuerungen
- Verbrauchsmaterialien
 - Pipettenspitzen
 - Reaktionsgefäße (Eppis)
 - PCR-Gefäße
- Autoklav
- Eismaschine

Nice to have



- Homogenisator (€ 7.000,-)



- PCR-Werkbank (€ 2.500,-)



Nice to have



- Pipettierroboter (€ 30.000,-)



- Automatische Elektrophorese (€ 10.000,-)



Nice to have



Kosten



Probennahme

- RNA-Stabilisierung: € 3,-

Aufreinigung

- Aufreinigungskit: € 7,-

cDNA-Synthese

- Synthesekit: € 6,-

Analyse

- PCR-Kit (+ Primer): € 10,-



VII

Diskussion



Einführung in den Unterricht



Anwendungsmöglichkeit(en)



Grenzen der PCR



Noch Fragen?





Universität für Bodenkultur Wien
Interuniversitäres Department für
Agrarbiotechnologie Tulln

Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit!

