4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Heil dem Wasser! Heil dem Feuer!
Heil dem seltnen Abenteuer!

Eigentlich gehört die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in das Kapitel Werkzeug, doch ist sie momentan sicherlich DIE Methode der Molekularbiologie und wird es auch noch auf absehbare Zeit bleiben. Grund genug, ihr ein eigenes Kapitel zu widmen.
Das Prinzip ist herrlich einfach und nachträglich fragt man sich, weshalb die Methode nicht schon viel früher erfunden wurde. Die Antwort lautet vielleicht, dass man vorher nicht gewusst hätte, was man damit anfangen soll. Denn seit den Anfängen 1985 (Saiki et al.) entdecken findige Köpfe permanent neue Anwendungen. Noch aus einem anderen Grund ist die PCR sich allgemeiner Aufmerksamkeit gewiss: Sie ist ziemlich rasch zum Übungsfall für die Wirtschaft geworden. Nie zuvor hat ein Patent in der Molekularbiologie so große Diskussionen ausgelöst, ging es doch um den Eingriff des Patentrechts in die Freiheit der Forschung.[55] Die Gemüter haben sich inzwischen beruhigt, weil das Patent, solange es gültig war,[56] die Enzymeinkäufe zwar etwas verteuert hat, aber sonst alles beim Alten blieb.

4.1 Die Standard-PCR

Alles, was man für eine PCR braucht, sind eine thermostabile DNA-Polymerase, ein wenig Ausgangs-DNA (***template***) und zwei passende Oligonucleotidprimer. Puffer und Nucleotide dazu, das Tube in die PCR-Maschine gestellt und los geht's. Klingt simpel, wie alles, was der Experimentator anfängt, und stellt sich im Laufe der Zeit als sauschwierig heraus, wie alles im Leben. Fangen wir damit an, wie es theoretisch funktioniert und erläutern anschließend, weshalb es nicht klappt.

Das typische PCR-Programm besteht aus einem **Denaturierungsschritt**, einem **Annealingschritt** und einem **Elongationsschritt**. Denaturiert wird bei 94 ℃, dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wird die Temperatur auf 55 ℃ gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im massiven Überschuss vorhandenen Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf 72 ℃, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Weil die Komplementierung an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, hat man in einem Zyklus die Zahl der Template-DNAs verdoppelt. Wiederholt man den Zyklus, hat man anschließend die vierfache Menge usw.

---

55. So zumindest hat man es damals dargestellt. Tatsache ist, dass viele die eher schlechten Gehälter in der universitären Forschung gerne kompensieren, indem sie sich für etwas Besseres halten. Und wieso sollten sich die Guten an Patente halten müssen - insbesondere wenn diese in den Händen der Bösen liegen?
56. Das Patent für die native Taq-Polymerase wurde 2001 für ungültig erklärt, das Patent für die PCR-Technologie lief 2005 aus.

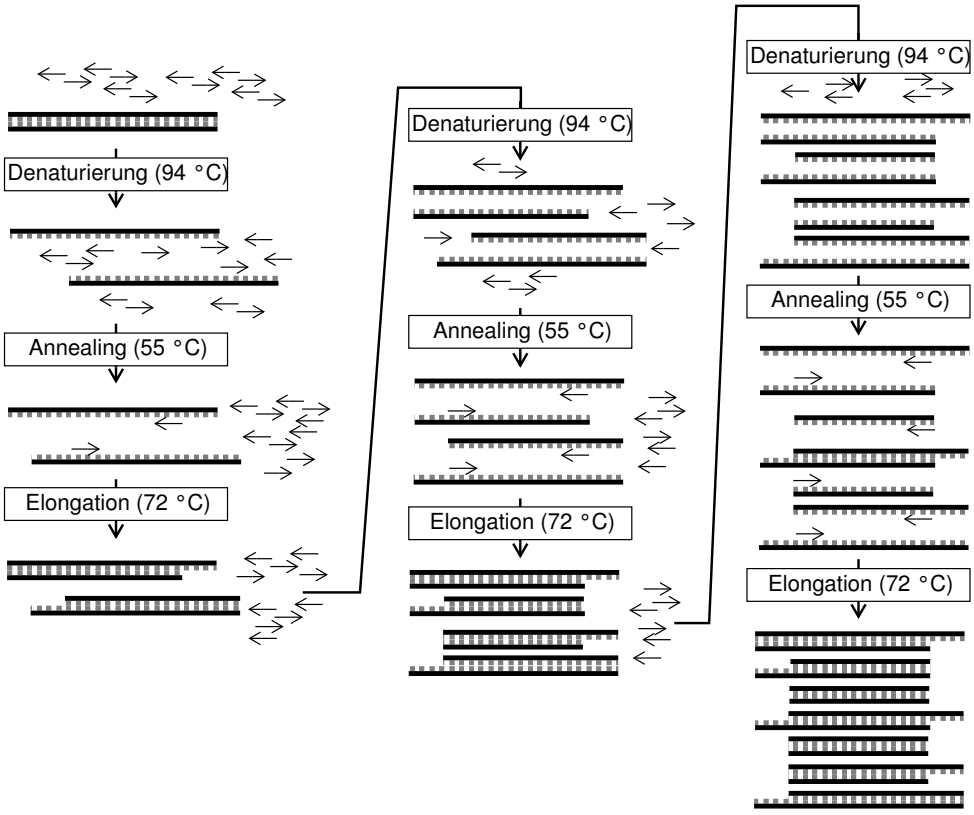

Abb. 19: Das PCR-Prinzip.
1. Schritt (Denaturierung): Die Template-DNA wird auf 94 °C erhitzt, die beiden Stränge trennen sich.
2. Schritt (Annealing): Die Temperatur wird gesenkt, um den Primern Gelegenheit zu geben, an die DNA zu hybridisieren.
3. Schritt (Elongation): Die Temperatur wird auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht, um eine optimale Zweitstrangsynthese zu erlauben. Am Ende eines Zyklus ist die DNA-Menge (nahezu) verdoppelt worden.
An den drei dargestellten Zyklen kann man bereits einige Probleme der PCR erkennen: a. Bei den ersten Zyklen entstehen zumeist längere Produkte als erwartet. Die DNA-Fragmente der erwarteten Länge nehmen erst nach vier bis fünf Zyklen überhand. b. Eine Amplifikation findet nur statt, solange eine ausreichende Menge an Nucleotiden und Primern vorhanden ist. c. Nimmt die Konzentration an Amplifikationsprodukten zu, kommt es immer häufiger vor, dass diese miteinander statt mit Primern hybridisieren. Die Vermehrungsrate je Zyklus nimmt daher gegen Ende der PCR stark ab, eine weitere Amplifikation findet auch in Anwesenheit von Primern und Nucleotiden kaum noch statt.

Die Mutter aller PCR-Programme sieht folgende Bedingungen vor: Eine initiale Denaturierung von 5 min bei 94 ˚C, dreißig Zyklen bestehend aus jeweils 30 sec bei 94 ˚C, 30 sec bei 55 ˚C und 90 sec bei 72 ˚C, und zu guter Letzt eine finale Elongation von 5 min bei 72 ˚C, um ganz sicher zu gehen, dass die Polymerase ihre Arbeit beendet. Anschließend wird die Reaktion auf 4 ˚C gekühlt, bis sich jemand findet, der das Tube aus der Maschine nimmt. Dieses Protokoll wird noch heute von vermut-

lich Hunderttausenden benutzt und funktioniert prinzipiell ganz gut. Man kann's allerdings, mit etwas Überlegung und Übung, noch verbessern.
Nun zu den kritischen Punkten:

- Die **Denaturierung**. Einerseits ist die Denaturierung ein sehr schneller Prozess, der bereits bei Temperaturen ab 70 °C beginnt. Andererseits leiden alle Komponenten unter der Hitze: die Polymerase wird denaturiert, die Nucleotide zerfallen und Template-DNA wie Primer werden depuriniert. Ausreichend Argumente, um die Denaturierungszeiten so kurz wie möglich zu halten. Tatsächlich reichen Zeiten von fünf Sekunden aus, um die DNA-Stränge voneinander zu trennen. Glücklich, wer eine PCR-Maschine besitzt, die die Temperatur im Tube misst oder zumindest errechnet (z.B. Perkin-Elmer). Alle anderen müssen sich mit Schätzwerten behelfen. Zur Orientierung: Ein mit Öl überschichteter 50 µl-Ansatz benötigt ca. 20 Sekunden, bis er die Temperatur des Heizblocks erreicht hat.

- Die **Annealingtemperatur**. Sie richtet sich hauptsächlich nach den Primern, die man verwendet. Mittlerweile gibt es etliche Programme auf dem Markt, die einem nicht nur die (theoretische) Schmelztemperatur (T_m) des Primers errechnen, sondern auch potentielle Sekundärstrukturen ermitteln (siehe unten).
  Für die Berechnung der Schmelztemperatur existieren verschiedenste Gleichungen. Sie sind unterschiedlich gut und unterschiedlich einfach zu handhaben. In der einfachsten Variante berechnet man die T_m näherungsweise aus dem GC-Gehalt des Primers:
  (Gl. 1)

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$$

  Sie ist allerdings nur für kurze Primer mit einer Länge um 20 Basen brauchbar. Eine bereits deutlich ausgefuchstere und mühsamer zu berechnende Gleichung stammt von Baldino et al. (1989) und ist eigentlich entwickelt worden, um die Schmelztemperatur von Oligonucleotiden unter den Bedingungen der in-situ-Hybridisierung zu bestimmen.
  (Gl. 2)

$$T_m = 81{,}5 + 16{,}6 \times (\log_{10} [J^+]) + 0{,}41 \times (\%\ G+C) - (675/n) - 1{,}0 \times (\%\ \text{Fehlpaarungen}) - 0{,}63 \times (\%\ FA)$$

  (J = Konzentration monovalenter Kationen in Mol/l, % G+C = Anteil der Basen Guanin und Cytosin in Prozent, n = Anzahl der Basen im Oligonucleotid, % mismatch = Anteil der fehlgepaarten Basen in Prozent, % FA= Anteil des Formamids im Puffer in Prozent, entfällt normalerweise bei der PCR)

  Gleichung 2 gilt für Kationenkonzentrationen bis 0,5 M, GC-Gehalte zwischen 30 und 70 % und Oligonucleotidlängen bis 100 Basen. Der Nachteil: Für Oligonucleotide unter 30 Basen Länge ist sie nicht sonderlich brauchbar. Die nach derzeitigem Stand der Dinge anerkannteste Methode ist die *nearest-neighbour* Methode, in Anlehnung an Breslauer et al. (1986). Sie beruht auf der Beobachtung, dass die Schmelztemperatur nicht nur von der Basenzusammensetzung, sondern auch von der Sequenz des Oligonucleotids abhängen, weil sich benachbarte Basen gegenseitig beeinflussen. Dieses Verfahren ist am genauesten, lässt sich aber von Hand nicht mehr bewältigen. Zum Glück errechnet einem heute praktisch jedes Programm, das Sequenzen oder Primer analysiert, auch die Schmelztemperatur einer Sequenz.
  Die Schmelztemperatur alleine bringt's allerdings noch nicht, weil sie nur Auskunft darüber gibt, bei welcher Temperatur 50 % des Primers nicht mehr an das Template bindet, nicht aber, ab wann der Primer zuverlässig hybridisiert. Die Annealingtemperatur sollte man daher 5-10 Grad niedriger ansetzen. Eine hübsche, wissenschaftlichere Auseinandersetzung mit dem Thema findet sich bei Rychlik et al. (1990), die zu dem Schluss kommen, dass die optimale Annealingtemperatur vom Pri-

mer und dem amplifizierten Fragment abhängt. Sie haben daraus die folgende Gleichung entwickelt: (Gl. 3)

$$T_a^{opt} = 0{,}3 \times T_m^{Primer} + 0{,}7 \times T_m^{Produkt} - 14{,}9$$

($T_m^{Produkt}$ ermittelt man aus Gleichung 2). Weil erfahrungsgemäß viele am Anfang Probleme mit der Gleichung haben, folgt ein kleines Rechenbeispiel:

Ein 632 bp langes Fragment mit einem GC-Gehalt von 45 % wird in einem Puffer mit 50 mM KCl amplifiziert. Die beiden Primer haben eine Schmelztemperatur von 55,3 °C und 48,6 °C.

$T_m^{Produkt}$ = 81,5 + 16,6 (log 0,05) + 0,41 x 45 - (675/632) = 77,3 °C
T_a^{opt} = 0,3 x 48,6 + 0,7 x 77,3 -14,9 = **53,8 °C**

Diese Gleichung ist sicherlich die beste derzeit verfügbare, gibt aber auch keine hundertprozentig zuverlässigen Werte. Es hilft nichts, die optimale Annealingtemperatur muss man im Zweifelsfall empirisch bestimmen. Am einfachsten geht das, indem man eine **Gradienten-PCR** durchführt, sofern man Zugang zu einer PCR-Maschine hat, die in der Lage ist, auf dem Thermoblock einen Temperaturgradienten zu erzeugen. Auf diese Weise kann man in einem einzigen Lauf eine ganze Reihe von verschiedenen Annealing-Temperaturen austesten und sich so schnell an die optimale Temperatur herantasten. Ein wenig Vorsicht ist allerdings angesagt, weil die Temperaturverteilung im Thermoblock häufig nicht so uniform ist, wie der Hersteller es anpreist. Wenn's präzise sein soll, führt man besser zwei PCRs durch, die erste mit einem "steileren" Gradienten (d.h. einer größeren Temperaturdifferenz zwischen der linken und der rechten Blockseite, z.B. 15 oder 20 °C) und die zweite mit einem "flacheren" Gradienten, der sich auf den Temperaturbereich beschränkt, der im ersten Versuch die besten Ergebnisse geliefert hat.
Maschinen für die Gradienten-PCR findet man bei Eppendorf, Stratagene und Biometra. Applied Biosystem bietet ein Gerät mit sechs kleinen Blöcken (VeriFlex™ Blocks) an, deren Temperaturen individuell eingestellt werden können.

- Die **Elongationszeit**. Die Elongationszeit sollte an die Länge des erwarteten Produkts angepasst sein. Ist sie zu kurz, kann die Polymerase ihren Job nicht beenden. Ist sie zu lang, bleibt ihr zu viel Zeit für Unsinn. Üblicherweise rechnet man 0,5-1 min je kb Länge, wenn Taq verwendet wird, 2 min je kb bei Verwendung von Pfu.

- **Ölüberschichtung**. Bei klassischen PCR-Maschinen muss man den Ansatz mit etwas Mineral- oder Paraffinöl überschichten, um ein Verdunsten des Tubeinhalts zu vermeiden (die Flüssigkeit kondensiert sonst am Tubedeckel). Fast alle neueren Maschinen besitzen mittlerweile einen Heizdeckel, der den Tubedeckel auf über 100 °C erhitzt und so eine Kondensation verhindert, dies erspart die Verwendung von Öl und vereinfacht so die Handhabung. Aber Achtung: Eine Verdunstung findet trotzdem statt. Die Tröpfchen sammeln sich dann an der Seitenwand des Tubes an, im Bereich zwischen Heizblock und Heizdeckel. Während dies bei größeren Versuchsvolumina kein Problem darstellt, können sich bei kleineren Volumina (< 20 µl) die Konzentrationsverhältnisse stark verändern und so eine erfolgreiche Amplifikation verhindert werden. Daher sollte man in diesen Fällen auch mit Heizdeckel den Ansatz mit Öl überschichten.
Und noch einen nicht zu unterschätzenden Vorteil hat die Ölüberschichtung: Die Tubes überstehen auch monatelange Lagerung im Kühlschrank völlig problemlos, wo normale Ansätze im Laufe der Zeit verdunsten und am Ende eintrocknen.

- Das **Template**. Je besser die Qualität der Template-DNA ist, desto schöner. Das Faszinierende an der PCR ist jedoch, dass sie manchmal auch funktioniert, wenn man es ihr gar nicht zutraut. Hier eine keineswegs vollständige Auswahl von Templates, die funktionieren: Plasmid-DNA, Cosmid-DNA, Phagen-DNA, DNA aus früheren PCRs, genomische DNA, cDNA, Bakterien (aus der Kolonie direkt

durchschnittlicher Vermehrungssfaktor V je Zyklus	**2**	**1,8**	**1,7**	**1,60**	**1,50**
Vermehrung nach 10 Zyklen	10^3	357	201	110	58
20 Zyklen	10^6	$1{,}3 \times 10^5$	$4{,}1 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^4$	$3{,}3 \times 10^3$
30 Zyklen	10^9	$4{,}6 \times 10^7$	$8{,}2 \times 10^6$	$1{,}3 \times 10^6$	$1{,}9 \times 10^5$
40 Zyklen	10^{12}	$1{,}6 \times 10^{10}$	$1{,}6 \times 10^9$	$1{,}5 \times 10^8$	$1{,}1 \times 10^7$

Tab. 9: Vermehrung von DNA im PCR-Tube.
Kleine Ursache, große Wirkung: Schon geringe Änderungen bei der durchschnittlichen Vermehrungsrate je Zyklus machen sich bei der Ausbeute deutlich bemerkbar. Die DNA-Menge am Ende der Amplifikation errechnet sich aus der Gleichung

$$X = x \cdot V^n$$

(x = Anfangsmenge, V = Vermehrungsfaktor je Zyklus, n = Anzahl der Zyklen).

in das Tube), Phagen (Eluate aus einzelnen Plaques), DNA in Polyacrylamidgel-Stückchen usw. usw. Prinzipiell ist nichts zu krude, um nicht doch noch als Template dienen zu können – im Zweifelsfall einfach ausprobieren.

- Der **Multiplikationsfaktor**. Wo man auch nachliest, überall wird einem erklärt, die Anzahl an DNA-Molekülen würde sich von Zyklus zu Zyklus verdoppeln. Schön wär's, denn auf diese Weise würden aus einem Template-Molekül binnen dreißig Zyklen etwa eine Milliarde, nach vierzig Zyklen sogar eine Billion; bei einer Länge von 1 kb macht das die stolze Menge von immerhin 1 µg DNA. Dem ist – natürlich – nicht so. Tatsächlich liegt der durchschnittliche Multiplikationsfaktor je Zyklus irgendwo bei ca. 1,6 bis 1,7, manchmal etwas darunter, manchmal etwas darüber. Der Unterschied erscheint klein, entscheidet aber am Ende der PCR über Ge- oder Misslingen. Dabei ist die Situation in Wahrheit viel komplizierter, weil die Vermehrungsrate zu Beginn der PCR geringer ist, vermutlich weil die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Enzym zur rechten Zeit am rechten Ort treffen, vergleichsweise gering ist. Sie steigt dann mit zunehmender Templatemenge an, verringert sich aber gegen Ende der Reaktion wieder, weil die Vermehrung zunehmend durch Pyrophosphat, zerbröselnde Nucleotide und rehybridisierendes Produkt gehemmt wird.

- Die **Templatemenge**. Zwar reicht theoretisch ein einziges Templatemolekül bereits aus, um den Experimentator glücklich zu machen, doch braucht man in der Praxis wenigstens 10 000 Template-DNAs, um problemlos zu amplifizieren. Die Umrechnung der Anzahl von Molekülen in DNA-Mengen fällt vielen schwer, daher kann man sich mit folgenden Richtwerten behelfen: 100 000 Moleküle Template-DNA entsprechen ca. 0,5 pg Plasmid-DNA, 300 ng menschlicher genomischer DNA oder der cDNA von 1 µg Gesamt-RNA. In den meisten Fällen können diese Mengen deutlich unterschritten werden, auf keinen Fall aber sollte man zu große Mengen an Template einsetzen – das Ergebnis könnte genau das Gegenteil dessen sein, was man erreichen will. Die Wahrscheinlichkeit für ein Fehlannealing steigt und die Reaktion kann zu früh in die Sättigung geraten, mit unangenehmem Effekt für die Qualität des Produkts.

Eine interessante Idee ist die Wiederverwendung von Template-DNA, wie sie von Sheikh und Lazarus (1997) publiziert wurde. Die Autoren beschreiben, wie sie Stücke ungeladener Nylonmembranen (Duralon-UV Membran, Stratagene), auf die zuvor DNA geblottet wurde, als PCR-Template verwenden. Ein solches Template ist mehrfach verwendbar, doch ist die Amplifikation längerer Fragmente (> 850 bp) eher unbefriedigend.

- Der **Puffer**. Die Taq-Polymerase hat ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH oberhalb von 8. Angesichts dessen wurde zeitweise viel mit verschiedenen Puffern herumexperimentiert, offenbar ohne durchschlagenden Erfolg, weil noch heute die Leib- und Magen-Puffersubstanz der Molekularbiologen verwendet wird, obwohl Tris-HCl eigentlich denkbar ungünstig ist für diesen Zweck. Ausgerechnet dieser Puffer ändert seinen pH sehr stark in Abhängigkeit von der Temperatur (Δ pK_a von -0,021/°C), so dass der häufig verwendete Puffer mit pH 8,3 bei 20 °C während der PCR einen pH von 7,8 bis 6,8 (!) aufweist – für die Aktivität der Taq-Polymerase eher ungünstig. Häufig wird deshalb ein Tris-Puffer von pH 8,55 oder gar 9,0 verwendet.

- Bei den **Salzen** ist die Auswahl etwas größer. Man verwendet KCl (bis zu 50 mM) oder $(NH_4)_2SO_4$ (bis zu 20 mM). Es lohnt sich unter Umständen, die optimale Salzkonzentration auszutesten. So steigt beispielsweise die Ausbeute bei der Verwendung von KCl im Bereich zwischen 10 und 50 mM langsam an, um bei Konzentrationen über 50 mM drastisch zu fallen. NaCl hemmt die Amplifikation.

- Die **$MgCl_2$-**Konzentration. Mg^{2+} beeinflusst Primerannealing, Trennung der Stränge bei der Denaturierung, Produktspezifität, Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate. Außerdem benötigt das Enzym für seine Aktivität freies Mg^{2+}. Weil Primer, Nucleotide und eventuell vorhandenes EDTA Mg^{2+} wegfangen, muss eigentlich für jede PCR die optimale Mg^{2+}-Konzentration ermittelt werden – sie liegt normalerweise zwischen 0,5 und 2,5 mM. In den meisten Fällen wird man mit 2 mM erfolgreich sein; für den Fall, dass nicht, lohnt es sich allerdings, die Konzentration zu optimieren – in manchen Fällen ist das Fenster der optimalen Mg^{2+}-Konzentration sehr klein. Pwo und Tfl bevorzugen übrigens $MgSO_4$.

- Die **Zusätze**. Wenn die PCR nicht funktioniert wie sie sollte und eine Veränderung der Mg^{2+}-Konzentration nicht den gewünschten Effekt bringt, kann man's mit verschiedenen Zusätzen versuchen. Dimethylsulfoxid (DMSO) (5 bis 10 % v/v), Betain (N,N,N-Trimethylglycin) (1 M) und Formamid (bis 5 % v/v) können die Spezifität steigern und die Amplifikation von GC-reichen Sequenzen erleichtern, Glycerin (10-15 % v/v), PEG 6000 (5-15 % w/v), Tween®20 (0,1-2,5 % v/v), Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) (50 mM) und das *Single-Strand Binding Protein* (SSB) von *E.coli* (60 ng/20 µl Reaktionsvolumen) (siehe Chou 1992) können die Reaktion beschleunigen. Eine Regel, was man wann am besten verwendet, gibt es nicht – man muss es, ob man will oder nicht, ausprobieren. Die Zusätze können übrigens auch kombiniert werden (z.B. 5 % DMSO + 1 M Betain).
  Heparin (> 5 u), SDS (> 0,01 %), Nonidet®P40 (> 5 %) und Triton®X-100 (> 1 %) hemmen die Reaktion. Obwohl man diese Substanzen nicht zur Reaktion pipettieren wird, sollte man beachten, dass die Template-DNA, je nach der Art der Präparation, noch störende Mengen davon enthalten kann.

- Die **Nucleotide**. Es hat sich gezeigt, dass die Qualität der Nucleotide ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf das Gelingen haben kann. Gegebenenfalls muss man Nucleotide verschiedener Hersteller ausprobieren.

- Die **Nucleotidkonzentration**. Im Standardprotokoll wird eine Konzentration von 200 µM je Nucleotid angegeben. Die Menge ist ausreichend, um in einem 50 µl-Ansatz 13 µg DNA zu synthe-

tisieren – eine Menge, die man beim besten Willen nicht erreicht. Ein Großteil der Nucleotide endet statt dessen als Nucleotiddi- oder -monophosphate, ein Viertel der Menge tut's folglich im Normalfall auch. Keine Angst, die Ausbeute bleibt trotz geringerer Nucleotidkonzentration unverändert. Übrigens wird berichtet, dass die Fehlerhäufigkeit der Taq-Polymerase mit sinkender Nucleotidkonzentration eher fällt, zumindest bis zu einer Grenze von 10 µM je Nucleotid. Allerdings scheinen sich die Autoren in diesem Punkt nicht ganz einig zu sein.
Umgekehrt wurde allerdings gezeigt, dass zu hohe dNTP-Konzentrationen durchaus eine stark inhibierende Wirkung auf die Amplifikation haben können, bis hin zum völligen Scheitern. Dies dürfte daran liegen, dass die Nucleotide freie Mg^{2+}-Ionen binden, vielleicht ist es aber auch die Menge an hemmendem Pyrophosphat, die bei hohen dNTP-Konzentrationen im Laufe der PCR zu schnell ansteigt.

- **Vorsicht:** Etliche Hersteller etikettieren ihre Nucleotidmixe mit der verwirrenden Bezeichnung "dNTP 100 mM". Das bedeutet zumeist, dass die Konzentration für jedes Nucleotid 25 mM beträgt!

- **Pyrophosphatase**. Ein Trick, um die Ausbeute zu erhöhen, besteht darin, das Reaktionsgleichgewicht zugunsten des Produkts zu verschieben, indem man eines der Reaktionsprodukte entfernt, nämlich das Pyrophosphat (PPi). Dies ist möglich, seit es gelungen ist, aus den thermophilen Bakterien, die uns die thermostabilen Polymerasen beschert haben, auch eine thermostabile Pyrophosphatase zu isolieren. Perkin-Elmer setzt sie als Bestandteil ihrer *Cycle-sequencing-* bzw. *Thermo-Sequenase*-Kits ein, doch als einzelnes Enzym ist thermostabile Pyrophosphatase bislang nur schwer erhältlich. Zuletzt habe ich das Enzym bei MCLAB (www.mclab.com) und bei New England Biolabs entdeckt. Nicht-thermostabile Pyrophosphatase (z.B. von Hefe) gibt es bei Roche, Sigma-Aldrich, USB und Fermentas.
  Pyrophosphatasen eignen sich auch, um die Ausbeute bei der RNA-Synthese (in vitro Transkription) zu erhöhen oder für das Entfernen von PPi-Kontaminationen bei Nachweismethoden, die auf der Quantifizierung von Pyrophosphat beruhen (z.B. SNP-Genotypisierung).

- Die **Primer**. Einerseits lässt sich über die Primer am wenigsten sagen, weil sie speziell für die gewünschte Amplifikation maßgeschneidert werden, andererseits entscheiden sie am meisten über das Gelingen der Amplifikation. So unvorhersehbar ihr Verhalten ist, gibt es doch einige Regeln, die die Wahrscheinlichkeit des Funktionierens deutlich erhöhen. Als Daumenregel gilt:
- PCR-Primer haben normalerweise eine Länge von 18-30 Basen und besitzen einen Anteil von 40-60 % Guanidin und Cytosin (G+C). Primer für die Amplifikation extra langer Produkte sollten 25-35 Basen lang sein. Der Primer sollte nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten (z.B. AAAA), um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen (*frameshifts*) zu vermeiden. Die Schmelztemperatur sollte 55-80 ˚C betragen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erlauben.
- Am 3'-Ende sollten ein bis zwei G oder C sitzen, um eine bessere Bindung und Elongation zu erhalten, andererseits wird empfohlen, höchstens drei G oder C ans 3'-Ende zu plazieren, weil sonst fehlhybridisierende Primer stabilisiert werden, dadurch steigt die Gefahr von unspezifischen Amplifikationsprodukten.
- Die Sequenz sollte möglichst spezifisch sein für das gewünschte Amplifikationsprodukt, so dass die Primer nur an der richtigen Stelle hybridisieren. Je mehr verwandte Sequenzen in der verwendeten Template-DNA existieren, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Amplifikationsprodukte. Je komplexer die Template-DNA (d.h. je mehr unterschiedliche DNA-Sequenzen sie enthält, wie z.B. cDNA oder gar genomische DNA), desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, Artefakte zu amplifizieren. Man begegnet dem Problem am besten über möglichst hohe Annealingtemperaturen (ca. 55-65 ˚C) – sofern die Primersequenz das hergibt. Mit steigender Temperatur sinkt

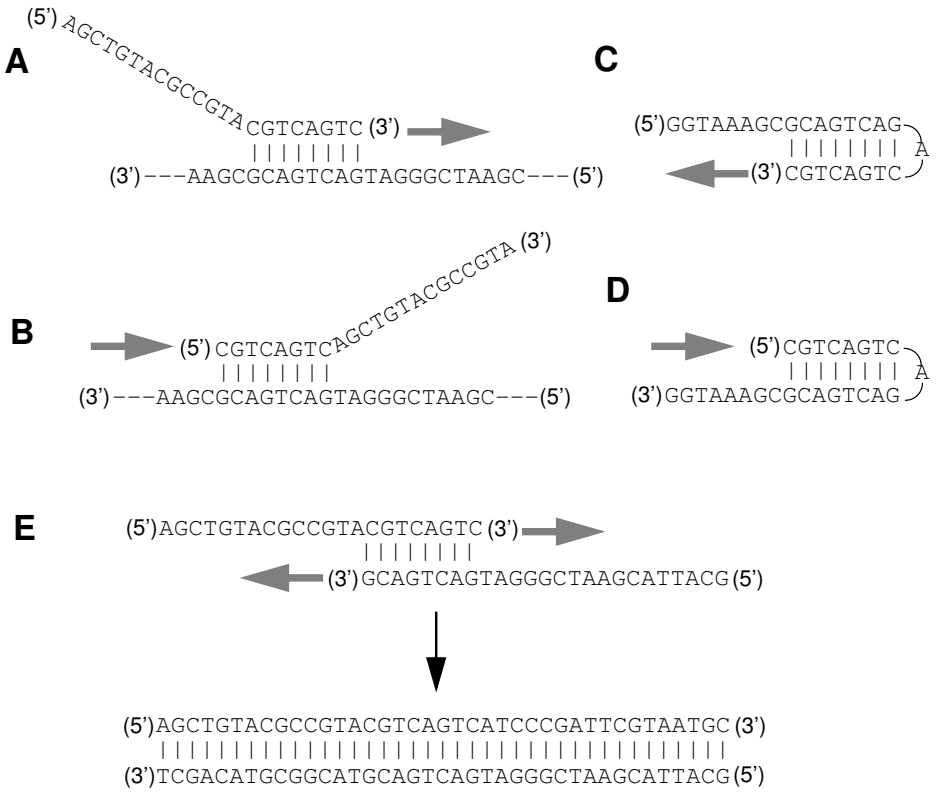

Abb. 20: Probleme beim Primerdesign.
A Hybridisiert das 3'-Ende des Primers an eine andere DNA, kann die Polymerase weitere Basen anhängen, es kommt zur Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten. **B** Hybridisiert dagegen das 5'-Ende an eine andere DNA, kann die Polymerase aufgrund ihrer 5'→3'-Exonucleaseaktivität Basen vom 5'-Ende entfernen. **C** Treten innerhalb des Primers Hairpinstrukturen am 3'-Ende auf, kann die Polymerase ebenfalls zusätzliche Basen anhängen, der Primer bindet dann nicht mehr spezifisch. **D** Bei Hairpins am 5'-Ende entfernt die Polymerase Basen vom 5'-Ende, der verkürzte Primer bindet später nur noch mit geringer Wahrscheinlichkeit an die Template-DNA. **E** Zwei Primer, deren 3'-Enden komplementär sind, können sich gegenseitig als Template verwenden, die Folge sind Primerdimere, d.h. Hybride aus den beiden Primern, die nicht mehr für die Amplifikation taugen.

allerdings die Annealingwahrscheinlichkeit und damit die Ausbeute. Will man, z.B. zwecks Mutagenese, Mutationen im Primer unterbringen, tut man dies am besten am 5'-Ende.

- Die Primer sollten keine internen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln (*hair pins*) bilden, weil diese die Wahrscheinlichkeit des Hybridisierens mit der Template-DNA reduzieren. Das Risiko der Bildung von *hairpins* checkt man am besten über ein entsprechendes Computerprogramm.
- Die Primer dürfen nicht miteinander hybridisieren und sollten eine möglichst geringe Komplementarität an ihren 3'-Enden besitzen – der eine Primer kann sonst als Template für den anderen dienen (s. Abb. 20E). Auf diese Weise entstehen statt des gewünschten Amplifikationsprodukts vor allem

die gefürchteten Primerdimere. Die Menge an nutzbarem Primer wird dadurch drastisch reduziert und die Amplifikationseffizienz sinkt ins Bodenlose.

- Je reiner der Primer, desto günstiger für die Amplifikation, daher sollte man bei kritischen Applikationen möglichst HPLC- oder PAGE-gereinigte Primer verwenden – für die Standard-PCR tut's auch der normale entsalzte Primer.

Übrigens kann man, entgegen der offiziellen Angaben, sowohl Puffer als auch Primer durchaus bei 4 °C lagern, solange man sauber und nucleasefrei arbeitet, wie es sich für den guten Experimentator gehört. Einzig die Nucleotide vertragen eine solche Aufbewahrung überhaupt nicht (obgleich es mittlerweile stabilisierte Nucleotidlösungen gibt, beispielsweise bei Peqlab), und auch die Polymerase lagert man besser bei -20 °C, obwohl ein Enzym, das man eine Stunde lang kochen kann, eigentlich ziemlich robust sein sollte.

Oligonucleotide bekommt man inzwischen fast an jeder zweiten Straßenecke. Unter den größeren Firmen betreiben unter anderem MWG und Roth Primersynthesen. Daneben gibt es eine größere Zahl von Biotechfirmen, die sich auf diesen Bereich spezialisiert haben. Einfach mal aufmerksam die Laborpost durchsehen.

Die **Primerkonzentration** kann ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Ausbeute haben. Üblicherweise werden für einen 50 µl-Ansatz etwa 10 pmol je Primer eingesetzt[57]. Ist die Ausbeute gering, kann man es auch mit deutlich höheren Mengen an Primer versuchen. Doch Vorsicht, jenseits des Optimums (das, je nach Versuchsansatz, bei ca. 50-200 pmol je 50 µl liegt) sinkt die Ausbeute auch wieder.

- Die **Zyklenanzahl**. Ab einer gewissen Produktmenge (ca. 0,3-1 pmol) kommt es zu einem Plateaueffekt, bei dem die Vermehrungsrate stark abnimmt. Dies hat verschiedene Gründe: Die Akkumulation von Endprodukten (DNA, Pyrophosphat) verlangsamt die Synthese, die Wahrscheinlichkeit des Reannealing zweier fertiger DNA-Stränge reduziert die Neusynthese, die Substratkonzentration nimmt ab (vor allem die Menge an intakten Nucleotiden), die Menge an intakter Polymerase nimmt ab, es kommt zur Kompetition mit unspezifischen Produkten (wie Primerdimeren) und zur verstärkten Fehlhybridisierung. Tatsache ist, dass in diesem Moment die Zahl falscher Produkte steigt und damit der Hintergrund. Außerdem tendiert das Produkt bei zu vielen Zyklen zum "Schmieren", d.h. neben dem gewünschten Produkt entstehen immer mehr falsche Produkte, die sich meist vom richtigen durch ihre Länge unterscheiden und auf dem Agarosegel später als Schmier ober- und unterhalb der richtigen Bande sichtbar werden. Daher passt man für die besten Ergebnisse die Zahl der Zyklen so an, dass die PCR beendet wird, wenn das Plateau erreicht wird. Viel hilft hier nicht viel.

- **Temperaturabhängige Aktivität** der Taq-Polymerase. Obwohl die thermostabilen Polymerasen ihr Arbeitsoptimum im Bereich um 70 ˚C haben (bei der Taq liegt es bei 74 ˚C), sind sie auch bei anderen Temperaturen nicht inaktiv. So zeigt die Taq-Polymerase bei 70 ˚C eine Einbaurate von ca. 2800 Nucleotiden/min, bei 55 ˚C noch 1400 Nucleotiden/min, bei 37 ˚C 90 Nucleotiden/min und bei 22 ˚C immerhin noch etwa 15 Nucleotiden/min. Dies ermöglicht es beispielsweise, Programme mit einem einzigen Annealing/Elongationsschritt bei 60 ˚C zu verwenden. Während die Restaktivität bei niedrigen Temperaturen bei Verwendung der Taq-Polymerase kein Problem ist und die Ansätze nach der Amplifikation problemlos bei Raumtemperatur über Nacht in der PCR-Maschine stehen können, ohne sich zu verändern, stellt sie bei Polymerasen mit Korrekturaktivität ein Problem dar. Tatsächlich bauen Pfu, Pwo und Tli bei Raumtemperatur nicht nur überschüssige Primer ab, sondern knabbern auch das PCR-Produkt an. Aus diesem Grund müssen PCR-Ansätze, die Polymerasen mit

57. 10 pmol Primer reichen aus für die Synthese von 6,6 µg eines 1 kb-Fragments.

	Taq	Tth	Pfu, Pwo
5' -3' -DNA-Polymerase	+	+	+
Prozessivität	hoch	hoch	gering
5' -3' -Exonuclease	+	+	+
3' -5' -Exonuclease (proofreading)	-	-	+
unspezifischer overhang	+	+	-
ReverseTranskriptase-Aktivität	-	+	-
ungefähre Fehlerhäufigkeit je eingebauter Base	10^{-5}	10^{-5}	10^{-6}

Tab. 10: Eigenschaften thermostabiler Polymerasen.

Korrekturaktivität enthalten, nach abgeschlossener Amplifikation in der Maschine gekühlt werden, bis sie weiterverwendet werden.

- Die **Polymerase**. Die klassische Polymerase für PCR ist die **Taq**-DNA-Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterienstamm, der in 70 ˚C heißen Quellen wächst. Dieses Wunderding hat sein Aktivitätsmaximum bei 74 ˚C und einem pH von über 8 und besitzt neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität, aber keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität. Außerdem besitzt die Taq neben der templateabhängigen (normalen) Polymeraseaktivität noch eine templateunabhängige, die dafür verantwortlich ist, dass an den neu synthetisierten Strang am Ende häufig noch eine zusätzliche Base angehängt wird, die auf dem Templatestrang nicht vorhanden ist, meist ein Adenosin. Die DNA-Syntheserate liegt bei ca. 2800 Nucleotide pro Minute.
  Die patentrechtliche Situation und der Forschergeist haben uns mittlerweile eine ganze Anzahl neuer thermostabiler Polymerasen mit unterschiedlichen Eigenschaften beschert. Die wenigsten besitzen jedoch die gleiche Syntheserate wie die Taq-Polymerase, so dass deren Beliebtheit bis heute ungebrochen ist. Im Wesentlichen können die Polymerasen in zwei Gruppen eingeteilt werden:

  Pfu (aus *Pyrococcus furiosus*), **Pwo** (aus *Pyrococcus woesei*), **Tgo** (aus *Thermococcus gorgonarius*), **Tma** bzw. **UlTma**™ (aus *Thermotoga maritima*) und **Tli** bzw. **Vent**™ (aus *Thermococcus litoralis*): Diese Polymerasen besitzen eine deutlich höhere Temperaturstabilität als Taq (die Halbwertszeit der Pfu bei 95 ˚C liegt bei ca. 12 Stunden) und zusätzlich eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität (***proofreading***) erlaubt. Ihre Amplifikationsprodukte besitzen deshalb auch keinen Basenüberhang wie Taq-generierte Produkte, sondern glatte Enden. Der Preis für die Wohltaten: Eine etwas kompliziertere Handhabung (denn die Enzyme "korrigieren" auch einzelsträngige Primer) und eine deutlich verringerte Syntheserate, die mit beispielsweise 550 Nucleotiden pro Minute für Pfu weit unter der der Taq-Polymerase liegt. Der Grund dafür liegt in der unterschiedlichen Prozessivität der Enzyme.
  Unter **Prozessivität** versteht man die Zahl der Nucleotide, die eine Polymerase in einem Anlauf an das 3'-Ende einer DNA knüpft, bevor sie wieder abdissoziiert. Dieser Wert spiegelt damit die Polymerisationsgeschwindigkeit und die Dissoziationskonstante (K_d) der Polymerase wider. Die Prozessivität von Pfu liegt bei etwa 9-12 Basen (je Anlauf), die der Taq dagegen bei 35-100! Das macht