

Wozu DNA vervielfältigen?

Typischerweise liegen nur geringste Mengen DNA vor, die aus einigen wenigen Zellen der Probe extrahiert wurden. Für eine Analyse reicht das nicht aus, so dass die DNA-Menge vorher vervielfältigt werden muss. Damit kann dann die Basenabfolge (**Sequenzierung**) oder ein anderes DNA-Merkmal, beispielsweise die Länge eines Genabschnitts, bestimmt werden. Beispiele für mögliche Untersuchungen:

- Bestimmung der Tier- oder Pflanzenart, von der eine (fossile) Probe, beispielsweise ein Holzstück, stammt.
- Bestimmung der Bakterien oder Virusart und genetischer Varianten (Mutanten) bei Infektionskrankheiten.
- Untersuchung des Krebsstyps durch die Analyse der Tumorzell-DNA, um die Therapiemethode zu optimieren.
- Vergleich von DNA-Proben untereinander auf Identität (**genetischer Fingerabdruck**) oder Ähnlichkeit: Ermittlung des familiären ODER evolutionären Verwandtschaftsgrads (**Vaterschaftstest**, evolutionärer Stammbaum von Lebewesen).

Überblick über die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Im Gegensatz zu lebenden Organismen können mit dem PCR-Prozess nur relativ kurze DNA-Abschnitte mit bis zu ca. vier Kilobasenpaaren (4 kbp) vervielfältigt werden, Zum Vergleich: Das haploide menschliche Erbgut beträgt 3 Milliarden Basenpaare. Es werden also nur die interessierenden Bruchteile des Erbmaterials vervielfältigt werden, z.B. ein Gen, ein Gendfragment oder nichtcodierende DNA-Sequenzen. In das Reaktionsgefäß werden zu Beginn alle erforderliche Reagenzien auf einmal gemischt. Das sind vor allem:

- Hitzestabile Polymerase, die die Reaktionstemperatur von nahezu 100 °C unbeschadet übersteht. Meist verwendet man die **Tag-Polymerase**, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, einem Bakterium, das an heißen Quellen am Meeresgrund lebt, stammt.
- Die beiden Primer, die mit ihrer Basenabfolge auf beiden Strängen der DNA die Startpunkte der vervielfältigen Abschnitte festlegen (vgl. Abb. 2. oben) Im Gegensatz zu den natürlichen RNA-Primern der Replikation, handelt es sich hier um DNA-Primer, also „ganz normale“ einzelsträngige DNA-Stückchen, 18 - 30 Basen lang.
- Die vier Nucleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dGTP): $\text{P}-\text{P}-\text{P}$ -Desoxyribose-Base



Abb. 1: Ein Thermocycler. Quelle: wikimedia. Autor: GFJ (verändert)
Ein cooles Video zur PCR:



<https://youtu.be/l4EP3b58QUE>

Ein nicht so cooles Video zur PCR, dafür aber genauer!



https://youtu.be/OwFMJC7SQ_I

Das Gemisch wird in ein kleines Reaktionsgefäß gegeben und in einen *Thermocycler* (vgl. Abb. 1) gestellt, das schnell Aufwärmen und Abkühlen kann. Es laufen viele mal hintereinander drei Schritte ab, die zu einer lawinenartigen Vermehrung führen:

1. **Denaturierung (Schmelzen):** Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf ca. 95 °C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen, so dass nur noch Einzelstrang-DNA vorliegt. (vgl. *F₀-Stränge* in Abb. 1 auf Folgeseite, oben!)
2. **Annealing (Primerhybridisierung):** In diesem Schritt wird Temperatur auf 55 – 65 °C abgesenkt und ca. 30 Sekunden lang auf einem Wert gehalten, der eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt.
3. **Elongation:** Schließlich hängt die DNA-Polymerase, beginnend am Primer, die fehlenden Nukleotide an. Der Primer bleibt erhalten, er bildet den Anfang des neuen Einzelstrangs. Die Elongation eines 3 kbp langen DNA-Abschnitts ist nach ca. 3 Minuten beendet. Sie geht über das gewünschte Ende des zu amplifizierenden Bereichs hinaus, weil sie nicht gezielt unterbrochen werden kann. Sie endet durch spontanes Abdissoziieren der Polymerase oder am Strangende. Erstmals nach der 3. Amplifikation entstehen DNA-Doppelstränge mit der gewünschten Länge. Nur sie kommen dann aber zur exponentiellen Vermehrung. Das Endprodukt besteht nahezu ausschließlich aus dieser Wunsch-DNA.

1. **Ergänzen Sie in der Abb. 2 den rechten Ast nach der 3. Amplifikation und beschriften Sie entsprechend.**
2. **Geben Sie eine Formel zur Berechnung der Anzahl der DNA-Kopien (N) in Abhängigkeit der Amplifikationsdurchläufe (n) an. Wie häufig muss hintereinander amplifiziert werden, um ca. 500.000 DNA-Kopien zu erhalten?**

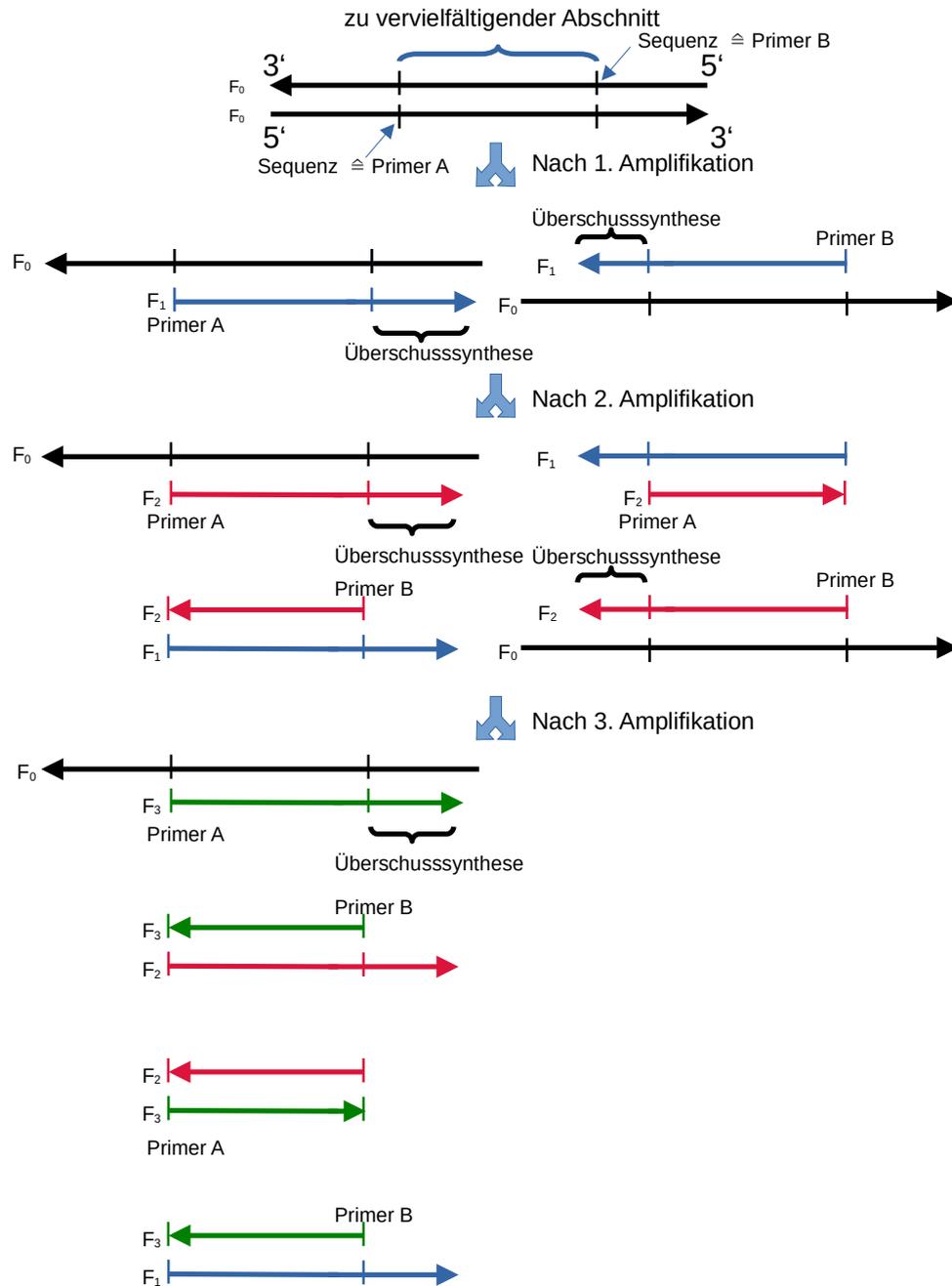


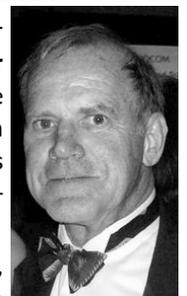
Abb. 2: Schema der PCR (Quelle: eig. Werk). Lösen Sie damit die Aufgaben 1 und 2 auf der vorangegangenen Seite!

Der Entdecker der PCR : KARY MULLIS (1944 – 2019) - Aufstieg und Fall eines Exzentrikers

Der Chemiker KARY MULLIS (siehe Bild, Quelle: commons wikimedia, Autor: D. Mapston) entwickelte zu Beginn der 80er Jahre das Verfahren zur PCR. Die Bedeutung war so groß, dass er schon im Jahr 1993 den **Nobelpreis für Chemie** bekam. Seinem Arbeitgeber überließ er die PCR-Technik für 10.000 Dollar, zehn Jahre später verkaufte die Firma die Patente für 300 Millionen Dollar weiter. Der unkonventionelle Charakter veröffentlichte auch schon *fachfremd* zu einem astrophysikalischen Thema in der renommiertesten Zeitschrift *Nature*. Andererseits bestand er seine mündlichen Doktorprüfungen in Biochemie nur mit Not, die Dissertation musste, um angenommen zu werden, massiv gekürzt werden, da sie sich in Belanglosigkeiten verlor.

Im späteren Leben widersprach MULLIS mehreren wissenschaftlich weitestgehend gesicherten Sachverhalten, darunter der Existenz des Ozonlochs und des anthropogenen Klimawandels. Er berichtete über Begegnungen mit Außerirdischen und seinen Glauben an die Astrologie. Am fatalsten war das Leugnen, dass das HI-Virus AIDS verursacht, obwohl er selbst nicht daran geforscht hat. Das Problem daran ist, dass sich Entscheidungsträger und Multiplikatoren auf solche „Experten“ berufen, beispielsweise der ehemalige südafrikanische Präsident, THABO MBEKI. Wichtige Schritte zur Eindämmung von AIDS wurden nicht eingeleitet und Erkrankten antivirale Medikamente verweigert. Hunderttausende Tote und Infizierte sind dort bis heute die Folge.

Später gründete MULLIS eine Firma, die Schmuck mit amplifizierten DNA-Schnipseln von Promis verkaufte.



<https://youtu.be/xd4De47ldYs>