

Unbegrenzte DNA-Analysen durch *Multiple Displacement Amplification*

Gerald Schock, Nina Gildehaus, Helge Lubenow, Dirk Löffert und Christian Korfhage

QIAGEN GmbH, Hilden

► Die oft limitierte Menge genomischer DNA stellt für viele Analysen in der Molekularbiologie und bei genetischen Studien ein großes Problem dar. Abhilfe schafft die *Multiple Displacement Amplification* (MDA). Mit dieser Methode ist es möglich, ausreichende Mengen genomischer DNA auch von stark limitierten Proben zu erhalten.

Das Problem der DNA Limitierung

Für die meisten genetischen Analysen und für viele Methoden in der Molekularbiologie sind Qualität und Quantität genomischer DNA fundamental. Bei humanen Proben, sowie bei schlecht wachsenden eu- und prokaryotischen Zellen ist die Ausbeute an verwertbarer DNA jedoch oft nicht ausreichend.

Der Grund für die Limitierung der genomischen DNA ist zum einen eine oft sehr geringe Probenmenge, zum anderen die Vielzahl der durchzuführenden Untersuchungen. So kann z. B. bei umfangreichen epidemiologischen Studien die Anzahl der Tests die Menge an verfügbarer DNA leicht übersteigen. Häufig soll zudem ein Teil der DNA für spätere Analysen oder zur Genotypisierung archiviert werden.

Whole Genome Amplification (WGA) als Lösung bei DNA-Limitierungen

Um das Problem der DNA-Limitierung zu lösen, wurden in der Vergangenheit EBV-transformierte Zelllinien hergestellt. Solche Transformationen sind jedoch mit hohem Zeitaufwand und Kosten verbunden und führen oftmals nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Die *Whole Genome Amplification* (WGA) stellt dagegen eine sichere und preisgünstige Alternative zur

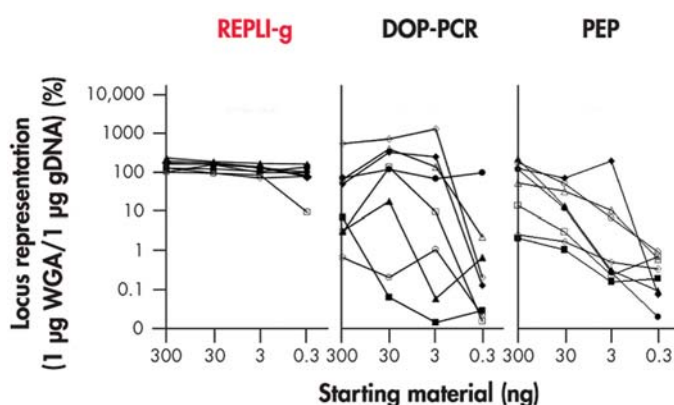


Abb. 1: Locus Repräsentation bei unterschiedlichen WGA Methoden. Nach Amplifikation mit REPLI-g (MDA), DOP-PCR und PEP wurde die Locus Repräsentation acht verschiedener Loci quantitativ mittels RT-PCR erfasst und mit nicht-amplifizierter DNA verglichen. © 2002 National Academy of Sciences, USA.

Vervielfältigung genomischer DNA dar.

Bei den herkömmlichen, PCR-basierten WGA-Methoden wie PEP (*Primer Extension Pre-amplification*) oder DOP-PCR (*Degenerated Oligonucleotide Primed-PCR*) macht man sich die Vorteile der hitzestabilen DNA-Polymerasen zu Nutze. Allerdings haben alle PCR-basierenden WGA-Methoden deutliche Nachteile, betrachtet man Ausbeute, Qualität und Fragmentlänge der amplifizierten DNA.

Die differenzielle Affinität der verwendeten DNA-Polymerase zu unterschiedlichen Sequenzen kann zudem zu stark unterschiedlichen Amplifikationen verschiedener Marker führen (Abb. 1), was in einer deutlichen Unter- oder Überrepräsentation einzelner Marker resultiert. Die Konsequenzen einer solchen Fehlamplifikation können falsch negative Daten oder fehlerhafte Genotypisierungen (z. B. Homo- anstelle von Heterozygotie) sein.

Die hier beschriebenen Nachteile bestehen bei MDA-basierenden WGA-Methoden jedoch nicht.

Multiple Displacement Amplification

Bei der *Multiple Displacement Amplification* (MDA)^[1, 2], die auf einem isothermalen Reaktionsprinzip beruht, kommt es kontinuierlich zu einer Strangverdrängung (*strand displacement*) (Abb. 2). Dabei entstehen kontinuierlich neue, einzelsträngige Template-Bereiche, die als Ausgangspunkt neuer Replikationen dienen, ohne dass die gesamte DNA denaturiert wird. Da anders als bei einer herkömmlichen PCR keine zyklischen Denaturierungsschritte notwendig sind, können für die Reaktion nicht-thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt werden, die effizienter arbeiten als zum Beispiel die *Taq*-Polymerase. Neben einer reproduzierbaren und hohen DNA-Ausbeute hat dies den Vorteil, dass die gesamte Replikation über Nacht bei einer konstanten Temperatur von 30 °C in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden kann. In den meisten Fällen erfolgt zudem die Zellyse zusammen mit der Denaturierung der DNA im gleichen Ansatz. Durch

Schematic Representation of REPLI-g Amplification



Abb. 2 : Prinzip der Multiple Displacement Amplifikation. Nach der Hybridisierung von Hexamer Primern bewegt sich die Phi 29 DNA-Polymerase entlang des DNA-Templates und verdrängt dabei den komplementären Strang. Nach der Hybridisierung eines weiteren Primers wird nun dieser seinerseits ein Template für eine erneute Replikation. Dadurch wird hoch molekulare DNA von bis zu 100 kb erzielt.

die milde alkalische Denaturierung wird der spätere Nachweis auch größerer Fragmente ermöglicht (Abb. 3).

Nach erfolgter Reaktion steht die genomische DNA ohne weitere Aufreinigung direkt für weitere Applikationen zur Verfügung. Die replizierte DNA erreicht eine Länge von bis zu 100 kb, wobei durchschnittlich Fragmentlängen von 10 kb erzielt werden. Hierdurch eignet sich die replizierte DNA neben der SNP-Detektion auch für Anwendungen wie RFLP oder Southern-Analysen, bei denen größere Fragmentlängen notwendig sind. Die proofreading-Aktivität der verwendeten Phi 29 DNA-Polymerase gewährleistet darüber hinaus, dass MDA amplifizierte DNA auch für Sequenzierungen verwendet werden kann.

Kaum Grenzen für die Amplifikation von DNA

Die von QIAGEN verwendete REPLI-g Technologie basiert auf der *Multiple Displacement Amplifikation*. Das Spektrum des mit REPLI-g Kits und im WGA-Service amplifizierbaren Probenmaterials ist sehr breit gefächert. Sogar genomische DNA aus Zellen, Gewebebiopsien und Vollblut kann repliziert werden. Als Ausgangsmaterial geeignet sind darüber hinaus auch Einzelzellen aus eu- und prokaryotischen Organismen. Zuverlässig gezeigt werden konnte bereits die Einzelzell-Genom-Amplifikation aus einzelnen humanen Lymphocyten^[3], Spermien^[4] und *E. coli*-Zellen^[5].

Mit REPLI-g Technologie amplifizierte DNA weist eine sehr gleichmäßige Vervielfältigung des gesamten Genoms auf (Abb. 1). Die so erzielte stringente Repräsentation verschiedener Loci ermöglicht, dass genetische Marker bei einer anschließenden Genotypisierung zuverlässig und reproduzierbar detektiert werden können^[6]. Unabhängig von der eingesetz-

ten Menge an Ausgangsmaterial werden dabei sehr einheitliche DNA-Ausbeuten erreicht, was einen Einsatz der amplifizierten DNA in nachfolgenden Applikationen ohne vorherige Konzentrationsmessungen erlaubt.

Für eine optimale Anpassung an gewünschte Applikationen bietet QIAGEN verschiedene Kit-Größen sowie WGA als Service an: den REPLI-g Mini Kit für die Amplifizierung von DNA für die direkte Verwendung in Experimenten, bei denen eine geringere Menge DNA ausreichend ist. Werden größere Mengen genomischer DNA benötigt, zum Beispiel wenn die amplifizierte DNA zur späteren Verwendung archiviert werden soll, empfiehlt sich der REPLI-g Midi Kit, der bis zu 40 µg DNA liefert. Mit dem Screening Kit ist zudem ein spezielles Format erhältlich, das für Hochdurchsatz-Analysen optimiert ist. Können Proben nicht selbst amplifiziert werden, bietet QIAGEN mit dem WGA Service die REPLI-g Technologie auch als Dienstleistung an. Eine eingehende Qualitätskontrolle des verwendeten Probenmaterials hinsichtlich seiner erfolgreichen Verwendung für Genotypisierungs-Analysen komplettiert dieses Serviceangebot.

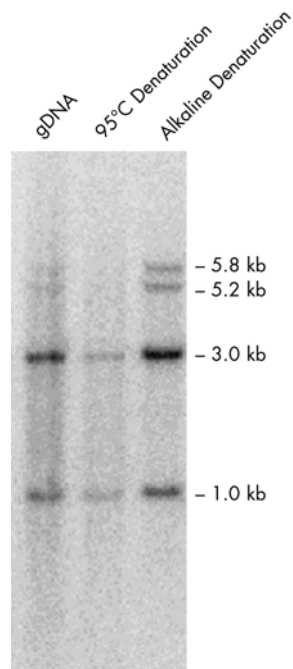


Abb. 3: Effekt verschiedener Denaturierungsmethoden bei MDA. Genomische und amplifizierte DNA wurde mit TaqI geschnitten und im Southern-Blot gegen eine radioaktive Sonde hybridisiert. Eine Hitze-Denaturierung der gDNA wirkt sich negativ besonders auf die Amplifikation großer Fragmente aus. Die alkalische Denaturierung hingegen verbessert die Ausbeute auch großer Fragmente in der Reaktion. © 2002 National Academy of Sciences, USA.

Vorteile der REPLI-g Technologie

Mit der MDA basierenden *Whole Genome Amplifikation* steht eine Methode zur Verfügung, mit der genomische DNA auch aus stark limitierten Proben gewonnen und zudem immortalisiert wer-

den kann. Ob archivierte oder ältere Proben in der klinischen Forschung^[7], geringe DNA-Mengen in der Forensik^[8] oder schwer zu kultivierende Bakterien^[9]: REPLI-g gewährleistet immer eine ausreichende Menge an DNA für alle durchzuführenden Analysen.

Literatur

- [1] Dean, F.B., et al. (2002): Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *PNAS USA* 99: 5261–5266.
- [2] Hosono, S., et al. (2003): Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Res* 13: 954–964.
- [3] Handyside, A.H. et al. (2004): Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Rep* 10: 767–772.
- [4] Jiang, Z. et al. (2005): Genome amplification of single sperm using displacement amplification. *NAR* 33: e91.
- [5] Raghunathan, A. et al. (2005): Genomic DNA amplification from a single bacterium. *Appl Env Microbiol* 71: 3342–3347.
- [6] Pask, R. et al. (2004): Investigating the utility of combining phi 29 whole genome amplification and highly multiplexed single nucleotide polymorphism BeadArray genotyping. *BMC Biotechnology* 4: 15.
- [7] Tzvetkov, M.V. et al. (2005): Genome-wide single-nucleotide polymorphism arrays demonstrate high fidelity of multiple displacement-based whole-genome amplification. *Electrophoresis* 26: 710–715.
- [8] Sorensen, K.J. et al. (2003): Whole genome amplification of DNA from residual cells left by incidental contact. *Anal. Biochem.* 324: 312–314.
- [9] Kwon Y.M. et al. (2004): Improved efficacy of whole genome amplification from bacterial cells. *Biotechniques* 37: 40–44.

Korrespondenzadresse:

Dr. Gerald Schock
QIAGEN GmbH
QIAGEN Straße 1
D-40724 Hilden
Tel.: 02103-2912310
Fax: 02103-2922310
Gerald.Schock@qiagen.com
www.qiagen.com