

## Special: PCR – Kits & Cycler

### PCR – Eine Methode, drei Schritte

Johannes Becker-Follmann<sup>1</sup> und Dietmar Baas<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Institut für Polymorphismus- und Mutationsanalytik, Homburg/Saar, <sup>2</sup>Proligo Primers&Probes SAS, Paris

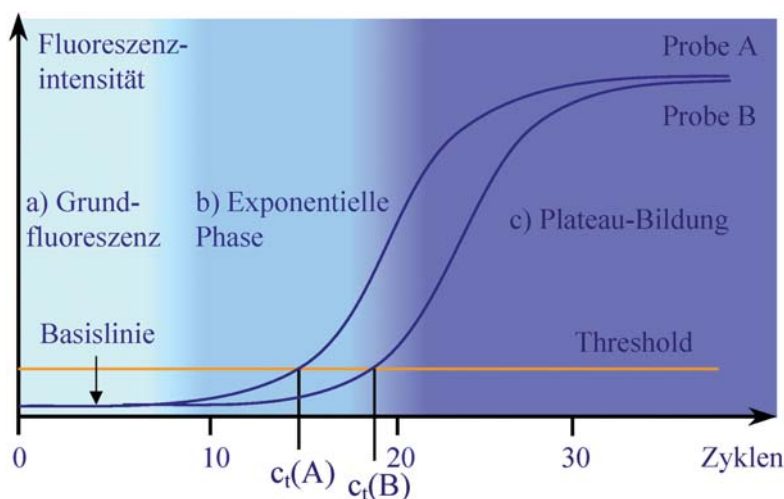
**Die Polymerase Kettenreaktion gehört zu einer der bedeutendsten methodischen Entwicklungen in der Molekularbiologie des letzten Jahrhunderts. Auszeichnungen für Kary Mullis wie den Nobelpreis für Chemie 1993 und den Japan Preis sowie die Bezeichnung der Taq-Polymerase als „Molecule of the year“ durch das Wissenschaftsmagazin Science 1989 belegen mehrfach die Bedeutung dieser Methode. Mittels der Polymerase Kettenreaktion gelingt es in drei Schritten, durch Denaturierung, Annealing und Elongation, DNA oder mittelbar RNA, spezifisch und schnell aus einer komplexen Mischung von Ausgangsmaterial oder geringsten Spuren, so stark zu vermehren, dass weitere Analysen problemlos durchgeführt werden können.**

► Die Gründe für einen derartigen Erfolg einer Methode liegen in der Verbindung von universellem Einsatz mit einfacher und schneller Durchführung. Ob die Fragestellungen lauten: Nachweis des SARS-Erregers, Verwandtschaftsanalysen in Bienenvölkern oder die Analyse von Mutationen in der medizinischen Genetik, überall da wo Nukleinsäuren nachgewiesen und/oder typisiert werden sollen, kommt die Polymerase Kettenreaktion zur Anwendung und liefert ein Ergebnis in wenigen Stunden wofür in der Vergangenheit Tage und Wochen benötigt wurden.

Für eine erfolgreiche DNA-Vervielfältigung muss nicht nur die eigentliche PCR bzw. deren Set-up gut durchdacht sein; auch eine vorangehende, sorgfältige *Template*-Präparation sowie die nachfolgende Analyse der PCR Produkte sind mitentscheidend.

#### Template-Präparation

Basierten die ersten Ansätze der Template-Präparation noch auf den klassischen Methoden der DNA-Präparation wie Phenol-Chloroform-Extraktion oder Alternativen wie das Aussalzprotokoll, entwickelten sich im PCR Zeitalter zunehmend Methoden, die die für Southern-Blot-Analysen notwendigen langen intakten dsDNA Fragmente



**Abb. 1:** Schematische Auswertung eines Real-Time PCR Experiments. Im Bereich a) misst man ein Signal das sich aus Restfluoreszenz der Sonden (da weder Quenching- noch FRET-Effekt zu 100% effizient sind) und Rauschsignal des Detektors zusammensetzt, daraus ermittelt man die Basislinie. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase: man definiert einen Schwellwert („Threshold“), dessen Schnittpunkt mit der Fluoreszenzkurve liefert einen ct-Wert („Threshold-Cycle“) der ein Maß für die anfängliche DNA Probenmenge ist. Mittels einer Standardkurve aufgenommen mit Kontrollproben ermittelt man die Start-DNA Menge.

entbehrten und mit kürzeren DNA-Fragmente oder ssDNA-Fragmenten hervorragende Ergebnisse lieferten. Mittlerweile haben sich zwei grundsätzlich verschieden Techniken etabliert.

Die erste Gruppe an Methoden befreit die Ausgangs-DNA von Inhibitoren der PCR, führt also keine Isolation der DNA im eigentlichen Sinne durch, sondern macht sie zugänglich für die enzymatische Amplifikation und hemmt Inhibitoren. Die einfachste Form ist eine ausreichende Verdünnung des Probenmaterials im PCR-Ansatz und Aufschluss durch den ersten Denaturierungsschritt. Dies findet Anwendung bei der Analyse von Probenmaterial aus Bakterienkolonien oder auch Zellkulturmaterial, überall dort wo eine ausreichende Kopienzahl an DNA-Template in einem guten Verhältnis mit neutralisierbaren Zellbestandteilen vorliegt. Varianten dieses Prinzips sind die Denaturierung von Proteinen und DNA durch NaOH-Behandlung und Hitze mit anschließender Neutralisation in Tris-HCl, mit der Anwendung für die schnellen Analysen von Haarwurzelmaterial beim Screening von Mäusen oder der Inkubation in wässriger Lö-

sung von 5% Chelex-100 mit oder ohne Proteinase K-Behandlung und anschließende Denaturierung bei 99°C für 8 min. Letztere Methode ist Standard geworden im Bereich der Spurenanalytik und hat sich in der Routine ausgezeichnet bewährt. Fordert der Versuchsaufbau eine verlustfreie DNA-Präparation und der Einsatz der kompletten DNA-Präparation wie bei single cell PCR für die Polkörperdiagnostik oder auch der Präimplantationsdiagnostik wird Proteinase K-Verdau im PCR-Reaktionspuffer angewandt.

Diesen Techniken stehen Verfahren gegenüber, die mit einer hohen Qualität der präparierten DNA aufwarten, dies allerdings auch mit einer entsprechenden hands-on-bench-Zeit bezahlen müssen. Der Einsatz von Pipettierrobotern ermöglicht mit diesen Techniken gleich bleibend konstante Qualität und Menge der präparierten DNA, die für komplexe Folgeanalysen wie quantitative real-time PCR oder Multiplex-PCR-Ansätze notwendig sind. Magnet-Beads basierte Techniken wie DNA-IQ von Promega erlauben eine gute Standardisierung der Analyse aufgrund der maximalen Kapazität des Ansatzes und somit einer konstanten Kon-

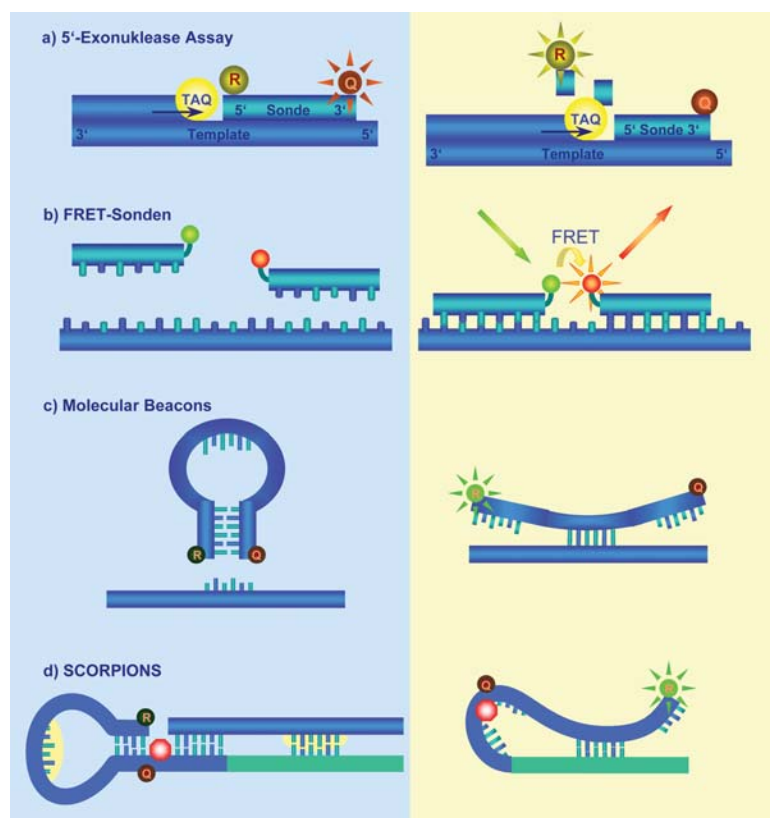


Abb. 2: Unter a) – d) sind die gängigsten spezifischen Real-Time PCR Methoden schematisch dargestellt. Jeweils links zeigt der Reporterfarbstoff keine Fluoreszenz, rechts in der fluoreszenten Form die vom Real-Time PCR Gerät gemessen wird.



zentration der eluierten DNA. Andere Silicat-basierte Methoden bestehen durch eine gute Reproduzierbarkeit und Anwendung in Roboter-Systemen.

### DOP-PCR gegen Rolling Circle Amplifikation

Die Analyse komplexer Erkrankungen erfordert Genotypisierungen im Bereich von mehreren hundert SNP-Analysen mit der gleichen DNA-Präparation. Für eine Prä-PCR Amplifikation bieten sich zwei Verfahren an:

Mittels DOP-PCR (degenerierte Oligonucleotid Primer) kann die statistische aber repräsentative Amplifikation einer unbekannt genomschen DNA-Quelle geringster Menge durchgeführt werden. Bei niedriger *Annealing*-Temperatur wird mit einem universellen Primer in den ersten Zyklen unspezifisch, jedoch repräsentativ, die gesamte DNA amplifiziert und in weiteren, spezifischen Zyklen Fragmente von 300 bp bis 3000 bp erreicht.

Demgegenüber steht die isotherme Amplifikation genomischer DNA mittels Phi29 Polymerase (*GenomiPhi*, *Amer sham Biosciences*). Ausgangsmengen von > 1 ng genomische DNA des Menschen werden bis auf 4 bis 7 µg über einen Rolling circle Mechanismus amplifiziert. Die amplifizierte

DNA hat eine Größe von durchschnittlich 10 kbp.

### PCR-Set up

Die allermeisten PCR-Anwendungen sind mit einfachen PCR-Thermocyclern und Standard Protokollen durchführbar und bedürfen keiner besonderen Optimierung. PCR-Thermocycler wurden zu Hochdurchsatzmaschinen mit geringstem Probenvolumen entwickelt, die für 384-well Platten mit Volumina unter 5 µl und ganzen Stapeln an Mikrotiterplatten im 384er Format Durchsätze von mehreren Tausend Ansätzen pro Tag führen. So bietet die jüngste Entwicklung der „H2O BIT Thermalcycler von ABgene“ die Möglichkeit einen Hochdurchsatz von 9216 Reaktion pro PCR-Lauf zu erreichen.

Andere Entwicklungen konzentrierten sich auf die Geschwindigkeits-Optimierung der Reaktion durch extrem dünnwandige Reaktionsgefäße bis hin zu Glaskapillaren und PCR-Blöcken aus Materialien mit günstiger Wärmeleitfähigkeit.

Das PCR-Set Up wird deutlich vereinfacht durch die Anwendung von *Master Kits*, Systeme mit allen Komponenten wie Nucleotide, Polymerase, Wasser, Puffer und Magnesium, die nur noch vom Anwender

um die *Template*-DNA und die *Primer* komplettiert werden müssen. Diese Produkte bieten die Möglichkeit Einsteigern die ersten Schritte in einer neuen Methode sicher zu gehen, reduzieren die Fehleranfälligkeit komplexer Systeme, unterstützen die Standardisierung und verringern die Kontaminationsgefahr durch PCR-Produkte in angesetzten Lösungen und Reagenzien.

Ergänzung finden diese Kits in Optimierungskits verschiedener Anbieter, die mit 10 bis 20 verschiedenen Mischungen der PCR-Komponenten dem Anwender die beste Zusammenstellung seiner Reagenzien mit den gegebenen *Template* und *Primer* zeigen. Der Grund für die Notwendigkeit einer Optimierung in Abhängigkeit von *Template* und *Primer* liegt in dem unterschiedlichen Denaturierungsverhalten der *Template*-DNA und der Empfindlichkeit von Polymerasen und dNTP's gegenüber zu langen oder zu hohen Denaturierungstemperaturen, sowie der unterschiedlichen *Annealing*-Temperatur der *Primer*, um eine optimale Menge spezifischen Produktes zu ermöglichen. So werden verschiedene Puffer-Systeme angeboten, die die Polymerasen stabilisieren oder deren Aktivität verstärken sollen, verschiedenste Additive, die die Schmelztemperatur der *Template* und PCR-Produkte senken sollen, Inhibitoren inaktivieren oder die Spezifität der *Primer-Template* Bindung verbessern sollen.

Zur Vermeidung von Nebenprodukten oder Dimerisierung der *Primer* und zur Erhöhung der Produktausbeute kann in einer *Hot Start-PCR* die unspezifische Synthese von DNA bei niedrigen Temperaturen verhindert werden. Ein thermolabiler Anti-Taq-Antikörper lässt die Reaktion erst nach Erreichen der Denaturierungstemperatur starten. Andere Methoden sind die chemische Modifikation der Polymerase durch hitze labile blockierende Gruppen oder die Verwendung von Inhibitoren, die nur bei niedrigen Temperaturen wirken.

### Analyse von PCR-Produkten

Je nach Zielsetzung des Experimentes sind folgende Parameter bei der Analyse von PCR-Experimenten von Interesse: (I) Fragmentlänge, (II) anfängliche DNA-Menge und (III) Basensequenz.

Zu (I): Die Fragmentlänge wird ermittelt, indem die Wanderungsgeschwindigkeit der durch die Phosphodiestergruppen negativ geladenen DNA im elektrischen Feld gemessen wird. Dabei wandert die DNA durch ein grobmaschiges Agarose- oder Polyacrylamidgel. Kleine Fragmente wandern schneller durch das Gel als größere, durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard kann man die ungefähre Größe abschätzen. Apparativ





kommen einfache Agarosegelkammern zum Einsatz, die DNA wird mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe, wie Ethidiumbromid, unter UV-Bestrahlung nachgewiesen. Alternativ gibt es miniaturisierte Chips die mehrere DNA Proben nacheinander gemäß der Fragmentlänge auf trennen können. Eine weitere Möglichkeit, speziell für den Hochdurchsatzbetrieb, bieten Kapillarelektrophorese-Systeme.

Zu (II): Die anfängliche DNA-Menge ist eine immer wichtigere Größe. Sei es für Expressionsanalysen, Diagnostik, Lebensmittelanalytik oder GVO Messungen, immer öfter wird die möglichst exakte Bestimmung der DNA Menge einer spezifischen Sequenz verlangt. Eine zuverlässige Quantifizierung gelingt nur durch Verfolgen der Amplifikatkonzentration über alle Zyklen der PCR (Abb. 1). Dazu koppelt man die PCR mit einem Prozess der eine lineare Korrelation der Amplifikatkonzentration mit einer Fluoreszenzintensität erzeugt. Verbreitet ist beispielsweise die SYBR Green Methode: durch einen Fluoreszenzfarbstoff, der an dsDNA bindet und dabei seine Fluoreszenzintensität etwa um den Faktor 1.000 steigert, wird die lineare Abhängigkeit erreicht. Da jede dsDNA nachgewiesen wird, auch Artefakte, ist sie eine unspezifische Methode und kann leicht zu Fehlergebnissen führen. Deshalb wird nach jedem SYBR Green Experiment mittels einer Schmelzkurve nachgewiesen, daß nur ein Fragment entstanden ist.

Spezifische Methoden arbeiten mit ein bis zwei weiteren fluoreszenzmarkierten Sonden die innerhalb des PCR-Fragmentes binden und somit neben den beiden PCR-Primern für weitere Spezifität sorgen. Einige Methoden sind der 5'-Exonuklease Assay (HOLLAND 1991), FRET-Sonden (LIVAK 1995), Molecular Beacons (TYAGI 1996) und SCORPIONS-Sonden (WHITCOMB 1999). All diese Methoden nutzen entweder den Quenching Effekt oder den FRET Effekt (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer). Bei ersterem kann die Emission eines Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs (z.B. FAM oder HEX) verhindert werden, indem die bei der Anregung aufgenommene Energie über den DNA-Strang der Sonde zu einem Quencher-molekül weitergeleitet wird (TAMRA, DABCYL). Im Verlauf der PCR binden die Sonden an Amplifikate und werden durch die 5'-Exonuclease-Aktivität der Polymerase degradiert, die Fluoreszenz des nun freien Reporters nimmt analog der Amplifikatkonzentration zu. Beim FRET Effekt erfolgt die Energieübertragung über den Raum, wobei der Abstand zwischen Donor und Akzeptorfarbstoff < 100 nm sein sollte. Somit eignen sich Methoden, die mit zwei Sonden arbeiten die benachbart auf

dem PCR-Fragment hybridisieren (FRET-Sonden) oder Sonden, die aufgrund von Konformationsänderungen während der Hybridisierung am Amplifikat eine Veränderung zwischen Akzeptor- und Donor-Abstand herbeiführen (Molecular Beacons und SCORPIONS, Abb. 2).

Zu (III): Die vollständige Sequenz eines PCR-Produktes lässt sich nur durch Sequenzierung ermitteln. Oft ist nicht die Gesamtsequenz von Interesse, sondern nur einzelne Positionen oder Bereiche im Fragment. Anstelle von Sequenzierungen kann ein Restriktionsenzym die Anwesenheit der entsprechenden Erkennungssequenz zeigen (Restriktions-Fragment-Längen- Polymorphismen – RFLP), bekannte SNPs können mittels Methoden analog der Real-Time PCR detektiert werden, meist leitet man durch Analyse einer Schmelzkurve die SNPs ab. Da gewöhnliche Sonden für die Real-Time PCR zu lang sind kann man entweder MGB (Minor Groove Binder) Sonden verwenden (KUTYAVIN 2000) oder LNA (Locked Nucleic Acid) Nukleotide in die Sonden einbauen (PETERSEN 2003), beides erhöht die Schmelztemperatur und erlaubt das Design von wesentlich kürzeren Sonden.

Unterschiedliche Sequenzen innerhalb gleich langer PCR-Fragmente können durch unterschiedliche Konformationen der Fragmente in einer Single Strand Conformation Polymorphism Analyse (SSCP) nachgewiesen werden.

### DOE – Design of Experiment

Komplexe Versuchsaufbauten wie quantitativer Nachweis von mehreren PCR-Produkten mit unterschiedlichen Hybridisierungssonden als Multiplex-PCR, wie sie in jüngsten PCR-Anwendungen beschrieben sind, benötigen eine feine Optimierungsstrategie. Derartiges *Design of Experiment* kann durch die Anwendung von bewährten Methoden aus der industriellen Prozessoptimierung erreicht werden.

Optimierungsstrategien nach Taguchi (TAGUCHI 1986) sind in der Automobil- und Elektroindustrie erfolgreich um kosteneffektiv die Interaktion verschiedener Variablen in einem Fertigungsprozess zu analysieren und aus den Ergebnissen die optimale Performance zu ermitteln. Die Übertragung der Methode auf molekularbiologische Experimente erfolgte durch Cobb und Clarkson (COBB und CLARKSON 1994) für die Optimierung einer RAPD-PCR, sowie durch Caetano-Anollés für die Optimierung eines DNA *amplification fingerprint* (DAF) (CAETANO-ANOLLÉS 1998). Werden z. B. vier Variablen eines Prozesses in drei unterschiedlichen Konzentrationen kombiniert so ergeben sich  $3^4 = 81$  Kombinationen. Nach Ta-

guchi reichen bereits  $2k + 1 = 9$  Experimente aus (mit  $k =$  die Zahl der zu testenden Variablen) um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Aus den erhobenen Daten der Experimente wie Dichte der Bande nach Gelelektrophorese oder Menge PCR-Produkt wird für jede Konzentration einer Variablen das Signal zu Hintergrund-Verhältnis berechnet und über die Parabelfunktion das Maximum der Kurve und das Optimum der Konzentration bestimmt.

### Zukünftige Entwicklungen

Beide Entwicklungslinien Verbesserung der biochemischen Robustheit der Methode und konsequente Anwendung von Optimierungsstrategien werden die Polymerase Ketten Reaktion und ihre Varianten zu einem zuverlässigen Routinewerkzeug auch komplexer Fragestellungen der DNA-Analytik machen.

### Literatur

- Caetano-Anollés, G. (1998): DAF optimization using Taguchi methods and the effect of thermal cycling parameters on DNA amplification. *Biotechniques* 25: 472–480.
- Cobb, B. J., and Clarkson, J. M. (1994): A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research* 22: 3801–3805.
- Holland P.M. et al. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Nat Acad Sci USA* 88: 7276–7280.
- Kutyavin, I.V. et al. (2000): 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* 28: 655–661.
- Livak, K.J. et al. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation. *PCR Meth Applic* 4: 357–362.
- Petersen, M., and Wengel, J. (2003): LNA – a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends in Biotechnology* 21: 74–81.
- Taguchi, G. (1986): Introduction to Quality Engineering. Asian Productivity Organisation, UNIPUB, New York.
- Tyagi, S., and Kramer, F.R. (1996): Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14: 303–308.
- Whitcombe, D. et al. (1999): Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature America* 17: 804–807.

### Korrespondenzadressen:

Dr. Johannes Becker-Follmann  
Institut für Polymorphismus- und Mutationsanalytik  
Kardinal-Wendel-Strasse 20  
D-66424 Homburg/Saar  
Tel.: 06841-176127  
info@i-puma.de  
www.i-puma.de

Dr. Dietmar Baas  
Proligo Primers&Probes SAS  
1 rue Robert et Sonia Delaunay  
F-75011 Paris  
dbaas@proligo.com  
www.proligo.com