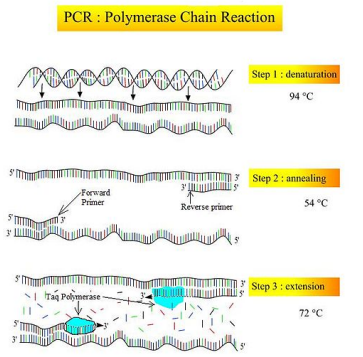
Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



Schritte der PCR, Bild: Tinojasontran / Public domain

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden und dient dazu, DNA zu vervielfältigen. Sie wird kurz als PCR (aus dem Englischen für polymerase chain reaction) bezeichnet.

Geschichte und Anwendung

Die PCR wurde 1987 von Kary Mullis entwickelt, und ihm wurde 1993 dafür der Nobelpreis verliehen. Das DNA-Syntheseverfahren, bei dem DNA in mehreren Zyklen wiederholt verdoppelt wird, hat sich als eine der wichtigsten Methoden der Molekularbiologie etabliert. Die PCR ermöglicht es, einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Ohne diese Technik wären viele wissenschaftliche Errungenschaften, wie beipsielsweise das Entschlüsseln des menschlichen Genoms, nicht möglich gewesen.

Die PCR erlaubt es, Abschnitte eines DNA-Moleküls aus kleinsten Mengen an Untersuchungsmaterial zu vermehren. Sie ist heute eine der wichtigsten Methoden in einem Labor, und ihre Anwendungsgebiete umfassen unter anderem **Grundlagenforschung** (Klonieren, Sequenzieren, Genotypisieren,...), **Medizinische Diagnostik** (z.B. Nachweis von Virus-Infektionen wie SARS-CoV-2 oder Erbkrankheiten), **Gerichtsmedizin**, **Forensik**, **Lebensmitteldiagnostik** oder **Vaterschaftstests**.

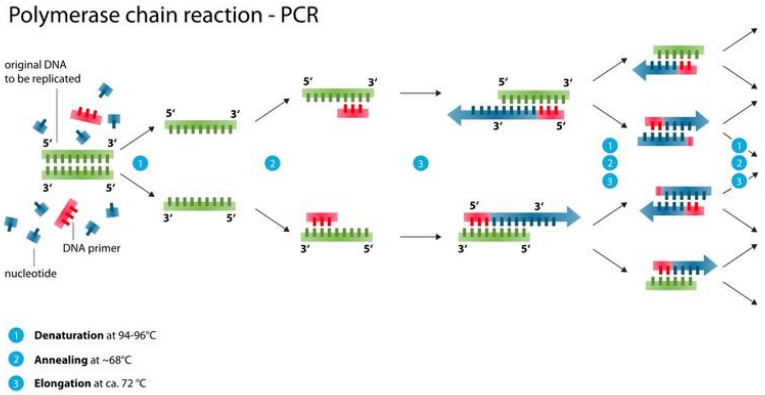
Prinzip der PCR

Die Vervielfältigung der DNA erfolgt in einem sogenannten Thermocycler - einer Maschine, die Reaktionsgefäße auf präzise Termperaturen erhitzen und kühlen kann. Zunächst werden die benötigten Reagenzien in kleinen Reaktionsgefäßen gemischt:

- Die **Original-DNA**, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält (Template).
- Zwei **Primer** (=kurze Nukleotidketten als Startersequenzen), die am Anfang und am Ende der zu kopierenden Stelle liegen. Sie legen auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese fest, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt wird.
- Eine **DNA-Polymerase** (= Enzym, das in Zellen die Erbinformation kopiert, z.B. Taq-Polymerase). Diese wird bei hohen Temperaturen nicht zerstört und repliziert (kopiert) den festgelegten Abschnitt.
- **dNTPs** (Desoxyribonucleosidtriphosphate), die Bausteine für den

von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang
- Mg^{2+}-Ionen, für die Funktion der Polymerase essentiell, stabilisieren die Anlagerung der Primer und bilden lösliche Komplexe mit den Desoxyribonucleosidtriphosphaten
- Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen.

Im Thermocycler laufen dann mehrere Vermehrungszyklen hintereinander ab, von denen jeder aus folgenden Schritten besteht:



Schematische Darstllung eines PCR-Zyklus, Bild: Enzoklop / CC BY-SA (creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0)

- **Denaturation**: Die doppelsträngige DNA-Vorlage wird erhitzt und in zwei Einzelstränge geteilt.
- **Annealing**: Die Temperatur wird gesenkt, und die DNA-Primer können an die DNA-Vorlage binden.
- **Elongation/ Extension**: Die Temperatur wird wieder erhöht, und die DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA-Stränge.

Die Produkte vorheriger Zyklen dienen jeweils als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus, womit eine exponentielle Vervielfältigung der DNA ermöglicht wird. Daher kommt auch der Begriff "Kettenreaktion" in diesem Zusammenhang.

Nach Durchlaufen aller Zyklen liegt das Stück DNA, das durch die beiden Primer begrenzt ist, in großer Menge vor. Das vervielfältigte Material wird anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und nachgewiesen.

Besonderheiten der PCR beim Nachweis von SARS-CoV-2

Bei SARS-CoV-2 liegt die Nukleinsäure, die vermehrt bzw. nachgewiesen werden soll, wie auch bei anderen Viren in Form von RNA vor. Die

RNA muss somit zunächst mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA übersetzt werden. Man spricht in diesem Fall von einer "**Reverse Transkriptase PCR**"

Der hier beschriebene Prozess der PCR unterscheidet sich im Fall von SARS-CoV-2 auch noch darin, dass zum Nachweis dieses Erregers eine so genannte "**Real time PCR**" durchgeführt wird: Den Proben wird zu Beginn ein zunächst inaktiver Fluoreszenz-Farbstoff beigemischt. Dieser wird durch die DNA-Produktion aktiviert, und die Fluoreszenz wird bei jedem Zyklus, also in Echtzeit, gemessen. Über die Fluoreszenz ist eine quantitative Bestimmung des genetischen Materials in der Ausgangsprobe möglich.

as, 22.04.2020