

Versuch 2: Polymerasekettenreaktion

Betreuer: Knut Jahreis

Versuchsinhalt

Polymerasekettenreaktion, Gelelektrophorese auf Agarosegelen

Zwei verschiedene Plasmide werden als Matrizen für eine Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Die Produkte sollen gelelektrophoretisch aufgetrennt und ihre Größen bestimmt werden.

Grundlagen

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1984 zuerst beschrieben und hat seitdem vielfache Anwendung gefunden (Kary Mullis, Nobelpreis 1993).

Die breite Verwendung dieser Methode basiert auf der Einfachheit ihrer Durchführung. Mit dieser Methode können kleine DNA Fragmente in relativ kurzer Zeit vermehrt werden.

Die Grundlage der Methode ist die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, z. B. der *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Dieses thermophile Eubakterium lebt bei 75-80°C in heißen Quellen (z. B. Yellowstone Nationalpark, USA). Die hieraus isolierte DNA-Polymerase ist sehr stabil bei hohen Temperaturen (95°C). Die Halbwertszeiten (50 % Restaktivität) betragen 130 min bei 92,5 °C, 40 min bei 95°C und 5 min bei 97,5°C.

Im ersten Schritt der PCR (*Denaturierung*) werden die komplementären DNA Stränge bei 94°C getrennt. Im zweiten Schritt (*Annealing*) wird die Probe abgekühlt (42 – 68°C), um die Anlagerung (Hybridisierung) von kleinen synthetischen Oligonukleotiden („Primer“, 15 – 30 Nukleotide lang) an das zu amplifizierende Fragment (Zielsequenz oder Matrizensequenz) zu ermöglichen.

Im dritten Schritt (*Extension*) wird die Temperatur auf 72°C erhöht und die Polymerase fügt Nukleotide an die 3'-Enden der Primer und vervollständigt so einen neuen komplementären DNA Strang des Zielmoleküls. Diese drei Schritte entsprechen einem sogenannten Zyklus (Cycle). Diese Zyklen werden typischerweise zwischen 20 – 50 mal wiederholt. Theoretisch entspricht dies ab dem 3. Zyklus einer exponentiellen DNA Vermehrung, also etwa 10^{10} fach nach 34 Zyklen (2^n , n = Anzahl der Zyklen; siehe Abbildung 1).

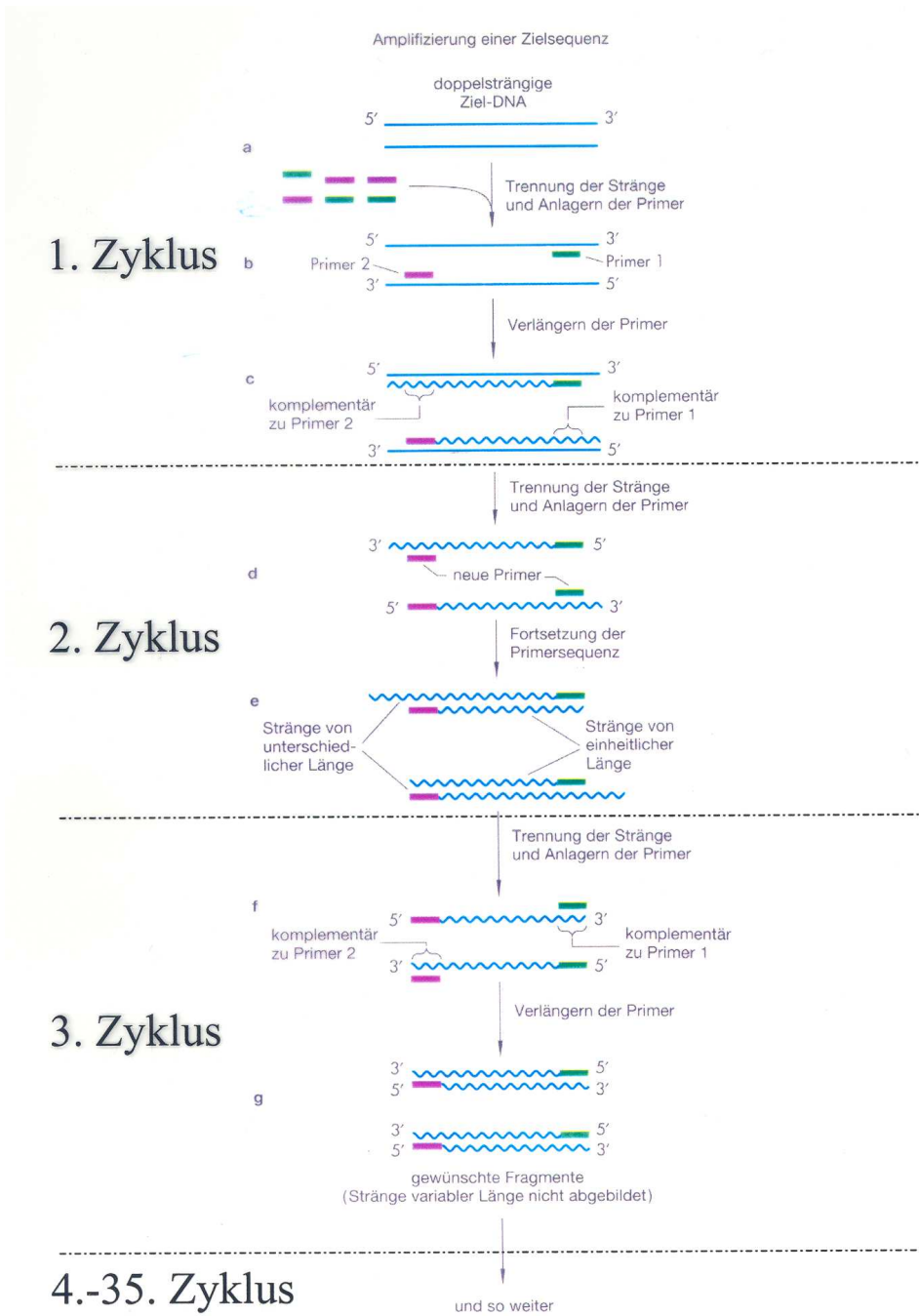


Abb.1: Die Abbildung zeigt das Prinzip der Polymerasekettenreaktion.

Versuchsdurchführung

Ziele:

- Grundlagen der Polymerasekettenreaktion
- Grundlagen der DNA-Trennung und Analyse über Agarosegele

Material:

Benötigte Plasmide als DNA-Templates und weitere Chemikalien:

Plasmide:

- a) pHP_r (0,5 kb Insert, pUC19+*Sma*I/*Hinc*II *hpr*-Fragment)
- b) pCscO1 (0,6 kb Insert, pHex3+*cscOP*-Fragment *Eco*RV)
- c) Mischung aus beiden Plasmiden im Verhältnis 1:2 (a:b)

Chemikalien und Enzyme:

- a) dNTP Mix (je 2mM, Stocklsg.) -20°C
- b) *Immolase* Reaktionspuffer (10x) -20°C
- c) *Immolase DNA*- Polymerase (5u/μl) -20°C
- d) Molekulargewichtsstandard
- e) DNA-Färbelösung Methylenblau (0,025%)

Geräte und weiteres Zubehör:

- Agarose
- Elektrophoresepuffer (1xTBE)
- Auftragspuffer (5xGLB)
- 1,5 ml Mikrozentrifugengefäße („Eppis“)
- 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße
- Thermocycler
- Horizontale Gelelektrophoresekammer
- Gleichstrom Spannungsquelle (D.C. Power Supply)
- Mikropipetten (20μl /200μl) mit Spitzen
- Mikrowelle
- Erlenmeyerkolben
- Handschuhe
- Glasschalen für Färbelösungen

Durchführung:

DNA-Amplifikation

1. Pro Gruppe wird ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße vorbereitet, die auf dem Deckel und am Rand individuell beschriftet werden müssen (Beschriftung mit Gruppennummer und Ansatz (A), (B) oder (C)).

2. Der PCR-Ansatz lautet:

Reagenz	A	B	C
Wasser	22,5 µl	22,5 µl	22,5 µl
10 x PCR Puffer	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl
dNTP-Mix (je 2 mM)	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl
univ. Primer (5µM)	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl
rev. Primer (5µM)	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl
<i>Immolase</i> -Polymerase (5u/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	2.0 µl	2.0 µl	2.0 µl
Plasmid-DNA (1:100) (A, B, oder C)	5 µl	5 µl	5 µl

3. Die Proben der Serien A, B und C werden in einem Gradienten-Thermocycler parallel bearbeitet.

4. **Reaktionszyklen:**

1. Schritt	7 min	94°C	Denaturieren	
2.Schritt	0,5 min	94°C	Denaturieren	Dieser Schritt wird 34 x wiederholt
	0,5 min	50°C	Annealing	
	0,5 min	72°C	Elongation	
3. Schritt		4°C	Pause	

Gesamtdauer des Programms: 1 Stunde 23 Minuten 50 Sekunden

Gelelektrophorese und Auswertung

1. 1,0 g Agarose in einem 200 ml Erlenmeyerkolben abwägen und 100 ml 1xTBE Puffer zugeben. Die Höhe der Lösung mit dem Marker markieren.
2. In der Mikrowelle aufkochen bis die Agarose vollständig gelöst ist.
3. Lösung etwas Abkühlen lassen (gegebenenfalls die Lösung mit Wasser bis zur Markierung auffüllen) dann möglichst luftblasenfrei in eine vorbereitete Form oder auf eine entsprechende Glasplatte mit Kamm gießen und etwa 30 min abkühlen lassen.
4. In der Zwischenzeit werden die Proben vorbereitet. Jeweils 20 µl der PCR Reaktionen werden mit 4 µl Auftragspuffer (5xGLB ohne Bromphenolblau) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und die Flüssigkeiten durch „Herunterschleudern“ zusammengeführt.
5. Der Kamm vorsichtig herausgezogen und das ausgehärtete Gel in eine mit 1xTBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.
6. Jeweils 20 µl der Proben werden auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich werden in einige Geltaschen 10 µl eines DNA-Molekulargewicht-Standardmarkers aufgetragen.
7. Nach dem Auftragen der Proben wird der Deckel auf die Kammer gesetzt und der Strom eingeschaltet (auf richtige Polung achten!). Die Elektrophorese wird bei etwa 180 Volt durchgeführt und zwar solange, bis der blaue Farbstoff etwa 2 cm vor dem Ende des Gels angelangt ist (etwa 1,0 Stunden).
8. Das Gel wird aus dem Puffer genommen, mit Methylenblau etwa 3 min gefärbt und danach mit Wasser (häufiger wechseln) etwa 45 min. entfärbt.

Fragen und Auswertung

Die Wanderung der DNA Moleküle in Agarose ist umgekehrt proportional zum \log_{10} des Molekulargewichts (Größe oder Länge in Basenpaaren).

1. Bestimmen Sie eine Standardkurve mit Hilfe der Markerbanden bekannter Länge. Bestimmen Sie die Entfernung (in mm) jeder Markerbande von der Startposition (Geltasche). Übertragen Sie die Messpunkte auf halb-logarithmisches Papier und konstruieren Sie die Kurve.
2. Welche Form hat die Kurve ?
3. Bestimmen Sie die Länge der amplifizierten DNA Fragmente. Identifizieren Sie anhand der verschiedenen Fragmentgrößen die Plasmide.

Weitere Hinweise zur Auswertung:

In diesem Kursversuch wurden mit einem identischen Primerpaar unterschiedlich große PCR-Produkte erhalten, die zur Identifikation der Plasmide herangezogen werden können. Dieses entspricht stark vereinfacht dem Prinzip des genetischen Fingerabdruckes beim Menschen. Die Grundlagen für die Erstellung des genetischen Fingerabdruckes beim Menschen sind unten zusammengefasst.

Grundlagen des genetischen Fingerabdruckes beim Menschen

Jede menschliche somatische Körperzelle (d.h. alle Zellen außer Spermien und Ei-Zellen) enthält 46 Chromosomen. Diese Chromosomen sind aus über 6.4 Milliarden Basenpaaren aufgebaut, die etwa 30.000 bis 40.000 Gene kodieren. Nur ein kleiner Anteil der gesamten zellulären DNA kodiert jedoch diese Gene, der größte Anteil (etwa 97%) besteht aus nicht-kodierender DNA. Die Funktion dieser DNA ist unklar.

Etwa 1% der nicht-kodierenden DNA besteht aus hoch repetitiven Sequenzen, sogenannte Satelliten. Synonyme oder ähnliche Begriffe sind STR (Short tandem repeats), CA- oder TG-Repeats.

Die Länge dieser Wiederholungen (Repeats) in diesen Satelliten variiert von einem bis zu mehreren tausend Basenpaaren, die 10 bis 10^7 mal auf einem Chromosom vorkommen können.

Ein Typ dieser sich wiederholenden Sequenzen wird als VNTR- Loci (variable number of tandem repeats) bezeichnet. Diese VNTR- Loci sind aus Blöcken wiederholender DNA Sequenzen (9 bis 45 Basenpaar Länge) aufgebaut und sind *polymorph*. Polymorph (= viele Formen) bedeutet in diesem Zusammenhang eine so hohe Variabilität, dass entsprechende DNA Proben von zwei Individuen (außer eineiigen Zwillingen) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht identisch sein können. Die Anzahl der Wiederholungen wird vererbt und kann zwischen verschiedenen Individuen unterschiedlich sein, die Anzahl der Wiederholungen stellt also verschiedene Allele eines DNA-Abschnittes dar. Durch Untersuchungen verschiedener polymorpher Regionen eines Individuums erhält man einen sogenannten DNA-Fingerabdruck. Solche DNA-Fingerabdrücke werden mittlerweile routinemäßig verwendet und bilden die Basis für forensische Identifizierungen, Vaterschaftstests und Populationsanalysen. Solche DNA Polymorphismen können mit verschiedenen, genetisch determinierten Krankheiten gekoppelt sein und als entsprechende Marker verwendet werden. Für die Erstellung eines genetischen Fingerabdruckes beim Menschen bei forensischen Untersuchungen dürfen nur „neutrale“ VNTR- Loci verwendet werden, die mit keiner genetischen Krankheit gekoppelt sind.

Die am häufigsten vorkommenden Polymorphismen sind solche mit variablen Längen (Fragment length polymorphisms, FLPs). Zur Untersuchung solcher DNA Bereiche können diese mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) vermehrt werden. Diese amplifizierte Sequenzen (AMPFLPs) sind polymorphe Minisatelliten-Loci (0.2 – 1 kB), die aus kurzen Sequenzwiederholungen mit weniger oder gleich 16 Basenpaaren pro Einheit aufgebaut sind. Die geringe Gesamtlänge der Repeats und die relativ kleine Zahl von Wiederholungen innerhalb der Einheit machen diese AMPFLPs für die PCR geeignet. Solche AMPFLPs sind elektrophoretisch trennbar in distinkte Sets von Allelen.

Ein spezieller Fall solcher FLPs, auch als VNTRs bezeichnet, sind DNA Regionen, die spezifische Sequenzen enthalten, welche in unterschiedlicher Anzahl vervielfacht oder dupliziert wurden. Die Anzahl dieser duplizierten Sequenzen variiert stark zwischen verschiedenen Individuen.

Ein VNTR, bekannt unter der Bezeichnung D1S80 (einzelner Locus; distales Ende Chromosom 1; Map Position 80), wurde zuerst von Nakamura et al. (1989) beschrieben.

Nakamura Y. et al. (1989) Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT118) on chromosome 1p (D1S80). Nucleic Acids Res. 16, 9364

D1S80 liegt auf dem distalen Ende von Chromosom 1 und enthält eine 16 Nukleotide lange Sequenz, die variabel zwischen 14 bis 42 -mal wiederholt wird (siehe Abb. 2)

Der Locus wird vom Vater und von der Mutter vererbt, so dass eine Person heterozygot oder homozygot sein kann. Ein Individuum, das homozygot für D1S80 ist, besitzt die gleiche Anzahl Wiederholungen auf beiden Homologen von Chromosom 1. Häufiger ist jedoch der heterozygote Fall, d.h. beide Homologen des Chromosoms 1 enthalten unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen.

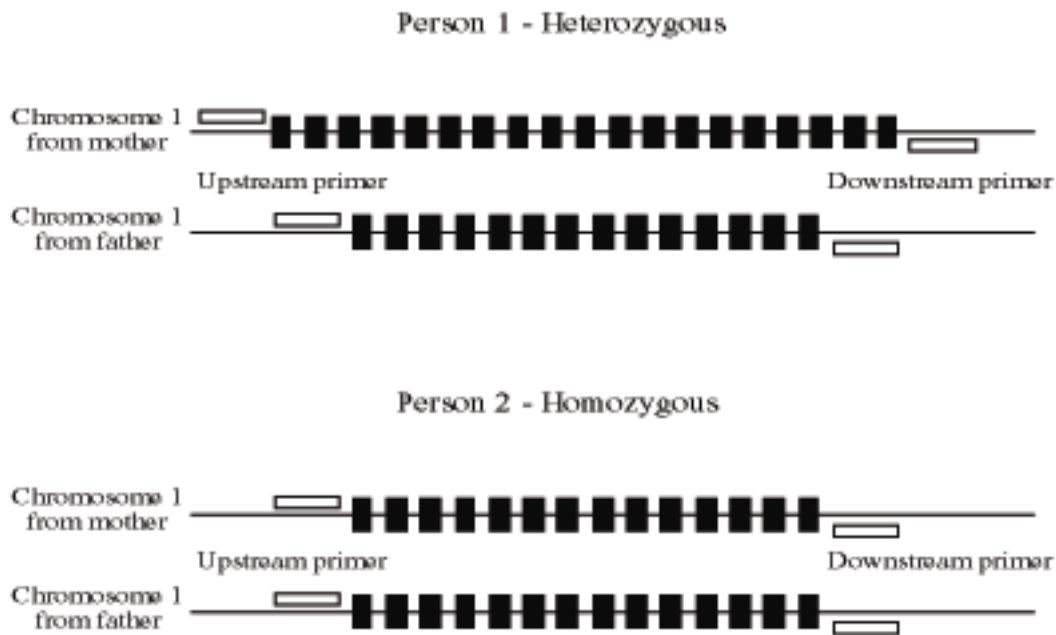


Abb. 1 Beispiel für einen D1S80 Locus. Ein Individuum erhält eine Kopie des D1S80 Locus auf Chromosom 1 von seiner Mutter und eine vom Vater. Die Position der verwendeten Primer ist schematisch dargestellt.

Eigenschaften des D1S80 Locus:

- 16 bp Coresequenz , tandem repeat, 366 bp – 814 bp
- 29 Allele beschrieben (14 – 42 Repeats)
- keine Korrelation mit einem genetischen Defekt
- Heterozygotität etwa 78%
- Allele mit 18 und 24 Repeats sind die häufigsten
- Zero-Repeat Einheit 142 bp lang (Abb. 2)

```

GAAACTGGCC  TCCAAACACT  GCCCGCCGTC  CACGGCCGGC  CGGTCCTGCG
TGTGAATGAC  TCAGGAGCGT  ATTCCCACG  CGCCAGCACT  GCATTCAGAT
AAGCGCTGGC  TCAGT
GTCAGCCCAA  GGAAGA
CAGACCACAG  GCAAGG
AGGACCACCG  GAAAGG
AAGACCACCG  GAAAGG
AAGACCACCG  GAAAGG
AAGACCACAG  GCAAGG
AGGACCACCG  GAAAGG
AAGACCACCG  GCAAGG
AGGACCACCG  GCAAGG
AGGACCACCG  GCAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCA  GCAAGG
AGGACCACCA  GCAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCG  GCAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCG  GCAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCG  GCAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGAACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCA  GGAAGG
AGGACCACCG  GCAAGG
AAGACCACCG  GCAAGC
CTGCAAGGGG  CACGTGCATC  TCCAACAAGA  C

```

Abb. 2 Typische D1S80 DNA Sequenz. Die 16 Basenpaar Repeats sind in der vertikalen Spalte dargestellt. Die Position der Primer ist unterstrichen. (Sekiguchi et. al. 1994. Ph.D. Thesis. National Research Institute of Police Science Japan)

Für das von der AG Genetik angebotene genetische Praktikum im Erweiterungsmodul werden beispielsweise ein Mikrosatelliten-Locus (**A**) sowie ein geschlechts-spezifischer Bereich (**B**) ausgewählt:

A) D1S80: Tandem-Repeat auf Chromosom I

1. Primer: D1S80.1: 5' – GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G – 3'
2. Primer: D1S80.2 : 5' – GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC – 3'

B) Geschlechtsspezifische Region (GenBank HUMZFXX und HUMZFYA)

Weibliche Zellen besitzen normalerweise zwei Kopien des X-Chromosoms (XX) während männliche Zellen XY Chromosomen pro diploider Zelle aufweisen. Man kann PCR Primer

herstellen, welche Fragmente mit unterschiedlichen Größen von den geschlechtschromosomalen Genen ZFX und ZFY auf den X- oder Y Chromosomen bilden. Weibliche Zellen generieren eine Bande (X-spezifisch) von 488 Basenpaaren, während männliche Zellen zwei Banden 488 bp (X-spezifisch) und 340 bp (Y-spezifisch) bilden.
(Weiss, A.S. & J.M Johnston (1999) Biochem. Education 27, 237)

Verwendete Primer:

Universeller Primer : 5' - ATT TGT TCT AAG TCG CCA TAT TCT CT -3'

X-Spezifisch: 5' - GAA CAC ACT ACT GAG CAA AAT GTA TA - 3'

Y-Spezifisch: 5' - CAT CTT TAC AAG CTT GTA GAC ACA CT - 3'

Zeitbedarf für PCR-Versuch

1. Tag	Einführung und PCR	1,0 Stunden
	Gelelektrophorese starten	0,5 Stunden
	Gele färben und entfärben	0,5 Stunden
	Gele entfärben und Auswerten	1,0 Stunden