

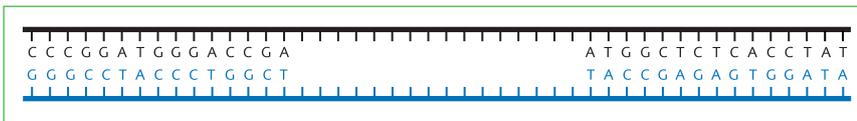
Genetik | PCR-Polymerasekettenreaktion

Polymerasekettenreaktion

DNA-Typing, DNA-Profilung oder DNA-Fingerprinting – Synonyme für die Anwendung der PCR – wird in der Gerichtsmedizin, Anthropologie und Biologie nicht nur dazu genutzt, die Identität eines Individuums zu bestimmen, sondern auch, um Verwandtschaftsbeziehungen nachzuweisen. Die Methode hat geholfen, unschuldige Tatverdächtige wieder auf freien Fuß zu setzen, Kinder mit ihren Verwandten zusammenzuführen und die sterblichen Überreste von Opfern einer Naturkatastrophe zu identifizieren.

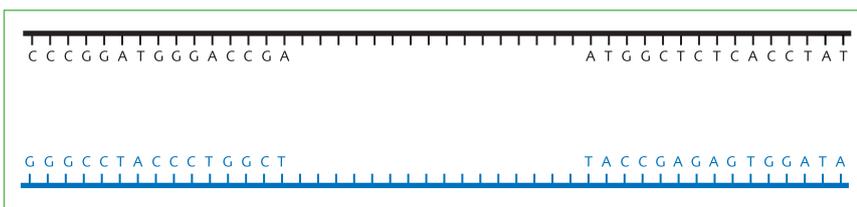
Dieses Verfahren wurde von KARY MULLIS 1980 entdeckt und 1990 mit dem Nobelpreis geehrt, als er eine Methode suchte, DNA zu reinigen. Dabei kam ihm die Idee der Vervielfältigung von DNA durch ein zyklisches Verfahren, bei dem das Produkt wiederholt als Substrat eingesetzt wird.

Die DNA-Probe



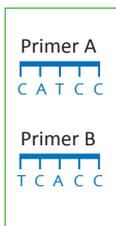
- DNA liegt in der Natur nicht frei vor, sondern muss in der Regel von Zellbestandteilen und Histon-Proteinen befreit werden.
- Freie DNA liegt als Doppelstrang vor.

Denaturierung – Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges



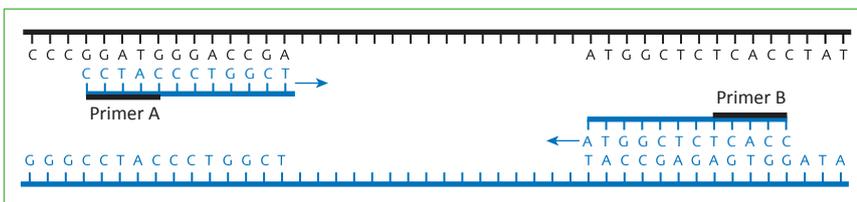
- Die DNA wird auf **94 °C** erhitzt.
- Dabei denaturieren die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren.
- Die DNA „schmilzt“ in zwei Einzelstränge auf.

Annealing – Die Primer können jetzt anlagern – dem Master-Mix von Anfang an zugesetzt



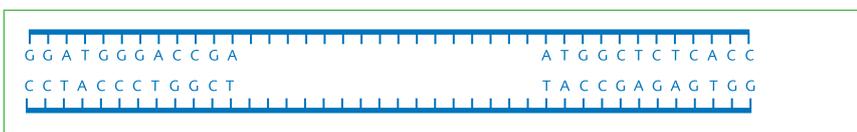
- Zur Vervielfältigung der DNA wird ein Master-Mix aus drei Komponenten zugesetzt. Eine besteht aus zwei artspezifischen **Primern**, künstlich hergestellten DNA-Sonden, die als Starter je nach Größe bei **40 - 60 °C** an die komplementären Stellen der Einzelstränge anlagern können. Dieser Vorgang heißt Annealing. Der Ansatz wird entsprechend heruntergekühlt.
- Die zweite besteht aus **Nukleotiden**, den vier Einzelbausteinen der DNA aus einer phosphorylierten Ribose und je einer der vier Basen A (Adenin), T (Thymin), G (Guanin) und C (Cytosin).
- Die dritte Komponente ist die **DNA-Polymerase**, die die passenden Nukleotide zu einem neuen, komplementären DNA-Strang verknüpfen soll.

Elongation – die Ergänzung der beiden DNA-Stränge



- Das DNA-Gemisch wird auf **72 °C** erwärmt, der optimalen Temperatur der *Taq*-Polymerase. Sie wurde aus dem Archaen *Thermophilus aquaticus* gewonnen und ist hitzestabil.
- Die komplementär angelagerten Nukleotide werden mithilfe der Polymerase verknüpft.

Die Target-DNA – das milliardenfache Ziel der PCR



- Dann wiederholt sich dieser Zyklus mit Master-Mix: Erhitzen, Abkühlen, Erwärmen, Erhitzen ...
- Schon nach dem zweiten Zyklus der Elongation entstehen DNA-Stücke, die von den beiden Primer-Anlageungsstellen eingerahmt sind, nach n Zyklen Milliarden Kopien.