Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 138 (1996)

Heft: 2

Artikel: PCR : Grundlagen und neue Entwicklungen

Autor: Berchtold, M.W. / Hübscher, U.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-589335

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 17.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Institut für Veterinärbiochemie, Universität Zürich-Irchel

PCR: Grundlagen und neue Entwicklungen

M. W. Berchtold und U. Hübscher

Zusammenfassung

Seit der Entwicklung der PCR vor 10 Jahren hat diese Methode mehr und mehr auch in der Praxis Fuss gefasst. Besonders für die Labordiagnostik hat die PCR aufgrund ihrer Empfindlichkeit, Genauigkeit und Geschwindigkeit neue Dimensionen eröffnet. Trotz der Verfügbarkeit von anwenderfreundlichen Labor-Kits sind grundlegende Kenntnisse für den Anwender von grossem Nutzen, vor allem wenn Optimierungen für spezifische Problemstellungen notwendig sind. Der generelle Reaktionsmechanismus und die Bedeutung der einzelnen Komponenten in einem PCR-Ansatz sowie die Reaktionsbedingungen werden einleitend besprochen. Einige kürzliche Entwicklungen der PCR-Technik (wie neue Enzyme, RNA-PCR, Verbesserung der Spezifität, Kontaminationsverhütung und Geräteentwicklungen), welche für den Anwender bedeutungsvoll sind, werden kurz dargestellt. Die abschliessend diskutierte «long PCR»-Technik soll exemplarisch zeigen, dass die Entwicklung der PCR dank intensiver Grundlagenforschung immer noch in vollem Gange ist.

Schlüsselwörter: PCR – DNA-Polymerase – long PCR

PCR: Basics and novel developments

Since its discovery 10 years ago PCR has been introduced for a variety of practical applications. PCR has opened new dimensions particularly in laboratory diagnostics because of its sensitivity, accuracy and speed. In spite of the availability of user friendly kits, basic knowledge is of great importance for the user especially if PCR has to be optimized for special needs or when specific problems arise. The general mechanism of the reaction and the significance of the reaction components and the PCR conditions are discussed initially. Several recent developments in PCR (new enzymes, RNA-PCR, improvements of the specificity, prevention of contamination and development of new equipment) that are critical for the user are shortly introduced. Finally, "long PCR" is discussed in order to demonstrate that even 10 years after the invention of PCR significant new breakthroughs in the PCR technology are still possible.

Key words: PCR – DNA-Polymerase – long PCR

Grundlagen

Wie im Editorial dargestellt, ist die PCR-Literatur in den letzten Jahren exponentiell angewachsen. Wir haben deshalb in diesem Artikel darauf verzichtet, Originalartikel zu zitieren. Um dem Anwender den Einstieg in die PCR-Literatur zu vereinfachen, erwähnen wir im folgenden einige PCR-Bücher, welche vor allem auf praktische Aspekte eingehen.

1. PCR Primer, a Laboratory Manual. Eds. *C.W. Dieffenbach, G.S. Dveksler.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995.
2. PCR Strategies. Eds. *M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky.* Academic Press, San Diego, 1995.
3. PCR (Polymerase-Kettenreaktion) im medizinischen und biologischen Labor - Handbuch für den Praktiker. *M. Wink, H. Wehrle.* GIT Verlag GmbH, Darmstadt, 1994.
4. PCR Protocols, Current Methods and Applications, Methods in Molecular Biology 15, Ed. *B.A. White.* Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993.
5. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Eds. *M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Snisky, T.J. White.* Academic Press Inc., San Diego, 1990.
6. PCR Topics. Usage of polymerase chain reactions in genetic and infectious diseases. Eds. *A. Rolfs, H.C. Schumacher, P. Marx.* Springer Verlag, Berlin, 1991.

DNA-Polymerasen: Zentrale Enzyme der DNA-Vermehrung bei sämtlichen Lebewesen und im Reagenzglas

In der Weihnachtsausgabe 1989 der Zeitschrift «Science», wurde die DNA-Polymerase zum Molekül des Jahres 1989 erkoren. Diese «Ernennung» beruht auf der praktischen Anwendbarkeit dieses Enzymes in der DNA-

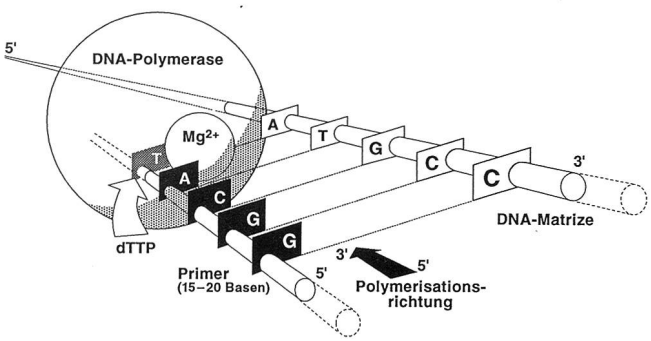


Abbildung 1: Die DNA-Polymerase-Reaktion Dargestellt ist ein DNA-Polymease-Molekül (Kreis), das an die DNA-Matrize gebunden ist und gerade eine Base (dTTP) an den Primer synthetisiert, der als Verankerungspunkt wirkt und aus 15–20 Basen besteht. Nur die letzten vier Basen (schwarz) des Primers sind gezeigt. Die Basenpaarregel nach Watson und Crick bestimmt, dass gegenüber Adenin ein Thymin und gegenüber Guanin ein Cytosin oder vice versa eingebaut wird. Die Polymerisationsrichtung (= DNA-Syntheserichtung) ist immer 5'-> 3'. Details siehe Text.

Diagnostik. In der Natur ist es von zentraler Bedeutung für die genaue Vermehrung der DNA (= DNA-Replikation) und für die ständige Korrektur von falsch synthetisierter oder beschädigter DNA (= DNA-Reparatur). Die Grundlagenforschung an DNA-Polymerasen hat in den letzten zehn Jahren ergeben, dass der Mechanismus dieser Enzyme von den niedrigsten Organismen bis zu den höchsten genau gleich ist. Diese funktionelle Konservierung ist auch auf struktureller Basis erhalten geblieben. DNA-Polymerasen von Bakterien und Menschen zeigen sehr grosse Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, was darauf hindeutet, dass auch ihre dreidimensionale Struktur sehr ähnlich ist.

Alle DNA-Polymerasen synthetisieren DNA nach demselben Prinzip der Basenpaarung (Abbildung 1). Die DNA besteht aus einer langen Kette, deren Natur durch die lineare Reihenfolge der vier Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin charakterisiert ist. Die DNA-Kette existiert in der Natur im allgemeinen als Doppelstrang, wobei die beiden Stränge durch eine einfache Gesetzmässigkeit zusammengehalten werden: Adenin paart sich immer mit Thymin und Guanin immer mit Cytosin. Die DNA-Polymerasen wählen von den vier Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin die richtige aus und reihen sie nach der oben erwähnten Basenpaarregel (Adenin zu Thymin beziehungsweise Guanin zu Cytosin) aneinander. Aus einer einzelsträngigen DNA entsteht somit während des Prozesses der DNA-Replikation eine doppelsträngige. Die Geschwindigkeit der Basenauswahl und der Polymerisierung ist ausserordentlich hoch und beträgt 100–1000 inkorporierte Basen pro Sekunde, mit weniger als einem Fehler pro Million Polymerisationsschritten. Damit die DNA-Polymerase mit der Synthese beginnen kann, braucht sie einen Verankerungspunkt, den man als Primer bezeichnet. Dieser ist in der Natur meistens ein kurzes Ribonukleinsäure-(RNA-)Stück. Im Reagenzglas aber – und dies ist bei der Diskussion der PCR wichtig – genügt als Primer ein kurzes DNA-Stück, das man als Oligonukleotid bezeichnet.

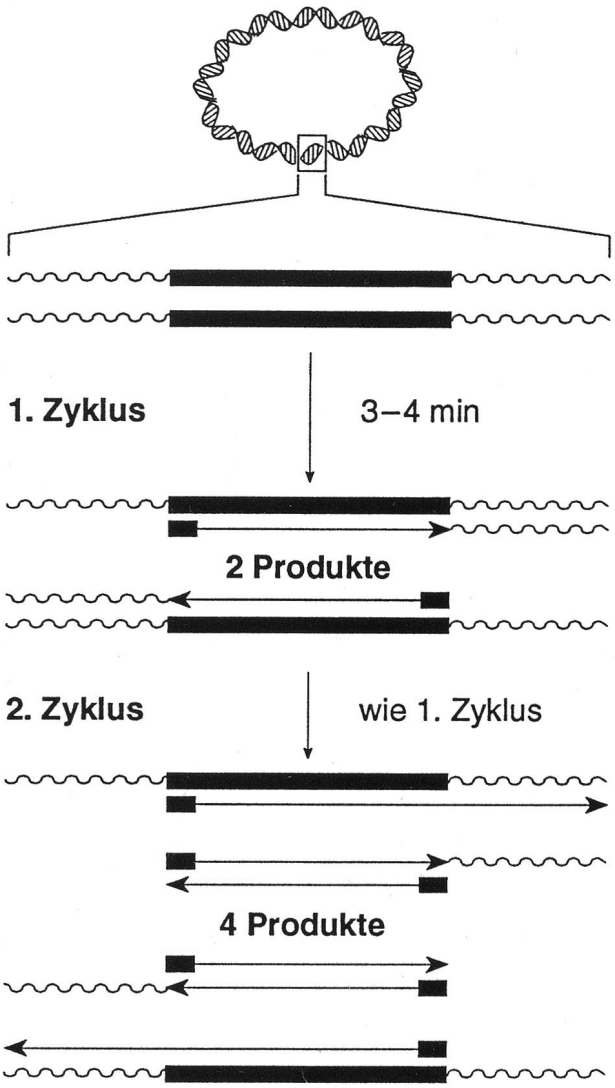
Die DNA-Polymerasen synthetisieren nur in der 5'->3'-Richtung an einer Matrizen-DNA (Abbildung 1). Die Synthese stoppt, sobald das Enzym das Ende der Matrize erreicht hat. Danach sucht es einen neuen Primer, und die DNA-Synthese läuft wieder in der 5'->3'-Richtung ab. Magnesium ist ein notwendiger physiologischer Kofaktor für alle DNA-Polymerasen, wobei die Synthesegenauigkeit sehr stark vom Verhältnis von Magnesium zu den vier Basen (Deoxyribonuleosid-5'-triphosphaten, dNTP) abhängig ist.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Experimentelle DNA-Vermehrung im Reagenzglas

Die eben erwähnten Eigenschaften der DNA-Polymerase können nun zur Reagenzglasvermehrung einer beliebigen DNA-Sequenz ausgenutzt werden, vorausgesetzt, eine solche Sequenz ist bereits bekannt. Dies soll am Beispiel einer Virusinfektion im Detail erläutert werden. Nehmen wir zum Beispiel an, es bestehe der Verdacht, dass bei einer Katze nur einige wenige Lymphozyten mit dem FI-Virus – dem Katzenaidsvirus – infiziert sind. Mit Hilfe der PCR kann das Virusgenom, das sich irgendwo ins Genmaterial einer einzelnen Zelle eingenistet hat, sozusagen als Nadel im Heustock gefunden werden. Die DNA wird aus einigen ml Blut der Katze extrahiert und mit der Polymerase-Kettenreaktion vermehrt. Abbildung 2 zeigt den Ablauf im Detail:

1. Durch Erhitzen auf 95 °C werden zuerst die beiden DNA-Stränge denaturiert, das heisst, in die beiden Einzelstränge zerlegt.
2. Danach wird die Temperatur im allgemeinen auf etwa 50–60 °C gesenkt. Nun hybridisiert man Oligonukleotide, die eine kurze, bereits bekannte Basensequenz des FI-Virus enthalten, an die DNA. Enthält ein einziges der DNA-Moleküle die FIV-Sequenz, so paaren sich die Oligonukleotide mit den komplementären Sequenzen (gemäss den Basenpaarungsregeln) und bilden damit eine Startstelle für die DNA-Polymerase (siehe auch Figur 1).
3. Als nächstes wird die DNA-Polymerase dazugegeben und die Reaktionstemperatur auf das Syntheseoptimum der DNA-Polymerase (im allgemeinen 70–75 °C) gebracht.
4. Nach Ablauf der Synthese werden wieder beide Stränge bei 95 °C denaturiert, bei 50–60 °C die Oligonukleotide hybridisiert und bei der dritten Temperatur (Synthesetemperatur) die Tochterstränge synthetisiert. Die gesamte Reaktion (Denaturierung, Hybridisierung und Synthese) dauert in der Regel 3–4 Minuten.

DNA-Polymerasen aus Säugetierzellen werden beim Erwärmen auf über 50 °C zerstört. Darum wurde aus hitzestabilen Archaebakterien eine DNA-Polymerase isoliert, die den Hitzeschritt (95 °C) im Gegensatz zu den herkömmlichen DNA-Polymerasen problemlos über-



	Ausgangs-matrize	Lange Produkte	Kurze Produkte
0. Zyklus	1	0	0
1. Zyklus	1	1	0
2. Zyklus	1	2	1
3. Zyklus	1	3	4
5. Zyklus	1	5	26
10. Zyklus	1	10	1'013
15. Zyklus	1	15	32'752
20. Zyklus	1	20	1'048'555
30. Zyklus	1	30	1'073'699'969
n. Zyklus	1	n	(2^n-n-1)

Abbildung 2: Die Polymerase-Kettenreaktion. Der detaillierte Ablauf der Reaktion ist im Text erläutert. Rechts ist die theoretische Produkteanhäufung nach 30 aufeindanderfolgenden Zyklen dargestellt.

steht, so dass nach Ablauf des 1. Schrittes der Reaktion keine zusätzliche Zugabe des Enzyms mehr notwendig ist. Diese DNA-Polymerase wird heute hauptsächlich aus *Thermus aquaticus* (daher Taq-DNA-Polymerase) gewonnen. Ein automatisiertes Wasserbad, das periodisch den Wechsel der drei Temperaturen (95 °C für Denaturierung der DNA, 50–60 °C zur Hybridisierung der Primer und 70–75 °C für die DNA-Synthese durch die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase) computergesteuert ausführt, kann in 2–3 Stunden 40 solche Zyklen ausführen, was einer theoretischen Vermehrung des FIV-Genabschnittes um eine Billion (10^{12}) entspricht (Abbildung 2). Im praktischen Experiment wird wegen der Limitierung des Systems durch die verschiedenen Komponenten der PCR eine Vermehrung von maximal 10^9 erreicht. Aus einem Molekül ist somit genügend Material für einen einfachen biochemischen Nachweis entstanden. Um dieselbe Menge FIV-DNA auf herkömmliche Weise (ohne Amplifikation) zu erhalten, würden 200 ml Blut benötigt (unter der Annahme, dass etwa 5000 Leukozyten pro ml Blut vorhanden und alle Zellen FIV-infiziert sind).

Neue Entwicklungen

Kürzliche Entwicklungen und Verbesserungen der PCR-Technik haben nicht nur die alltäglichen Arbeitsprozesse für den Anwender verbessert und vereinfacht, sondern ganz neue und früher undenkbare Anwendungen in den verschiedensten Gebieten ermöglicht. Einige dieser Entwicklungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Dabei kann unterschieden werden zwischen Entwicklungen, welche aus dem besseren Verständnis von biologischen und biochemischen Zusammenhängen zustande gekommen sind, und solchen, bei denen es sich um

Tabelle 1: Neue Entwicklungen der PCR

- Enzyme mit «neuen» Eigenschaften
- Direkte RNA-Amplifizierung
- Hot Start und andere Mittel zur Erhöhung der Spezifität
- Anti-Kontaminationsmassnahmen
- Neue Zykler und Detektionsmethoden
- Long PCR

einen rein technischen Fortschritt handelt, der aus dem allgemeinen Bestreben zur Automatisierung und Vereinfachung von Laborprozessen resultierte.

Neue DNA-Polymerasen

Die am häufigsten verwendete DNA-Polymerase für die PCR ist, wie erwähnt, die *Taq*-DNA-Polymerase, welche aus *Thermus aquaticus* isoliert wird. In den letzten Jahren ist eine ganze Reihe weiterer Enzyme mit «speziellen» Eigenschaften auf den Markt gekommen. Zudem wurde auch vor kurzem damit begonnen, bereits charakterisierte DNA-Polymerasen mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese auf die gewünschten Eigenschaften hin masszuschneidern. Für den Erfolg dieser Entwicklung sind die Grundlagenkenntnisse über die Enzymologie der Replikation und die Struktur der daran beteiligten Proteine von entscheidender Bedeutung. Sicher liegt die Zukunft nicht im Design einer «Super-DNA-Polymerase», die alle Zwecke erfüllen kann, sondern man wird für verschiedene Anwendungen sowohl in der Forschung als auch in der Diagnostik unterschiedliche Enzyme einsetzen. Beispielsweise ist für die Routinediagnostik zur Identifizierung von Mikroorganismen, vor allem wenn viele Proben analysiert werden müssen, die Zeitdauer der Analyse wichtiger als die Fehlerrate der DNA-Polymerase. Im Gegensatz dazu ist die Situation genau umgekehrt, wenn es um Sequenzieranalysen in der Grundlagenforschung geht, wo kein Fehleinbau toleriert, jedoch eine gewisse Zeiteinbusse in Kauf genommen werden kann. Die verschiedenen heute kommerziell erhältlichen DNA-Polymerasen, welche aus diversen thermophilen Organismen gewonnen werden, unterscheiden sich vor allem in gewissen biochemischen Eigenschaften. Für Effizienz, Genauigkeit, Geschwindigkeit der Reaktion und Produktelänge ist die Frage entscheidend, ob das Enzym neben der 5'->3'-Polymeraseaktivität zusätzlich noch Exonukleaseaktivitäten entweder in 3'->5'- oder in 5'->3'-Richtung oder Endonukleaseaktivität besitzt. Dabei findet man für verschiedene Enzyme stark unterschiedliche optimale Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH, Mg^{2+} und K^{+}-Ionen sowie K_m für dNTPs und Detergentienzusätze) und unterschiedliche Bandbreiten dieser Bedingungen, unter welchen die Enzyme noch PCR durchführen können.

Direkte RNA-Amplifizierung

Die RNA-PCR oder RT-PCR ist ein immer wichtigeres Werkzeug für Forschung und Anwendung. Bisher wurde für diesen Prozess zunächst die reverse Transkriptase zur Synthese von DNA verwendet, gefolgt von der PCR mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Vor kurzem sind nun hitzestabile Polymerasen mit RT-Aktivität (rTth) entdeckt worden. Damit kann RNA-PCR in einem einzigen Reaktionsschritt durchgeführt werden. Da die Reaktionsbedingungen für beide Prozesse unterschiedlich sind (die RT-Aktivität der DNA-Polymerase braucht Mn^{2+}-Ionen, und die eigentliche DNA-Polymerase benötigt Mg^{2+}-Ionen als Kofaktor), wird die RT-Reaktion in einem kleinen Volumen durchgeführt (10–20 µl). Durch Zugabe des Polymerase-Puffers in einem grösseren Volumen (100 µl) wird das Mangan verdünnt und durch Mg^{2+}-Ionen ersetzt. Deshalb kann die ganze Reaktion in einem Röhrchen durchgeführt werden. Bisher war der Einsatz dieses Enzyms beschränkt, da nur kurze Produkte synthetisiert werden konnten. Neue rTth-Enzyme versprechen ähnliche RT-Eigenschaften, wie man sie bei der konventionellen RT aus Retroviren findet. Zudem sind bereits Laborkits erhältlich, bei welchen ein Puffer verwendet wird, der es ermöglicht, beide Reaktionen in derselben Reaktionslösung ablaufen zu lassen. Ein wichtiges Problem bei der RNA-PCR ist die Kontamination durch DNA. Wenn Transkripte von Genen, die keine Introns haben, untersucht werden, können kleinste Mengen DNA falschpositive Resultate erzeugen. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, ist der Einsatz von dNTP-Analogen, welche den Schmelzpunkt der neu synthetisierten Produkte herabsetzen. Es kann dann mit Denaturierungstemperaturen gearbeitet werden, bei denen die kontaminierende DNA doppelsträngig bleibt und somit nicht mehr als Matrize dienen kann.

Erhöhung der Spezifität durch Hot Start und Lösungsmittelzusätze

Ein häufiges Problem bei der PCR ist das unspezifische Priming. Dies kann durch die Verwendung der Hot-Start-Methode verhindert werden. Dabei wird eine notwendige Komponente (DNA-Polymerase, Primer, dNTP oder Mg^{2+}) erst bei einer Temperatur zugegeben, welche über der Hybridierungstemperatur der Primer liegt. Dies kann ebenfalls automatisiert werden, indem die Reaktionslösung mit einem Wachs überschichtet wird, worauf die limitierende PCR-Komponente pipettiert wird. Das Mischen der Komponenten erfolgt dann bei erhöhter Temperatur, sobald das Wachs geschmolzen ist. Eine andere Methode ist die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen die DNA-Polymerase, welche bei erhöhter Temperatur denaturiert werden und dadurch ihre Aktivität verlieren. Zur Erhöhung der Stringenz der Reaktion werden häufig auch organische Lösungsmittel, sogenannte «Cosolvents», wie z. B. Dimethylsulfoxid und Glyzerin eingesetzt, welche unspezifische Polymerisationsreaktionen begrenzen. Daneben helfen solche Zusätze auch, sogenannt «schwierige» Sequenzen, zum Beispiel solche mit hohem GC-Gehalt oder repetitive Elemente, in einzelsträngiger Form zu halten.

Anti-Kontaminationsmassnahmen

Für eine erfolgreiche PCR vor allem in der Routinediagnostik ist das Vermeiden von DNA-«carry-over»-Kontaminationen sehr wichtig. Nebst der physischen Tren-

Expand Beyond the Limits of *Taq* DNA Polymerase

Better yields and fidelity than *Taq*

Achieve 2-fold higher yields and up to 3-fold greater fidelity with the Expand™ PCR System from Boehringer Mannheim. The result is stronger bands than *Taq* DNA polymerase* can offer. From even smaller amounts of short and long templates. With fewer misincorporations.

E = amplification with Expand High Fidelity; T = amplification with *Taq*; M = Molecular Weight Marker.

Perform PCR not possible with *Taq*

Two Expand blends combine the high processivity of our *Taq* DNA polymerase* with the proofreading accuracy of our exclusive *Pwo* DNA polymerase*, delivering better results than *Taq* DNA polymerase.

Expand High Fidelity

- increases yields and fidelity for improved PCR cloning experiments–even from difficult templates
- exhibits a greater tolerance for [Mg^{2+}] variations, ensuring consistent PCR results.

Expand Long Template

- amplifies human genomic DNA of up to 27 kb
- amplifies λDNA of up to 40 kb.

Don't let *Taq* limit your research possibilities

Expand places premium performance within striking distance. Order today to begin to see striking results.

Expand™ is a trademark of Boehringer Mannheim.

* Purchase of these products is accompanied by a limited license to use them in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for life science research in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Perkin-Elmer or as purchased, i.e., an authorized thermal cycler.

© 1995 Boehringer Mannheim. All Rights Reserved.

EXPAND™

PREMIUM PCR PERFORMANCE

Striking Results – *In the wild, a thin line separates predator and prey. When the falcon crosses that line, it does so with lightning speed and accuracy. Striking with a precision that delivers uncompromising results.*

mannheim boehringer *Biochemicals*

For more information contact your local Boehringer Mannheim representative

Austria Tel.: (0222) 277 87 DW 420 to 423

Germany Tel.: (0621) 759 8545

Switzerland Tel.: (042) 65 42 42

DIE EDV-LÖSUNG FÜR GROSS- UND KLEINTIERPRAXEN:

OBLONDATA

DOS, MAC, WINDOWS.

Deutsch, Français, Italiano. Vielseitig, einfach, übersichtlich
...besser.

«DER SERVICE ENTSCHEIDET»

Amacker & Partner
INFORMATIK

Amacker & Partner, Aemtlerstrasse 30, CH-8003 Zürich, **Telefon: 01/463 12 36** - Telefax: 01/463 18 53

Kennen Sie unsere Fachbuchabteilungen für veterinärmedizinische Bücher?

Wir führen Literatur zu den wichtigsten Gebieten.

Ihnen fehlt die Zeit, bei uns vorbeizuschauen?
Dann bestellen Sie **gratis** Ihren Fachprospekt.
Wir stellen Ihnen darin eine Auswahl von Titeln vor, die in den Jahren 1993–1995 erschienen sind.

Natürlich können Sie bei uns sämtliche lieferbaren Bücher, Zeitschriften und CD-ROM-Publikationen rund um die Uhr bestellen.

– **neu auch über Internet:** http://www.huberag.ch
über E-Mail: buchhandlung@huberag.ch

Buchhandlung
Hans Huber
Marktgasse 59
3000 Bern 9
Telefon 031 326 46 46
Telefax 031 326 46 56

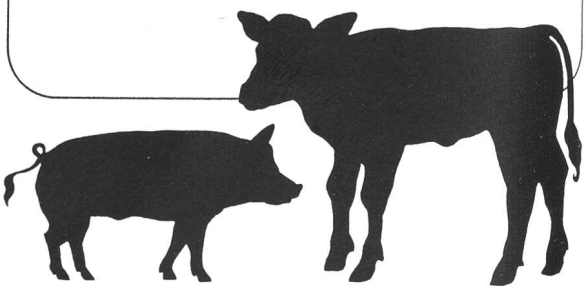
Buchhandlung
Hans Huber
Zeltweg 6
8032 Zürich
Telefon 01 252 33 60
Telefax 01 252 86 18

❑ Ich bestelle den Prospekt «Veterinärmedizinische Bücher»
❑ Senden Sie mir bitte regelmässig Prospekte zu.

Name
Vorname
Strasse/Nr.
PLZ/Ort

Von Tierärzten für Tierärzte
Par des vétérinaires pour les vétérinaires

Medizinalkonzentrate
Concentrés médicamenteux



MEDIVET AG/SA

Telefon 042-41 15 22
Telefax 042-41 30 42

nung der hintereinanderfolgenden Arbeitsprozesse in 3 bis 4 Arbeitsbereiche und genereller Sorgfalt bei den Laborarbeiten hat sich ein enzymatisches Verfahren durchgesetzt. Dabei wird kontaminierende DNA aus vorhergehenden PCRs zerstört und den Reaktionen anstelle von dTTP die Base dUTP zugegeben. Mittels des Enzyms Uracyl-Glykosylase wird die auf diese Weise produzierte DNA für eine weitere Amplifikation inaktiviert. Eine zweite Möglichkeit zur Zerstörung von kontaminierender DNA ist die UV-Bestrahlung von Reaktionskomponenten. Dabei können die Bedingungen so gewählt werden, dass kurze, einzelsträngige DNA wie beispielsweise die Oligonukleotide dabei nicht beschädigt werden.

Neue, schnellere PCR-Zykler mit automatisierten Detektionssystemen

Die technische Entwicklung von PCR-Geräten ist in den letzten Jahren rasch vorangeschritten. Neuere Generationen von PCR-Geräten haben den Vorteil gegenüber älteren Modellen, dass sie eine bessere Temperaturkonstanz ermöglichen. Die Geschwindigkeit der Temperaturübergänge kann durch den Einsatz von dünnwandigen Reaktionsgefässen gesteigert werden. Das Überschichten der Reaktionsmischung mit Mineralöl entfällt bei neueren Geräten, da die Reaktion auch vom Deckel der Reaktionsgefässe her thermostatisiert werden kann. Für das Verarbeiten von vielen Proben ist es besonders für Routinelabors wichtig, die Detektionsverfahren zu automatisieren. Neue Entwicklungen tendieren in Richtung automatisierte Zykler mit «On-line»-Detektionssystemen. Bereits heute sind Geräte kommerziell erhältlich, welche analog zu ELISA-Verfahren funktionieren und deshalb mit automatischen ELISA Lesegeräten kombiniert werden können. Schliesslich können auch für die Probenvorbereitung in der PCR-Diagnostik Laborroboter eingesetzt werden.

Long PCR

Ein Beispiel einer neuen und unvorausgesehenen Entwicklung mit grossem Potential ist die «long PCR»-Methode, welche erstmals 1994 beschrieben wurde. Damit ist es heute möglich, DNA bis zu einer Länge von 50000 Basen zu amplifizieren. Pionierarbeit leistete dabei Wayne Barnes in Denver, Colorado, USA, der als erster vorschlug, PCR mit zwei verschiedenen Typen von DNA-Polymerasen durchzuführen. Die einen (z. B. Taq, rTth und Hot Tub) besitzen keine und die anderen (z. B. Vent, Deep Vent, Pfu und Pwo) sehr potente 3'->5'-Exonuklease-Aktivität. Die Schlüsselparameter für die «long PCR» sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Von zentraler Bedeutung für die «long PCR» ist die Qualität der Matrizen-DNA. Reaktionsbedingungen, im speziellen die Verwendung von Puffern (z. B. Tricine anstatt Tris-HCl) mit erhöhtem pH (ca. 9), die Länge der Denaturierungszeit sowie die Zugabe von «Cosolvents» (organische Lösungsmittel, z. B. Dimethylsulfoxid) und Enzymstabilisatoren (Glyzerin) sind ebenfalls sehr wichtig für die «long PCR». Schädigungen an der DNA scheinen das Hauptproblem für das Erreichen von langen PCR-Produkten zu sein. Ein tiefer pH-Wert begünstigt DNA-Schädigungen; DNA-Strangbrüche treten mit höherer Rate während der Denaturierung auf, wenn die DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Die Denaturierungsbedingungen müssen deshalb optimiert werden, um eine vollständige Strangtrennung zu erreichen, ohne jedoch die DNA allzulange der schädlichen hohen Temperatur auszusetzen.

Tabelle 2: Schlüssel-Parameter für die «long PCR»

- DNA-Polymerase (Qualität und Konzentration): Taq, rTth, Hot Tub
- 3'->5'-Exonuklease (Qualität und Konzentration): Vent, Deep Vent, Pfu, Pwo
- Matrizen-DNA-Qualität
- Primer (Sequenz, Länge, Konzentration)
- dNTP-Konzentration
- Reaktionsbedingungen (Puffer mit hohem pH, Salzkonzentration, «Cosolvents»)
- Denaturierungszeit zur vollständigen DNA-Strang-Trennung
- Temperatur für effizientes und genaues Primer-Annealing
- Inkubationszeit für vollständige DNA-Synthese
- Vermeidung von unspezifischen Produkten durch Hot Start

Tabelle 3: Anwendungen der «long PCR»

- Genomprojekte (Mensch, Rind, Schwein, Hund), Kartierung, Sequenzierung
- Analyse von ganzen viralen Genomen
- Analyse von langen DNA-Fragmenten (z. B. aus Genbanken)
- Analyse von Genen (Exon/Intron-Struktur, Klonierung, Sequenzierung)
- Analyse von langen Transkripten
- Medizinische Diagnostik (z. B. Erbkrankheiten)
- Abstammungsanalysen (enhanced Fingerprinting, hochmolekulare RFLP)
- Somatische Gentherapie
- Forensische Applikationen

Tabelle 3 zeigt einige Anwendungsmöglichkeiten der «long PCR». Für die Veterinärmedizin scheinen besonders Anwendungen im Bereich der Genomforschungen interessant. Ganze virale Genome können mit «long PCR» amplifiziert werden. Die «long PCR» ermöglicht auch, ganze Gene aus dem Gesamtgenom zu isolieren. Dies kann dazu benutzt werden, bei genetischen Krankheiten betroffene Gene zu identifizieren und Mutationen (z. B. Deletionen) zu analysieren. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit liegt bei der Analyse von Genbanken. Mit der «long PCR» ist es möglich, genomische DNA, die in Bakteriophagen-λ-Genbanken inseriert wurde, direkt zu amplifizieren und sie somit viel effizienter als mit herkömmlichen Methoden zu untersuchen. Schliesslich eröffnet die «long PCR» auch neue Wege für die Abstammungsanalyse.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Für den PCR-Anwender ist es in verschiedener Hinsicht bedeutsam, die Eigenschaften der verwendeten DNA-Polymerasen sowie die Grundlagen der Reaktionsmechanismen genau zu kennen. Nur so kann er den Erfordernissen entsprechend optimale Lösungen für eine individuelle Anwendung finden. Nach 10 Jahren PCR ist die Erweiterung in die verschiedensten Gebiete noch in vollem Gange. Forschungsarbeiten an Hochschulen und in der Industrie lassen voraussagen, dass neue und ungeahnte Applikationen bald möglich sein werden. Die rasante Entwicklung der Forschung und der Technologietransfer vom Forschungs- ins Diagnostiklabor ist dabei von entscheidendster Bedeutung für die rasche Nutzung der neuen und grossartigen Möglichkeiten, welche uns die PCR eröffnet.

Korrespondenzadresse: Dr. M. Berchtold, Universität Zürich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

ASAL INFORMATIK

- Einfache Bedienung
- Schneller, komfortabler Rechnungslauf
- Schnittstelle zu GST-Herdenprogramm
- Integrierte Buchhaltung
- Anschluss von Analysegeräten
- Individuell konfigurierbar
- Und vieles mehr .....

Tierarzt-Programm

Interessiert?

Verlangen Sie eine unverbindliche Demo in Ihrem Haus unter der Telefonnummer

061 / 751 80 30 (9.00 - 16.00 Uhr)

Asal Informatik & Co.
EDV-Generalunternehmung
Buchackerweg 14
CH-4146 Hochwald

VETMIX

Medizinalvormischungen bestehend aus Wirksubstanzen mit einem indifferenten Excipiens verdünnt. **IKS registriert.**

Vorteile :
- leichte Beimischung in jedes Futter
- günstige Preise

CHLORAMPHENICOL Palmitat 20%	Nr. 41860
CHLORAMPHENICOL Succinat 20%	Nr. 41861
CHLORTETRACYCLIN HCL 20%	Nr. 41862
CHLOR-TETRA PLUS "S"	Nr. 52310
COLISTIN Sulfat 300	Nr. 51337
GENTAMICIN Sulfat 2%	Nr. 51433
GRISEOFULVIN 10%	Nr. 51311
NEOMYCIN Sulfat 20%	Nr. 41864
SULFADIMIDIN Na 20%	Nr. 41866
"666" (SULFA + TRIMETHOPRIM)	Nr. 42466

CASE POSTALE 1522 LUCENS Tél. 021 906 85 39

IZOVAL SA