

## 1.Theoretischer Hintergrund

Die Molekularbiologie oder Molekulargenetik befasst sich mit den zellulären Vorgängen bei der Vervielfältigung, Übertragung und Expression des genetischen Materials.

Bei der **PCR** (**p**olymerase **c**hain **r**eaction) handelt es sich um ein Verfahren zur *in vitro*-Vervielfältigung (Amplifikation) definierter DNA-Sequenzen. Diese Amplifizierungsmethode wurde 1985 von Karry Banks Mullis entwickelt und ermöglicht es, innerhalb kürzester Zeit kleine Mengen DNA so stark zu vermehren, dass eine DNA-Analyse möglich ist. Die PCR findet Anwendung in der Kriminalistik, in der Medizin zur Diagnostik von Erbkrankheiten und zum Nachweis von Virus- oder Bakterieninfektionen (z.B. bei HIV), in der Gerichtsmedizin und bei vielen Verfahren der Molekular- und Mikrobiologie (Isolierung und Amplifizierung gesuchter DNA-Sequenzen aus genomischer DNA oder cDNA-Genbibliotheken).

Zum besseren Verständnis der PCR-Methode müssen zunächst jedoch der Aufbau der DNA und die Funktionsweise der Replikation erläutert werden.

### 1.1 Aufbau der DNA

Die **DNA** (Desoxyribonukleinsäure) ist der Träger der genetischen Information, die durch verschiedene Typen von **RNA** (Ribonukleinsäure) verwirklicht wird. Beide gehören zur Verbindungsklasse der **Nukleinsäuren**, die sich aus einzelnen Bausteinen, den Nukleotiden, zusammensetzen.

Jedes **Nukleotid** (siehe Abb.1) wiederum besteht aus 3 Einzelbausteinen, einer **Purin-** oder **Pyrimidinbase** (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin), einer **Pentose** (Desoxyribose bei der DNA, Ribose bei der RNA) und einem **Phosphatrest**.

Die Basen sind mit dem C'<sub>1</sub>-Atom des Zuckers über eine N-glycosidische Bindung verknüpft. Dieser Komplex aus Base und Zucker wird als **Nukleosid** bezeichnet.

Die Nukleoside werden je nach Base als Adenosin, Guanosin, Cytidin oder Thyminid bezeichnet.

## Polymerasekettenreaktion (PCR)

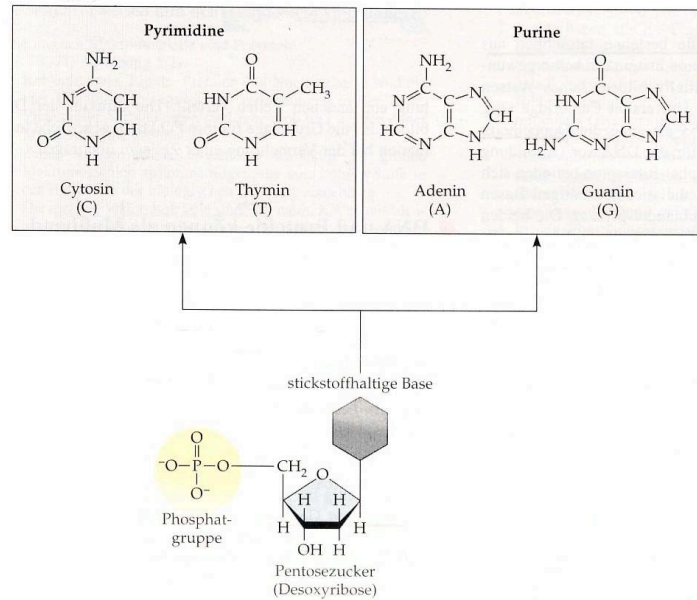


Abb. 1: Struktur der Nukleotide (Campbell, Biologie, S.91, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Der Phosphatrest ist ebenfalls (über eine Esterbindung am C'<sub>5</sub>-Atom) mit dem Zucker verknüpft und bildet mit diesem das sogenannte Rückgrat der DNA, von dem die stickstoffhaltigen Basen abstehen.

### 1.2 Struktur und Replikation der DNA

In der Regel liegt die DNA **doppelsträngig** vor, wobei die beiden Einzelstränge durch Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Basen zusammengehalten werden. Es paart sich immer Adenin mit Thymin (unter Bildung von 2 H-Brücken) und Guanin mit Cytosin (unter Bildung von 3 H-Brücken).

Die Polynukleotid-Ketten besitzen jeweils ein freies C'<sub>5</sub>-Atom an ihrem einen Ende und ein freies C'<sub>3</sub>-Atom an ihrem anderen Ende. Diese unterschiedlichen Enden verleihen dem Strang eine Richtung. Die beiden zu einem Doppelstrang verknüpften Polynukleotid-Stränge verlaufen **antiparallel**, das heißt, dass das 5'-Ende des einen Stranges dem 3'-Ende des anderen Stranges gegenüberliegt (siehe Abb.2).

Der Doppelstrang ist spiralgig gewunden und bildet dadurch eine **Doppelhelix**, die in unterschiedlichen Formen vorkommen kann.

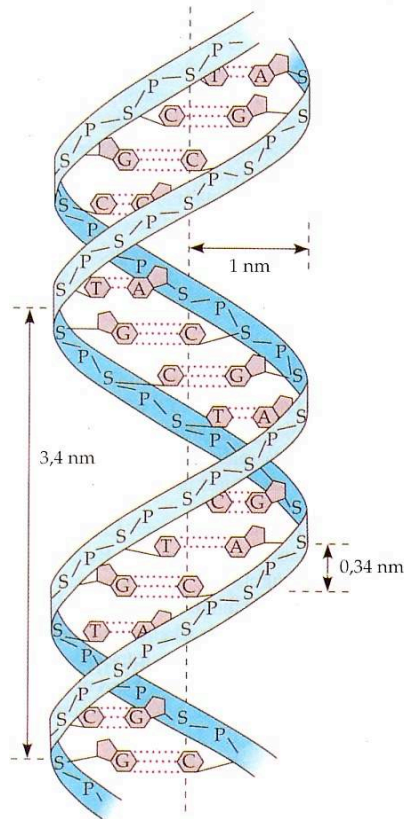


Abb.2: DNA-Doppelhelix (B-Form) (Campbell, Biologie, S.312, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

- **B-Form:** die B-Form ist die häufigste Form der DNA. Sie ist rechts gewunden und die Basenpaare sind senkrecht zu einer imaginären Zentralachse angeordnet. Jede Windung der Doppelhelix umfasst 10 Basenpaare und das Zucker-Phosphat-Rückgrat bildet eine große und eine kleine Rinne.
- **A-Form:** die A-Form ist ebenfalls rechtsgewunden. Allerdings liegen die Basenpaare hier nicht mehr senkrecht zur Zentralachse, sondern sind um ca. 70° verschoben. Jede Windung umfasst 11 Basenpaare, wodurch die Doppelhelix gedrängter erscheint. Außerdem besitzt sie keine großen und kleinen Rinnen.
- **Z-Form:** die Z-Form ist linksgewunden und besitzt ein zick-zack-förmiges Rückgrat. Man findet sie in bestimmten Abschnitten der B-Form, meist an Stellen mit vielen Guanin/Cytosin- Basenpaaren.

## Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Funktion eines Organismus ist es wichtig, dass die genetische Information einer Zelle bei der Mitose fehlerfrei und vollständig an ihre Tochterzellen weiter gegeben wird. Möglich wird dies durch die komplementären Einzelstränge der DNA. Jeder Strang kann als **Matrize** (Vorlage) zur Neusynthese des anderen dienen. Man bezeichnet diese Art der **Replikation** als **semikonservativ**. Ausgeführt wird sie durch **DNA-abhängige DNA-Polymerasen**.

Zur Replikation sind Einzelstränge notwendig. Sie beginnt an bestimmten Nukleotidsequenzen der DNA, den sogenannten **Replikationsursprüngen**.

Bei Prokaryoten gibt es nur einen solchen Ursprung. Bestimmte Proteine binden an diesen und leiten die Replikation in beide Richtungen (bidirektional) fort, bis das gesamte bakterielle Chromosom verdoppelt wurde

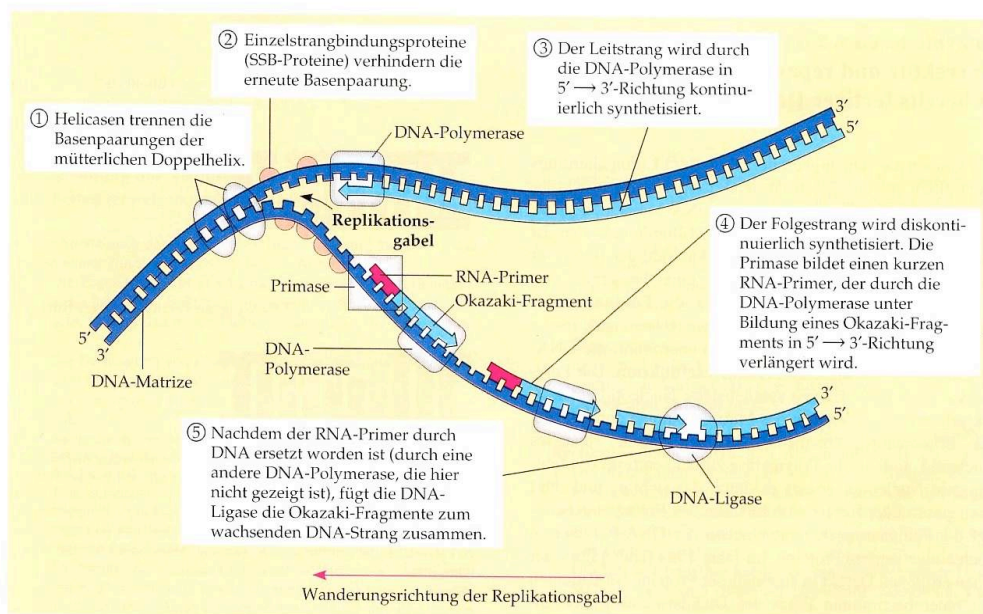


Abb.3: Zusammenfassung der DNA-Replikation (Campbell, Biologie, S.319, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Bei Eukaryoten gibt es mehrere Replikationsursprünge, diese bilden Replikationsblasen, welche schließlich miteinander verschmelzen und auf diese Weise die Replikation beschleunigen. An jedem Ende einer solchen Replikationsblase bildet sich eine **Replikationsgabel** (siehe Abb.3) an der sich die Doppelstränge in Einzelstränge auftrennen. Für die Auftrennung der Doppelstränge sorgt das Enzym **Helicase**, indem es die H-Brücken zwischen den Basenpaaren löst. Damit sich die getrennten Stränge nicht sofort wieder verbinden, heften sich **Einzelstrangbindungsproteine** an. Die DNA muss zusätzlich aber auch noch weitläufig entwunden werden, da sie sonst mit unglaublicher Geschwindigkeit um ihre eigene Achse rotieren würde. Darum wird das Rückgrat der DNA durch **DNA-**

**Topoisomerasen** gebrochen, bis sich die Helix „entdrillt“ hat und anschließend wieder repariert.

Nun kann die DNA-Polymerase III an der Replikationsgabel mit der Synthese des neuen Stranges beginnen. Problemlos verläuft dies aber nur in 5' → 3' -Richtung, da nur am 3'-Ende des DNA-Stranges Nukleotide angehängt werden können. Man bezeichnet diesen Strang, der **kontinuierlich** synthetisiert werden kann, auch als **Leitstrang**.

Der andere Strang wird **diskontinuierlich** synthetisiert und als **Folgestrang** bezeichnet. Hier wird durch das Enzym **Primase** ein **Primer** aus RNA-Nukleotiden aufgebaut, an welchem die DNA-Polymerase III ansetzen kann, um in 5' → 3' -Richtung bis zum nächsten Primer DNA zu synthetisieren. Die hierbei gebildeten DNA-Stücke werden zusammen mit dem Primer als **Okazaki-Fragmente** bezeichnet. Der RNA-Primer wird durch die Polymerase II durch DNA ersetzt und ein Enzym namens Ligase füllt die restlichen Lücken.

Die genetische Information ist durch die Nukleotidsequenz in der DNA gespeichert. Aus diesem Grund definiert man ein **Gen** als einen DNA-Abschnitt, der ein Polypeptid (meist ein Protein) codiert. Als **Genom** bezeichnet man die Gesamtheit aller codierenden und nicht codierenden Genabschnitte.

Die Gemeinsamkeit aller Lebewesen ist, dass sie zur Codierung der genetischen Information einen Triplet-Code verwenden (**Universalität des genetischen Codes**), allerdings codieren die Triplets bei verschiedenen Lebewesen manchmal für unterschiedliche Aminosäuren (z.B. bei der Proteinbiosynthese einiger mitochondrialer Proteine).

Ein Nukleotidtriplett (**Codon**) codiert eine ganz bestimmte Aminosäure. Aus vier verschiedenen Aminosäuren können  $4^3 = 64$  mögliche Dreierkombinationen gebildet werden. Das heißt, eine Aminosäure wird durch mehrere verschiedene Triplets codiert. Aus diesem Grund wird der genetische Code als **degeneriert** bezeichnet: man kann zwar eindeutig von einem Codon auf eine ganz bestimmte Aminosäure schließen, umgekehrt ist dies aber nicht möglich, da eine Aminosäure durch mehrere Triplets codiert wird.

Außerdem findet man im genetischen Code auch ein Startcodon (AUG), das gleichzeitig die Aminosäure Methionin codiert und drei Stoppcodons (UAA, UAG, UGA), die keine Aminosäure codieren.

## 1.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, handelt es sich bei der PCR um ein *in vitro*- Verfahren zur exponentiellen Verfielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Die amplifizierte DNA-Abschnitte werden auch als **Amplikons** bezeichnet.

Die PCR ist eine äußerst wirkungsvolle Alternative zur Klonierung mit Hilfe eines Plasmids oder eines Phagen, da sie viel schneller abläuft und ausschließlich *in vitro* durchgeführt wird.

### 1.3.1 Die Komponenten der PCR

Um DNA mit Hilfe einer PCR vervielfältigen zu können, benötigt man zum Reaktionsstart sog. **Amplimer** (Oligonukleotide), an deren Ende die Synthese des neuen Strangs beginnt. Da bei der PCR beide Stränge vermehrt werden sollen, benötigt man für jeden Strang einen Primer, der zu einem Sequenzbereich auf dem jeweiligen Strang komplementär ist. Man wählt die Primer so, dass die DNA-Synthese an beiden Strängen gegenläufig erfolgt und genau der DNA-Bereich amplifiziert wird, der zwischen den beiden Primern liegt.

Bei der Wahl des Primerpaares sollte darauf geachtet werden, dass beide in etwa den selben Schmelzpunkt besitzen (in etwa gleicher G/C- Gehalt) und ähnliche Eigenschaften zur Anlagerung an die Matrizen-DNA besitzen. Desweiteren sollten die Primer zwischen 20 und 30 Nukleotide lang sein und eine relativ hohe Hybridisierungstemperatur erlauben. In den Primern sollten, wenn möglich, alle vier Basen in etwa gleich häufig vorhanden sein. Die Sequenzen der Primerpaare an den 3'-Enden sollten weder intra- noch intermolekular komplementär sein, damit die Primer nicht mit sich selbst hybridisieren können.

Vor der Einführung hitzestabiler Polymerasen, wie z.B. der Taq- oder der Vent- Polymerase, konnte nur mit hitzeempfindliche Polymerasen, wie dem Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I gearbeitet werden. Der große Nachteil dieser hitzeempfindlichen Enzyme ist, dass sie bei jedem Zyklus neu zugesetzt werden mussten. Die **thermostabilen Polymerasen** müssen dagegen nur einmal (zu Reaktionsbeginn) zugesetzt werden.

Die DNA-Polymerasen bilden aus einzelnen **Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs)**, die extra zugegeben werden müssen, lange Polynukleotidketten; dabei synthetisieren sie einen zum Matrizenstrang komplementären Strang. Die Synthese erfolgt immer in 5' → 3'-Richtung. Wie oben bereits erklärt, benötigt die DNA-Polymerase stets einen Amplimer, damit die Amplifizierung stattfinden kann.

Zur DNA-Synthese stehen folgende dNTPs zur Verfügung: Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxycytidintriphosphat (dCTP). Diese dNTPs binden an die freie 3'-Hydroxylgruppe des Amplimers und synthetisieren einen zum *template*-Strang komplementären Strang.

Die verschiedenen hitzestabilen Polymerasen sind durch unterschiedliche Eigenschaften charakterisiert:

- *Taq-Polymerase*: die in unserem Versuch verwendete *Taq-Polymerase* (Enzym aus *Thermus aquaticus*) zeichnet sich durch seine hohe Prozessivität aus (DNA-Synthese mit einer Geschwindigkeit von 35 – 100 Nukleotiden pro Sekunde). Außerdem weist die *Taq-Polymerase* eine 5' → 3'- Exonucleaseaktivität auf, die Nukleotide vor der Polymerase abbaut.
- *Vent-Polymerase*: die *Vent-Polymerase* zeichnet sich durch eine 3' → 5'- Exonucleaseaktivität aus, die für eine größere Kopiergenauigkeit (als z.B. bei der *Taq-Polymerase*) sorgt.

Die *Taq-* und die *Vent- Polymerase* sind nur zwei Beispiele für hitzestabile DNA-Polymerasen, die bei der PCR verwendet werden. Es gibt natürlich zahlreiche weitere Enzyme, die verwendet werden können und sich durch andere Charakteristika auszeichnen.

Neben der **Matrizen-DNA**, den Primern, den dNTPs und der DNA-Polymerase muss der PCR-Ansatz noch **Puffer** und eine für das Enzym **geeignete Mg<sup>2+</sup>-Konzentration** enthalten. Für die *Taq-Polymerase* wird meist ein zehnfach konzentrierter Puffer (aus Tris-HCl, KCl und MgCl<sub>2</sub>) verwendet, den man vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 verdünnen muss.

Die Mg<sup>2+</sup>-Ionen bilden zusammen mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den Einbau der dNTPs von Bedeutung ist. Außerdem führen sie zu einer Stimulation der Polymeraseaktivität und zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur des DNA-Doppelstranges und der Bindung zwischen Primer und *template*.

### 1.3.2 Das Verfahren der PCR

Die PCR besteht aus drei sich mehrfach zyklisch wiederholenden Reaktionsschritten, der Denaturierung, der Primeranlagerung (*annealing*) und der DNA-Synthese.

Die drei Reaktionsschritte eines PCR-Zyklus:

- **Denaturierung**: Um die beiden DNA-Stränge trennen zu können, wird der Reaktionsansatz mit der zu amplifizierenden DNA kurzzeitig auf 95°C erhitzt.
- **Anlagerung der Primer (*annealing*)**: Die im Überschuss vorhandenen Amplimer hybridisieren mit den komplementären Bereichen der Matrizen-DNA. Die für diesen

Prozess geeignete Temperatur variiert in weiten Bereichen und ist stark von der Basenzusammensetzung der Hybridisierungsbereiche abhängig. Die Hybridisierungstemperatur sollte möglichst hoch sein (ca. 65°C), da es bei niedrigeren Temperaturen vermehrt zu Hybridisierungen der Stränge untereinander kommt. Außerdem paaren sich die Primer bei höheren Temperaturen spezifischer.

- **DNA-Synthese:** Ausgehend vom 3'-OH-Ende der Primer kommt es zur Synthese des zur Matrize komplementären Stranges durch die DNA-Polymerase. Die Temperatur bei diesem Reaktionsschritt entspricht der optimalen Temperatur der Polymerase und liegt im Falle der *Taq-Polymerase* bei etwa 72°C.

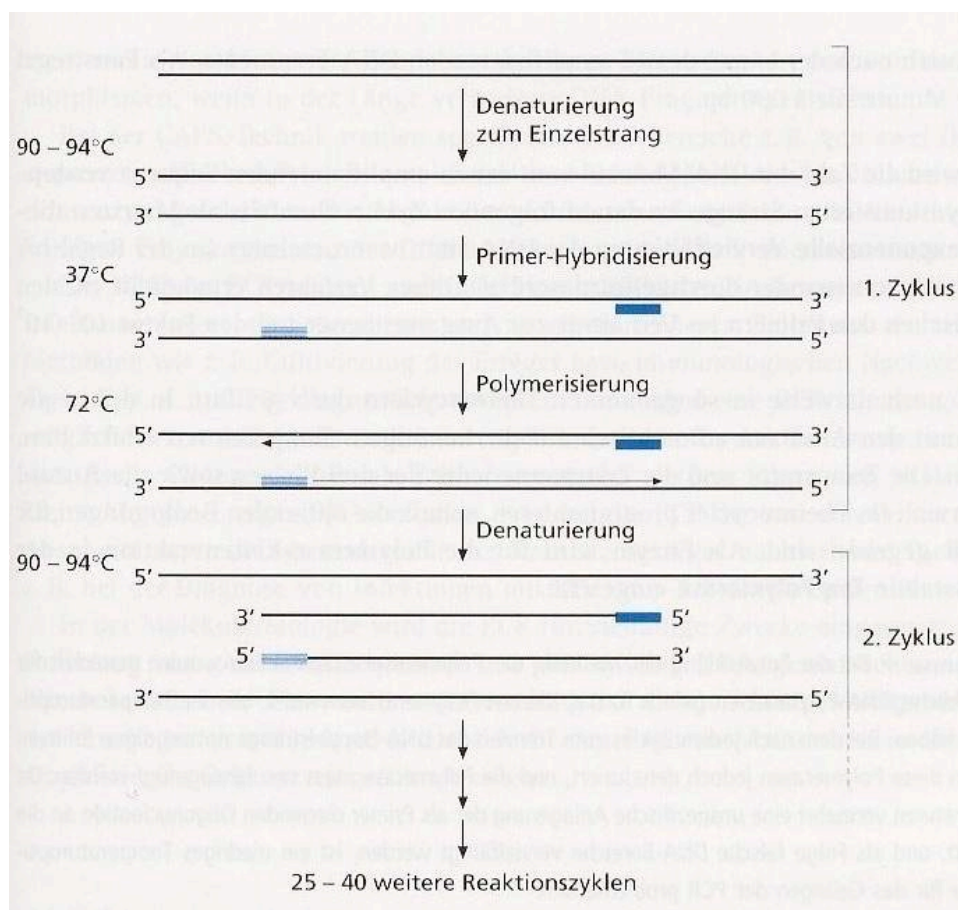


Abb. 4: Prinzip der PCR (Munk, Grundstudium Biologie, Bd. Genetik, S. 11-21, 2001, Spektrum-Verlag)

Die Dauer eines PCR-Zyklus richtet sich nach der Länge der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz. Als Faustregel gilt etwa eine Minute für 1000 Basenpaare.

Die Zahl der DNA-Moleküle mit der Sequenz, die amplifiziert werden soll, wird in jedem Zyklus verdoppelt. Die neusynthetisierten Stränge dienen im darauffolgenden Zyklus ebenfalls als Matrizen. Aus diesem Grund findet eine exponentielle Vervielfältigung der DNA statt, wenn mehrere Zyklen der PCR nacheinander ablaufen. Das Verfahren der PCR



ermöglicht die Vermehrung einer bestimmten Sequenz im Verhältnis zur Ausgangsmenge um den Faktor  $10^6 - 10^7$ .

Ein PCR-Zyklus wird in der Regel 25 – 40 mal wiederholt. Nach diesem Zeitraum nimmt langsam auch die Aktivität des Enzyms ab, da es durch die ständige Hitzezufuhr langsam denaturiert. Außerdem wird die Effektivität der Amplifizierung mit zunehmender Konzentration der gewünschten Stränge durch deren Hybridisierung untereinander vermindert.

Im ersten und zweiten Zyklus der PCR haben die neu synthetisierten DNA-Stränge noch keine definierte Länge, da die Polymerase so lange DNA synthetisiert, bis sie entweder von alleine abfällt oder vom Beginn einer neuen Amplifizierungsrunde unterbrochen wird.

Ab dem dritten Zyklus entstehen nur noch Sequenzen der gesuchten Länge, die durch die Position der Primer vorgegeben ist.

Die exponentielle Vermehrung der gesuchten DNA-Sequenz beginnt ab dem vierten Zyklus.

#### **1.4 Die Gelelektrophorese**

Bei der Elektrophorese erfolgt die Auftrennung der DNA durch die Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Form und Größe der jeweiligen DNA-Moleküle.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in der Regel in Gelen aus elektrisch neutralen Substanzen, die eine dreidimensional vernetzte Gitterstruktur bilden.

Agarosegele setzen sich aus gepufferter Salzlösung und Agarose (Polysaccharid aus Rotalgen) zusammen.

Während der Gelelektrophorese befindet sich das Gel zwischen einer Anode und einer Kathode in gepufferter Salzlösung, die den Stromfluss vermittelt. Die DNA-Proben werden in die Geltaschen auf der Seite der Kathode gegeben.

## Polymerasekettenreaktion (PCR)

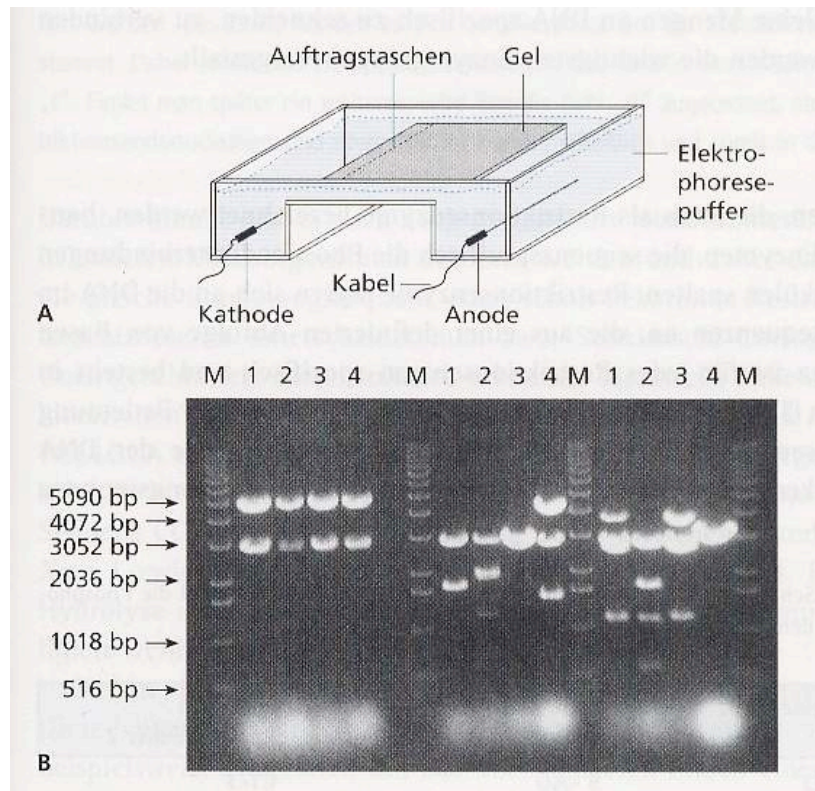


Abb. 5: Gelelektrophorese (Munk, Grundstudium Biologie, Bd. Genetik, S. 11-3, 2001, Spektrum-Verlag)

Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt ab von der Länge der DNA-Moleküle: kleine Fragmente bewegen sich schneller durch die Gelmatrix als große. Gleich große Fragmente wandern gleich schnell, sodass sie sich nach Beenden der Elektrophorese auf der selben Höhe befinden und eine Bande bilden. Das Bandenmuster gibt Aufschluss über die Anzahl und die Länge der DNA-Fragmente.

Wenn die Größe der unbekannter DNA-Fragmente ermittelt werden soll, muss außerdem noch ein Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Größen als Standard aufgetragen werden.

Damit die einzelnen Banden unter UV-Licht deutlich erkennbar sind, wird die DNA im Gel mit Ethidiumbromid, das im UV-Licht fluoresziert, angefärbt.

Außerdem werden die einzelnen Proben mit Bromphenolblau, das den Fragmenten im Gel voranwandert, versetzt, um zu vermeiden, dass eine Elektrophorese zu lange durchgeführt wird und so Fragmente aus dem Gel herauswandern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Durchführung

Von den DNA-Proben (*Taraxacum officinale*, *Ajuga reptans* und *Leucanthemum vulgare*) aus den vorherigen Nukleinsäureversuch und einer zusätzlichen Probe, mit garantiertem DNA-Gehalt wird eine 1:10-Verdünnung in bidestilliertem Wasser hergestellt.

Der PCR-Ansatz für die 50\_1-Tube wird nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

- β 5\_1 10X-Puffer (enthält bereit  $MgCl_2$ )
- β 2\_1 dNTPs (5mM)
- β 5\_1 Primer 1 (500ng)
- β 5\_1 Primer 2 (500ng)
- β 1\_1 DNA (Verdünnung)
- β 2\_1 taq-Polymerase
- β 30\_1  $H_2O_{bidest}$

Hierbei ist darauf zu achten, dass die Polymerase zuletzt zugegeben wird und die Proben zusätzlich sofort auf Eis gestellt werden, damit eine verfrühte Reaktion verhindert wird.

Insgesamt werden 12 Proben a 50\_1 PCR-Ansatz hergestellt, zusätzlich wird zu Kontrollzwecken eine 13. Probe ohne DNA hergestellt. Zu jeder DNA-Probe wird eines von 3 Primerpaaren hinzugegeben.

Diese Primer haben unterschiedliche Eigenschaften, die in untenstehenden Tabellen aufgeführt sind.

Tab.1: Eigenschaften des cox-Primerpaares

| Oligoname | Länge [kb] | Schmelztemperatur [°C] | Sequenz (5`-3`)                |
|-----------|------------|------------------------|--------------------------------|
| cox3      | 23         | 68                     | GCA TGA TGG GCC CAA GTT ACG GC |
| cox5      | 21         | 56                     | GTA GAT CCA AGT CCA TGG CTT    |

Das cox-Primerpaar amplifiziert für die Mitochondrien der Atmungskette, eine Cytochrom Oxidase.

Tab.2: Eigenschaften des P-Primerpaares

| Oligoname | Länge [kb] | Schmelztemperatur [°C] | Sequenz (5`-3`)                 |
|-----------|------------|------------------------|---------------------------------|
| P 1       | 24         | 83                     | CCT TCC CTA TTC ATT GCG GGT TGG |
| P 3       | 24         | 78                     | GGA ATC CTT CCA GTA GTA TCG GCC |

Das P-Primerpaar amplifiziert Gene für das Photosystem 2 der Chloroplasten.

Tab.3: Eigenschaften des 18S-Primerpaares

| Oligoname | Länge [kb] | Schmelztemperatur [°C] | Sequenz (5`-3`)            |
|-----------|------------|------------------------|----------------------------|
| 18 S1     | 20         | 79                     | GGG TTC GAT TCC GGA GAG GG |
| 18 S2     | 19         | 70                     | CAT TAC TCC GAT CCC GAA G  |

Das 18S-Primerpaar amplifiziert für eine nukleäre Gensequenz, die die Synthese einer Untereinheit der 18S-rRNA kodiert.

Die 13 Proben werden in Eppendorfgefäße überführt, und in die PCR-Maschine gestellt. Diese wird folgendermaßen programmiert:

- β 1min bei 95°C (Denaturierung, 5min beim 1.Durchlauf)
- β 30s bei 50°C (Hybridisierung der Primer)
- β 30s bei 72°C (Synthese der DNA)

Insgesamt durchläuft die PCR-Maschine das Programm 40 Mal.

Anschließend werden die Proben mit EtBr versetzt, welches die DNA (durch Interkalierung zwischen den Ringsystemen) unter UV-Licht sichtbar macht.

Dann werden 12\_1 jeder Probe zusammen mit 3\_1 eines blauen Ladepuffers in die Taschen des zur Gelelektrophorese verwendeten Agarosegels (0,8%ig, 150ml TBE-Puffer und 1,23g Agarosepulver) gegeben. Außerdem wird links und rechts der Proben , je ein 1kb-Marker aufgetragen. Die Gelelektrophorese läuft ca. eine Stunde lang bei ca. 120V. Danach wird die Gelplatte unter UV-Licht photographiert, und dadurch die DNA-Auftrennung sichtbar gemacht.

## 2.2 Ergebnisse

Es wurden zwei Photos, mit unterschiedlich langer Belichtungszeit gemacht (siehe Anhang). Die hellen Banden repräsentieren die DNA, wobei ihre Helligkeit abhängig von der Konzentration ist (je heller, desto höher konzentriert). Mit Hilfe des Markers lässt sich die Länge der DNA-Fragmente bestimmen.

Im Internet konnte auf der Website der NCBI die Sequenz der verwendeten Primer eingegeben werden. Das Programm suchte nach DNA-Sequenzen, die zu den Primern komplementär sind, und gibt deren Lage auf dem DNA-Strang an. Dadurch kann die Länge der neusynthetisierten DNA-Fragmente berechnet werden.

Tab. 4: Aufteilung der Spuren und Länge der DNA-Fragmente

| Probe                       | Spur | Primer | Bandenort im Gelfeld [bp] | Produktlänge [bp] aus Datenbank |
|-----------------------------|------|--------|---------------------------|---------------------------------|
| Leerwert                    | 1    | cox    | /                         | /                               |
| bereitgestellte DNA         | 2    | cox    | 400                       | 381                             |
|                             | 3    | P      | 500                       | 485                             |
|                             | 4    | 18S    | 600                       | 598                             |
| <i>Trifolium pratense</i>   | 5    | cox    | /                         | 381                             |
|                             | 6    | P      | /                         | 485                             |
|                             | 7    | 18S    | /                         | 598                             |
| <i>Taraxacum officinale</i> | 8    | cox    | 400                       | 381                             |
|                             | 9    | P      | /                         | 485                             |
|                             | 10   | 18S    | 600                       | 598                             |
| <i>Leucanthemum vulgare</i> | 11   | cox    | /                         | 381                             |
|                             | 12   | P      | /                         | 485                             |
|                             | 13   | 18S    | /                         | 598                             |

Wie zu erwarten sind auf dem Leerwert keine Banden zu erkennen. Die bereitgestellte Probe zeigt eine deutliche Bänderung bei 400, 500 und 600 bp, und einen Nebel im darunterliegenden Bereich. Bei *Trifolium pratense* und *Leucanthemum vulgare* sind keine DNA-Spuren erkennbar. Die *Taraxacum officinale*-Probe zeigt deutliche Banden bei 400 und 600bp, allerdings keinen Nebel.

## 2.3 Diskussion

Die von uns verwendeten Pflanzen waren in der Liste der Pflanzen, die zu den Primern komplementäre DNA-Sequenzen enthalten, nicht vorhanden. Deshalb ist die ganz genaue Länge unserer DNA-Fragmente nicht bestimmbar. Allerdings liegen die Banden der vorgegebenen Probe relativ genau im zu erwartenden Bereich, das zeigt dass die von uns durchgeführte PCR die gewünschten Fragmente enthielt. Das gleiche gilt für die cox- und 18S-Probe von *Taraxacum officinale*.

Die fehlenden Banden könnten auf eine zu gering konzentrierte Nukleinsäurezugabe zurückzuführen sein, oder unsauberes Arbeiten an anderen Stellen. Außerdem wäre es möglich, dass zwar DNA vorlag, diese aber nicht amplifiziert wurde, und nach dem PCR-Vorgang im Gel nicht mehr nachweisbar war, da sie nur äußerst schwach konzentriert war, und aufgrund ihrer Größe im Gel nicht weit wandert.

Bei dem aufgetretenen Nebel handelt es sich um die nicht verbrauchten dNTP's und Primer, welche aufgrund ihrer geringen Größe sehr weit im Gel gewandert sind.

Über die Helligkeit der Banden lassen sich Aussagen über die Häufigkeit der amplifizierten DNA-Fragmente in der Ausgangsprobe machen. So ist zum Beispiel die cox-Bande bei

*Taraxacum officinale* besonders hell, was auf eine hohe Anzahl von Mitochondrien schließen lässt.

## **2.4 Zusammenfassung**

Die PCR dient zur gezielten Vervielfältigung bekannter DNA-Sequenzen, und findet in vielen unterschiedlichen Bereichen Anwendung. Durch unseren Versuch konnten wir Einblick in die Grundlagen und Anwendungen dieser Methode gewinnen.

### 3. Weiterführende Fragen

#### Wo überall ist einer Pflanzenzelle DNA, wo RNA?

DNA liegt vor allem im Zellkern in Form von Chromosomen vor. Desweiteren findet man sie auch in Mitochondrien und Chloroplasten, da diese eine eigene DNA besitzen (Endosymbionten- Theorie). Die mitochondriale und plastidäre DNA gleicht aber eher prokaryotischer als eukaryotischer DNA.

RNA liegt sowohl im Kern als auch im Cytoplasma vor. Auch Mitochondrien und Chloroplasten besitzen ihre eigene RNA, die aber, ebenso wie deren DNA, von der Struktur her eher prokaryotischer als eukaryotischer RNA entspricht.

Ansonsten ist der Großteil der RNA als mRNA in den Ribosomen zu finden.

#### Wieviel $\mu\text{g}$ eines 500 bp langen PCR-Produktes lassen sich theoretisch mit je 30 pmol der Primer amplifizieren wenn kein anderer Faktor limitierend ist?

- durchschnittliche Molmasse eines bp: 330 g/mol
- mit je 30 pmol der Primer lassen sich  $n = 2 \cdot 30 \text{ pmol} = 60 \text{ pmol}$  Produktsequenzen erstellen
- daraus folgt:  $m = n \cdot l \cdot M_{\text{bp}} = 60 \text{ pmol} \cdot 500 \text{ bp} \cdot 330 \text{ g/mol} = 9,9 \mu\text{g}$

#### Woran kann es liegen, wenn man ein PCR-Produkt von einer anderen als der erwarteten Größe bekommt?

Die Amplimer können sich auch unspezifisch paaren. Solche Paarungen kommen vor allem im zweiten Reaktionsschritt eines PCR-Zyklus bei niedrigen Hybridisierungstemperaturen zustande.

Die Primer lagern sich dann auch an Bereiche an, die nicht ganz komplementär zu ihrer Sequenz sind. So kommt es zu einer Vermehrung von ungewünschten Artefakten, die auch das Endergebnis verfälschen.

#### Was könnte der nächste Schritt sein, wenn man kein oder zu viel PCR-Produkt in einem Ansatz erhalten hat?

Eine bedeutende Reaktionskomponente der PCR ist die  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration des Reaktionsmediums.

Bei zu niedriger  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration läuft die Vermehrung nur sehr schlecht und ungenau ab, weil die Aktivität der Polymerase gestört ist. In diesem Fall erhält man zu wenig PCR-Produkte.

Bei zu hoher  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration erhält man dagegen zu viele PCR-Produkte, die allerdings unspezifisch sind.

Aus diesem Grund muss also die Konzentration der  $Mg^{2+}$ -Ionen so gewählt werden, dass sie entsprechend den Eigenschaften der DNA-Polymerase optimal ist. So ist beispielsweise für die *Taq-Polymerase* eine Konzentration von 1,0 – 1,5 mM ideal.

Weitere limitierende Faktoren für die PCR sind die Enzymmenge, ihre Denaturierung durch übermäßige Hitzebelastung und die Hybridisierung der Stränge untereinander.

Außerdem sind auch noch die Höhe der Temperatur und die Konzentration der DNA von Bedeutung.

### **Wo liegen die wichtigsten Grenzen und Nachteile der PCR- Methode?**

Um überhaupt eine PCR durchführen zu können, müssen die spezifischen Oligonukleotidsequenzen, die die gewünschte Sequenz einrahmen, bekannt sein.

Der größte Nachteil der PCR liegt allerdings in der Bildung unspezifischer Artefakte, die durch erneute Vervielfältigungen in weiteren PCR-Zyklen mit amplifiziert werden und so das Endprodukt verfälschen oder unbrauchbar machen können.



## Literaturverzeichnis

- Campbell: Biologie, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum Verlag
- Munk: Grundstudium Biologie, Bd. Genetik, 2001, Spektrum Verlag
- Lewin: Molekularbiologie der Gene, 1998, Spektrum Verlag
- Skript zum Grundpraktikum Pflanzenphysiologie und molekulare Botanik SS 2003
- Alte Protokolle