

PCR Polymerase Ketten-Reaktion

Die **Polymerase-Kettenreaktion** (englisch *polymerase chain reaction*, **PCR**) ist eine Methode, um die Erbsubstanz DNS *in vitro* zu vervielfältigen. Dazu wird ein Enzym verwendet, die DNA-Polymerase.

grundlegende Komponenten:

- Die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält (Template)
- Zwei Primer, um auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt wird.
- DNA-Polymerase, die bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird, um den festgelegten Abschnitt zu replizieren (kopieren) (z. B. Taq-Polymerase)
- 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

Die Polymerase-Kettenreaktion findet in einem sogenannten Thermocycler statt.

Ablauf

1. **Denaturierung** (Melting, Schmelzen): Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94–96 °C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Danach wird schnell auf 65 °C abgekühlt, um die Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern.
2. **Primerhybridisierung** (*primer annealing*): Die Temperatur wird ca. 30 Sekunden lang auf einem Wert gehalten, der eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt. (Temperatur von 55 bis 65 °C)
3. **Elongation** (Extending, Polymerisation, Verlängerung, Amplifikation): Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Die Temperatur hängt vom Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase ab (68–72 °C). Dieser Schritt dauert etwa 30 Sekunden je 500 Basenpaare.

Übliche Thermocycler kühlen die Reaktionsansätze nach Vollendung aller Zyklen auf 4–8 °C, so dass eine PCR am Abend angesetzt werden kann und die Proben am Morgen darauf weiterverarbeitet werden können.