

Marktübersicht: PCR (Cycler & Kits)

PCR: Die biochemische Kopiermaschine

Jochen Wilhelm

Institut für Pathologie, (FB 11) Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist sicher eine der bedeutendsten Methoden der Molekularbiologie. Das zeigt nicht nur die enorme und seit Entwicklung der Methode ständig gestiegene Anzahl an Publikationen (ca. 24 000 alleine im Jahr 2004), sondern auch die Tatsache, dass die Taq-Polymerase 1989 vom Wissenschaftsjournal *Science* zum ersten Molekül des Jahres gekürt wurde und Kary Mullis als Erfinder der Methode 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, spezifische Sequenzbereiche aus geringsten Ausgangsmengen von Nukleinsäuren *in vitro* und zudem schnell zu vervielfältigen, um sie so einer Analyse oder Weiterverarbeitung zugänglich zu machen. Was ohne die PCR Tage und Wochen dauern würde oder auch gar nicht möglich wäre, gelingt mit der PCR in wenigen Stunden. Die Anwendungen sind entsprechend vielfältig und umfassen nicht nur die Nachweise bestimmter Sequenzen, sondern auch deren Quantifizierung sowie gar ihrer gerichteten oder ungerichteten Veränderung. Da auch die Sequenzierung auf der PCR beruht, wären die großen Sequenzierungsprojekte wie die Aufklärung der Sequenz des Humanen Genoms ohne diese Methode undenkbar.

Das Prinzip der PCR

Das Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion ist in Abb. 1 dargestellt. Der Kopiervorgang einer Zielsequenz erfolgt in drei Schritten, deren Abfolge temperaturgesteuert ist. Ein doppelsträngiges DNA-Molekül wird im ersten Schritt durch Hitze einwirkung aufgeschmolzen (= Denaturierung). Die Einzelstränge dienen in der Folge als Matrize für die enzymatisch katalysierte Polymerisation von Desoxyribonukleotiden, wodurch wieder doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Die als *Primer* bezeichneten Oligodesoxyribonukleotide definieren dabei den zu kopierenden Sequenzabschnitt, indem sie bei niedriger Temperatur (50–60°C) an Orten komplementärer Se-

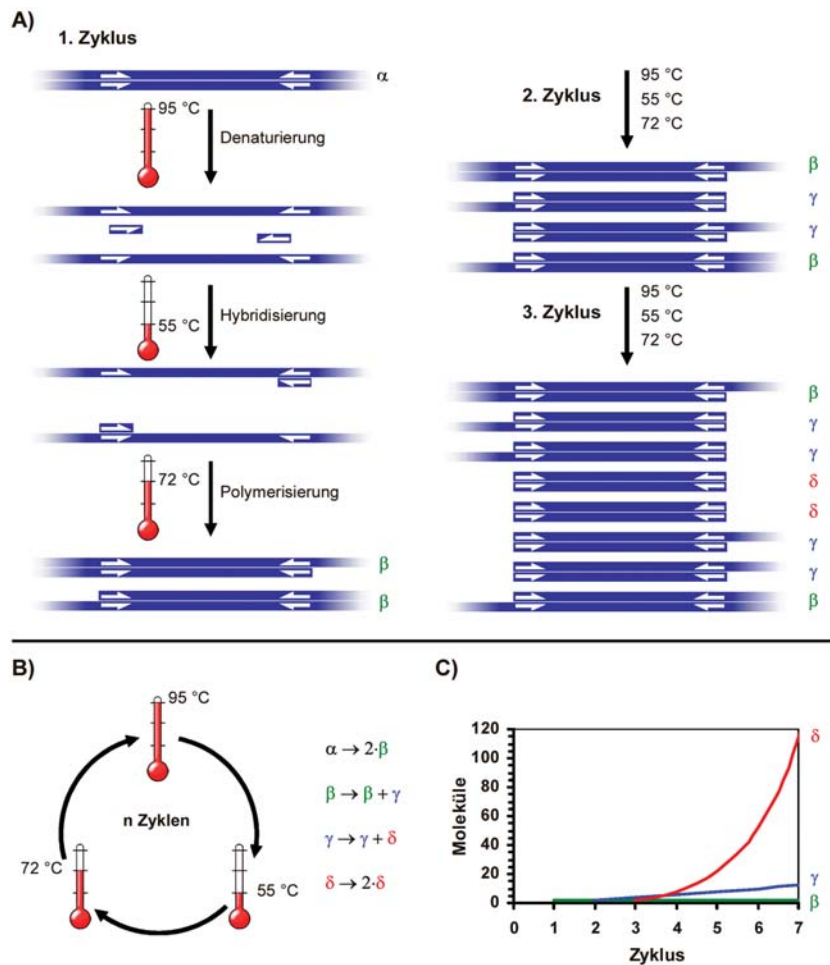


Abb. 1: Schematische Darstellung der PCR. A) Die doppelsträngige DNA α mit der Zielsequenz wird durch Hitze einwirkung in die Einzelstränge aufgeschmolzen. Durch Absenken der Temperatur hybridisieren die Primer \blacktriangleleft bzw. \blacktriangleright mit den zu ihnen komplementären Abschnitten. Während der anschließenden, durch die thermostabile DNA-Polymerase katalysierten Polymerisationsreaktion bei einer Temperatur zwischen $65\text{--}72^{\circ}\text{C}$ werden die Primer verlängert und es entstehen wieder doppelsträngige Produkte. B) Durch Wiederholungen des Temperaturprofils nimmt die Gesamt-Produktmenge exponentiell zu. Aus α entstehen dabei zwei Produkte β , die jeweils nur einseitig in einem Strang definiert terminiert sind. Die Produkte β bilden ihrerseits zusätzlich ein Produkt γ , welches einseitig in beiden Strängen definiert terminiert ist. C) Hieraus entsteht in den weiteren Zyklen das gewünschte, beidseitig terminierte Produkt δ , welches schließlich durch die exponentielle Zunahme in den nachfolgenden Zyklen schließlich die anderen Produkte mengenmäßig dominiert.

quenz mit der Ziel-DNA hybridisieren und als Starter für die Polymerisation dienen (= *Annealing*). Die Sequenz und die Länge der *Primer* bestimmen dabei die Spezifität der Reaktion. Eine definierte Sequenz von 20 Nukleotiden (nt) Länge kommt statistisch gerade ein einziges Mal in einer zufälligen Sequenz von einer Billion nt (4^{20}) vor. Damit reicht eine *Primer*-Länge von 16–

20 nt, um eine bestimmte Zielsequenz aus nahezu beliebig komplexem Ausgangsmaterial selektiv zu vervielfältigen. Reale Genome als Ausgangsmaterial sind jedoch keine rein zufälligen Nukleotidfolgen und weisen viele einander ähnliche Abschnitte auf, sodass die Wahl guter *Primer*-Sequenzen nicht immer trivial ist. Das *Annealing* erfolgt bei einer Temperatur, die wenige Gra-



de unter der Schmelztemperatur der *Primer* liegt. Die Verwendung thermostabiler Polymerasen trägt auch hier zur Erhöhung der Spezifität bei. Da die Temperatur nicht unter die *Annealing*-Temperatur abgesenkt werden muss, bleibt die Bindung der Primer sehr spezifisch. Nach der *Annealing*-Phase werden die hybridisierten Primer an ihrem 3'-Ende durch die DNA-Polymerase verlängert (= Extension). Dieser Vorgang läuft üblicherweise bei einer für die Polymerase optimalen Temperatur von 65–75°C.

Mit jedem Kopiervorgang wird dabei die Menge an DNA-Molekülen mit der Zielsequenz idealerweise verdoppelt. So entstehen aus einem einzigen DNA-Molekül in 30 Zyklen eine Billion Kopien. Dieser Prozess exponentieller Produktbildung wird von verschiedenen Faktoren begrenzt. Im Laufe der PCR geht die Netto-Produktbildung daher schließlich auf Null zurück und die Gesamtmenge an PCR-Produkt erreicht einen Plateauwert.

Die PCR findet üblicherweise in einem so genannten *Thermocycler* oder PCR-Gerät statt. Diese Maschine erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße möglichst präzise und schnell auf die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird.

Die Geschichte der PCR

Erstmals beschrieben wurde ein Verfahren zur biochemischen Amplifikation von DNA *in vitro* bereits 1971 von KLEPPE *et al.* Die damals verfügbare Klenow-Polymerase zur DNA-Synthese war nicht hitzestabil und musste nach jeder Denaturierung erneut dem Reaktionsansatz zugegeben werden. Dieser Aufwand stand einer weiten Verbreitung der Methode entgegen, bis Mullis in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts den genialen und durch seine Einfachheit bestechenden Einfall hatte, eine aus thermophilen Bakterien isolierte DNA-Polymerase zu verwenden, welche den Denaturierungsprozess der DNA unbeschadet übersteht (MULLIS *et al.*, 1994). Damit wurde eine schnelle, einfache und automatisierbare

in vitro-Amplifikation definierter DNA-Fragmente aus geringen Mengen heterogener DNA möglich. Diese technische Verbesserung sollte überaus großen Einfluss auf die gesamte weitere Entwicklung der Molekularbiologie haben und den Grundstein für molekular diagnostische Verfahren in der Medizin legen. Hinzu kam, dass die benötigten Primer durch Fortschritte in der chemischen Synthese kostengünstiger und in größeren Mengen verfügbar wurden. Mullis, der damals bei der Firma Cetus Pharmaceuticals beschäftigt war, erhielt dafür einen Bonus von 10.000 US-Dollar. Das Manuskript über die PCR-Technik wurde 1983 sowohl von *Nature* als auch von *Science* abgelehnt, schließlich aber doch 1985 von *Science* veröffentlicht. Das Verfahren wurde 1987 von der Firma Cetus patentiert (Patent Nr. 4683202), die ihre Rechte für jedwede kommerzielle Anwendungen 1991 für beträchtliche 300 Millionen US-Dollar an das Schweizer Pharmaunternehmen Hoffman-La Roche verkaufte. Seither wurde eine nahezu unüberschaubare Vielzahl von PCR-Varianten entwickelt. Heute ist die PCR eine der wichtigsten Methoden in der molekularen Biologie und molekularen Medizin. Ihre ersten Anwendungen waren der Mutationsnachweis im Genom von Patienten mit Beta-Thalassämie und Sichelzellanämie sowie der Nachweis proviraler DNA in Leukozyten. Heute findet sie Verwendung in einem überaus breiten thematischen Spektrum, z.B. beim Klonieren, beim Nachweis und der Quantifizierung von Viren oder Keimen, bei der Sequenzierung, Genotypisierung (auch beim genetischen Fingerabdruck) und dem Nachweis von Mutationen, bei der gezielten oder ungerichteten Veränderung von Sequenzen (Mutagenese) und der Fusion von Sequenzen sowie schließlich dem Nachweis und der Quantifizierung von Transkripten, also der Messung von Genaktivitäten.

Manche mögen's heiß: Die Polymerase

Die eigentliche Arbeit während der PCR erledigt das Enzym – die DNA-Polymerase.

Jede Zelle hat DNA-Polymerasen zur Replikation ihres Erbgutes sowie zur Reparatur beschädigter Stellen im Genom. Die Polymerasen (hyper)thermophiler Archaea, die in unwirtlichen Habitaten wie heißen Quellen und am Rande mariner *Black-Smoker* leben, überstehen nicht nur ein Bad im kochenden Wasser, sie fühlen sich bei Temperaturen oberhalb von 70°C erst richtig wohl und fallen bei 50°C bereits in Kältestarre. Obwohl die Polymerasen in der Zelle als Teil eines Multiprotein-Komplexes funktionieren, sind sie – glücklicherweise – auch in der Lage, ganz isoliert zu arbeiten. So reichen ihnen neben der (einzelnsträngigen) DNA-Matrize, einem *Primer* und den Bausteinen (Desoxyribonukleotid-Triphosphaten) schon die Anwesenheit von etwas Salz (KCl) und einem Kofaktor (Mg²⁺) in einem Medium mit moderatem pH (pH 8–9).

Das meistverwendete Enzym ist immer noch die ursprünglich aus *Thermus aquaticus* isolierte *Taq*-Polymerase. Sie ist, wie inzwischen auch Polymerasen aus anderen Thermophilen, in *E. coli* kloniert worden und in verschiedenen Modifikationen erhältlich. Die Polymerasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Einbauraten, der Prozessivität und in den Fehlerraten. Einige Polymerasen haben noch weitere enzymatische Aktivitäten und können z.B. in Syntheserichtung hybridisierte Oligonukleotide abbauen (5'→3'-Endonuklease) oder während der Synthese falsch eingebaute Nukleotide erkennen und wieder entfernen (3'→5'-Exonuklease). Diese *Proofreading*-Aktivität so genannter *High-fidelity*-Polymerasen verringert die Fehlerraten beträchtlich. Manche Polymerasen akzeptieren sogar RNA als Matrize (Reverse-Transkriptase-Aktivität). Eine Übersicht über häufig verwendete Polymerasen, deren Herkunft und Eigenschaften zeigt *Tabelle 1*.

Die mittels PCR erzeugten Produkte haben eine Länge von 80 bis 5000 Basenpaaren (bp), selten mehr, da die Effizienz der Produktbildung mit zunehmender Produktlänge stark abnimmt. Eine relativ effiziente und korrekte Vervielfältigung auch recht

Tab. 1: Polymerasen.

DNA-Polymerase	Herkunft	Gewicht (kDa)	Extendase ¹	Halbwertszeit bei 95 °C (min)	5'→3' Endonuklease ²	3'→5' Exonuklease	Einbaurate (nt/s)	Fehlerrate ³ (nt ⁻¹)	RT-Aktivität
<i>Taq</i> ⁴	<i>Thermus aquaticus</i>	94	+	40	+	-	75	1·10 ⁻⁴	(+)
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	94	+	20	+	-	>33	5·10 ⁻⁵	+
Vent (<i>Tli</i>)	<i>Thermococcus litoralis</i>	89	-	400	-	+	>80	5·10 ⁻⁵	-
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	92	-	>120	-	+	>120	2·10 ⁻⁶	-
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woessii</i>	90	-	> 400	-	+	40	7·10 ⁻⁶	-

¹ Enzyme mit dieser Aktivität hängen 3' an neu synthetisierte Stränge noch ein Adenin.

² In der Literatur oft als Exonuklease-Aktivität beschrieben. Der Mechanismus ist jedoch eigentlich endonukleolytisch, da nach dem partiellen Abscheren des hybridisierten Oligonukleotids dieses intern hydrolysiert wird.

³ Die Angaben zu Fehlerraten schwanken in der Literatur je nach Untersuchungsmethode stark. Die hier aufgeführten Werte sind nur als Richtwerte zu verstehen.

⁴ Der Handelsname rekombinanter, in *E. coli* exprimierter *Taq* ist AmpliTaq. KlenTaq ist eine N-terminal modifizierte Form des Enzyms mit etwa 50 x geringerer Fehlerrate. Ebenfalls erhältlich ist das Stoffel-Fragment, eine trunkierte Variante der *Taq*-Polymerase ohne 5'→3' Endonuklease-Aktivität.



langer Zielsequenzen (>30 kbp) kann durch die Verwendung von Gemischen verschiedener Polymerasen (mit und ohne *Proofreading*-Aktivität) erreicht werden.

Die Geister, die ich rief: Fluch und Segen hoher Sensitivität

Die PCR erlaubt den Nachweis bereits eines einzigen Moleküls mit der Zielsequenz – eine Sensitivität, von der analytische Chemiker nur träumen können. Diese extreme Sensitivität ist aber nicht nur Segen, sondern auch Fluch. Schon ein Molekül, z.B. ein Plasmid mit der klonierten Sequenz oder ein PCR-Produkt einer vorangegangenen PCR im Reaktionsansatz, reicht aus, um den Nachweis des Nicht-Vorhandenseins einer Sequenz unmöglich zu machen. Ein Reaktionsgefäß enthält nach einer PCR bis zu 10^{11} Kopien der Zielsequenz in 50 µl Volumen, also immerhin noch knapp eine Million Kopien je Pikoliter! Aerosole, die schon beim Öffnen eines Reaktionsgefäßes entstehen, vermögen ganze Labore nachhaltig mit PCR-Produkten zu kontaminieren. Ein Schutz vor derartigen Kontaminationen ist also extrem wichtig.

Schöne neue Welt: Die Real-time-PCR

Eine bedeutende Weiterentwicklung der PCR gelangen HIGUCHI *et al.* 1993 mit der kinetischen Analyse der Produktbildung während der PCR. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, einem Farbstoff, der in Gegenwart von doppelsträngiger DNA nach Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert,

konnte die Produktbildung anhand der Fluoreszenz praktisch in Echtzeit (*real-time*) verfolgt werden. Inzwischen ist die Methode wesentlich verfeinert worden. Es stehen nicht nur sehr viel sensitivere Farbstoffe zur Verfügung (z.B. SYBR Green I), sondern auch Fluorophor-markierte Oligonukleotide als sequenzspezifische SONDENSYSTEME. Damit entfallen die üblichen Analyseschritte im Anschluss an die PCR, die nicht nur arbeitsintensiv, sondern auch mit einem hohen Kontaminationsrisiko verbunden sind.

Die Messwert-Serien von Reaktionen bilden Amplifikationskurven, deren Kenntnis zudem sehr elegant zur Quantifizierung der Zielsequenz genutzt werden kann. Die Verfahren der quantitativen *real-time*-PCR ermöglichen recht präzise Konzentrationsbestimmungen über einen extrem großen dynamischen Bereich von 10^2 bis 10^9 Kopien der Zielsequenz im Ansatz.

Die sequenzspezifischen SONDENSYSTEME lassen sich natürlich auch zur Identifikation von Mutationen und Sequenzvarianten nutzen. Da hierbei gleichzeitig auch die relativen Mengen verschiedener Sequenzvarianten bestimmt werden können, findet diese Technik breite Anwendung nicht nur bei der Genotypisierung und Mutationsanalytik, sondern auch bei populationsgenetischen Untersuchungen und der Chimärenanalyse. Die Unterscheidung geringster Sequenzvarianten (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) erfolgt in der Regel anhand der Schmelztemperatur der Sonden im Anschluss an die PCR in einer Analyse der Schmelzkurven.

Die zur PCR parallele Anregung und Fluoreszenzmessung erfordert natürlich eine spezielle Instrumentierung. Das erste *real-time*-PCR-Gerät kam 1997 auf den Markt und wurde von Applied Biosystems vertrieben. Den lukrativen und schnell wachsenden Markt für diese Technik erkannten auch andere Firmen schnell. Nur kurze Zeit später brachte Roche Diagnostics mit dem ursprünglich von Idaho Technology entwickelten LightCycler ein Gerät mit innovativ neuem Design heraus, welches Luft zur Temperierung der Proben verwendet und extrem schnelle Temperaturwechsel bei hoher Temperaturhomogenität ermöglicht. Es folgten weitere Geräte verschiedener Firmen wie der iCycler, RotorGene, SmartCycler, und andere. Alleine in Europa betrug der Umsatz 2002 laut Frost & Sullivan Report 120 Millionen US-Dollar, für 2006 geschätzt 350 Millionen US-Dollar, Tendenz steigend.

Die Zukunft

Schon heute ist die PCR eine der wichtigsten Methoden der molekularen Biologie und Medizin und findet Anwendung in einem breiten Spektrum von der Grundlagenforschung bis hin zur klinischen Routinediagnostik. Absehbare zukünftige Entwicklungen der Methode werden die Optimierung hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, Robustheit, Genauigkeit und Ausbeute betreffen. Auch hat die Entwicklung von Mikrovolumen-PCR-Geräten begonnen, welche in Zukunft möglicherweise tausende von Reaktionen mit einem Volumen von wenigen Nanolitern auf speziellen Chips oder Mikrokapillaren steuern.

Literatur

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., et al.** (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., et al.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Erlich, H. A.** (1989): Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol* 9: 437–447.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sininsky, J. J., and White, T. J.** (1990): PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. *Academic Press, San Diego, London.*
- McPherson, M. J., Quirke, P. and Taylor, G. R.** (1991): PCR: A Practical Approach. *IRL Press, Oxford.*
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R.** (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11: 1026–1030.
- Mullis, K. B., Ferré, F. and Gibbs, R. A.** (1994): The polymerase chain reaction. *Birkhäuser, Basel, Berlin, Boston.*
- Innis, M. A., Gelfand, D. H. and Sininsky, J. J.** (1995): PCR Strategies. *Academic Press, San Diego, London.*
- Newton, C. R., Graham, A.** (1997): PCR, 2nd Edition. *BIOS Scientific Publishers, Oxford.*
- Wilhelm, J. and Pingoud, A.** (2003): Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 4, 1120–1128.
- Korrespondenzadresse:**
- Dr. Jochen Wilhelm**
Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Pathologie, (FB 11)
Langhansstraße 10
D-35392 Giessen
Tel.: 0641-99 41164
Fax: 0641-99 41169
jochen.wilhelm@chemie.bio.uni-giessen.de