

SHORTLIST 2007

Kategorie: Wissenschaft / RWS

FACHZEITSCHRIFT DES JAHRES –  
PREIS DER  
DEUTSCHEN FACHPRESSE



D13808F · ISSN 0947-0867

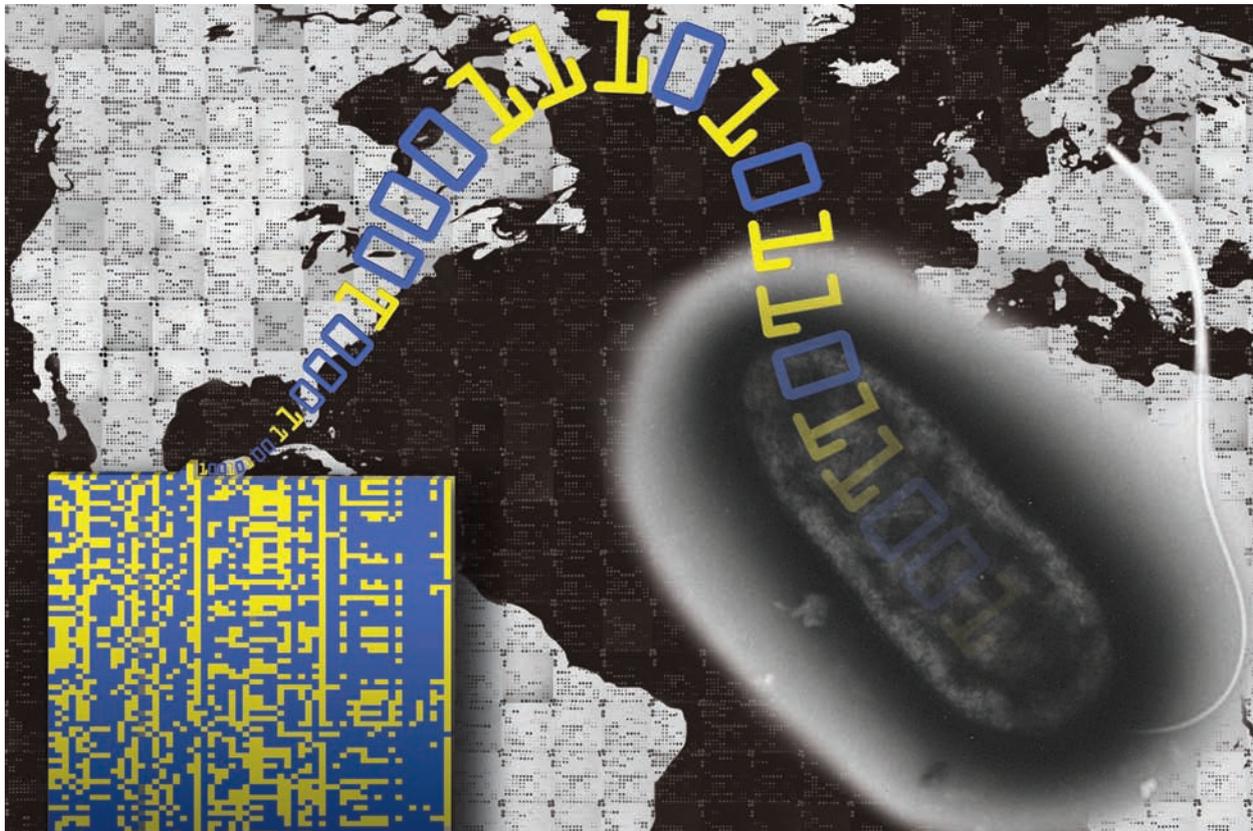
[www.biospektrum.de](http://www.biospektrum.de)

# BIO *spektrum*

Das Magazin für Biowissenschaften

06

Oktober 2007  
13. Jahrgang



Sonderdruck aus Methoden & Anwendungen

## DNA-Polymerase & Annealingtemperatur

KAY TERPE  
SENSOQUEST GMBH, GÖTTINGEN

**Spektrum**  
AKADEMISCHER VERLAG



**VBio**  
Verband | Biologie, Biowissenschaften  
& Biomedizin in Deutschland

## PCR-Faktoren

# DNA-Polymerase & Annealingtemperatur

KAY TERPE

SENSOQUEST GMBH, GÖTTINGEN

1983 wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) von Kary Mullis entdeckt. Was damals eine nobelpreiswürdige Entdeckung war, ist heutzutage in jedem molekularbiologischen Labor eine Standardtechnik. Im Prinzip benötigt man eine DNA-Polymerase, dNTPs, eine Template-DNA, Oligonukleotide, divalente Kationen, eine Pufferlösung und einen Thermocycler. Aber auch eine etablierte Technologie wird immer weiter optimiert. Schwachstellen des Prozesses sind unter anderem der Zeitaufwand, die Fehlerrate und die Reproduzierbarkeit.

### Zeitaufwand der PCR

Die Dauer einer PCR hängt im Wesentlichen von den Heiz- und Kühlraten des Gerätes, der Temperaturregelgeschwindigkeit und den Extensionsraten der DNA-Polymerasen ab. Die Heiz- und Kühlraten korrelieren mit dem Material, aus dem der Thermoblock besteht. Man findet heutzutage hauptsächlich Thermocycler, die entweder Aluminium- oder Silberblöcke enthalten. Silberblöcke besitzen eine deutliche bessere Wärmeleitfähigkeit als vergleichbare aus Aluminium. Mit Ausnahme von Diamant besitzt Silber mit 429 W/mK die beste Leitfähigkeit (Tab. 1).

Material	Wärmeleitfähigkeit (W/mK)
Diamant	2.300
Silber	429
Gold	310
Aluminium	237
Natrium	141
Kalium	135
Eisen	80
Glas	1
Wasser	0,6
Plastik	0,2–0,4
Luft in dünnen Schichten	0,02

**Tab. 1:** Wärmeleitfähigkeiten verschiedener Substanzen. Als Wärmeleitfähigkeit bezeichnet man die Fähigkeit eines Materials, thermische Energie mittels Wärmeleitung zu transportieren. W: Watt, m: Meter, K: Kelvin.

Aus Silber lassen sich Blöcke mit sehr gleichförmiger Temperaturverteilung herstellen, die trotzdem eine kleine Wärmekapazität haben – eine Voraussetzung für hohe Heiz- und Kühlraten bei effizientem Energieeinsatz.

Die Leitfähigkeiten der Reaktionsgefäße und des Reaktionsansatzes hingegen liegen bei 1 W/mK und sind damit vergleichsweise schlecht. Hohe Heiz- und Kühlraten können auch PCR-Prozesse inhibieren, weshalb viele Thermocycler optional mit reduzierten Rampenraten arbeiten können. Interessanterweise scheint die Übertragbarkeit der Protokolle von einem auf ein anderes Gerät nicht immer gewährleistet, auch wenn die gleichen Parameter eingestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass trotz gleicher Angaben der Hersteller Abweichungen vorliegen müssen<sup>[1]</sup>.

### DNA-Polymerasen

Die Extensionsraten der DNA-Polymerasen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Dauer der PCR. Je schneller ein Enzym die Nukleotide einbaut, desto kürzer ist die Elongationsphase. Die Extensionsraten der verschiedenen hochprozessiven DNA-Polymerasen liegen zwischen 0,5 und 7,8 Kilobasen pro Minute (Tab. 2). Wünschenswert sind Enzyme mit einer hohen Extensionsrate bei gleichzeitig niedriger Fehlerrate. Aber gerade in diesem Bereich sind die publizierten Daten sehr heterogen. Dies gilt sogar für ein und dasselbe Enzym. Im Wesentlichen liegen die Fehlerraten zwischen  $9 \times 10^{-5}$  und  $1 \times 10^{-6}$  (Tab. 2). Die zwei Zehnerpotenzen Varianz bedeuten, dass eine Base von 10.000

oder von 1.000.000 falsch ist! Zudem hängt die Fehlerrate von der Nukleotidkonzentration und dem pH-Wert ab. Und auch in der Toleranz gegenüber Kationen wie Magnesium, Kalzium oder Natrium unterscheiden sich die verschiedenen Enzyme erheblich. Erschwerend kommt hinzu, dass selbst das zu untersuchende Ausgangsmaterial wie Blut, Käse oder Fleisch eine inhibitorische Wirkung auf die Polymerasen hat. Auch hier tolerieren die Polymerasen unterschiedliche Konzentrationen. So akzeptiert die Taq nur 0,002 Prozent Blut, die Tfl-Polymerase hingegen 20 Prozent<sup>[2]</sup>. Die Aktivität der Enzyme korreliert sehr stark mit den Halbwertszeiten bei hohen Temperaturen (Tab. 2). Während die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eine geringe Halbwertszeit von zehn Minuten bei 97 °C hat, haben andere Enzyme wie z. B. die Deep Vent aus den *Pyrococcus*-Stämmen eine deutlich längere mit acht Stunden bei 100 °C. Die abnehmende Aktivität der Polymerase kann man bei den modernen Thermocyclern über ein Zeitinkrement kompensieren, welches eine Verlängerung der Elongationsphase von Zyklus zu Zyklus ermöglicht (Long-PCR).

Dem Anwender steht eine Vielzahl an Polymerasen zur Verfügung, die je nach Anwendung und Spezifität eingesetzt werden (Tab. 2). Bedauerlicherweise hat das Überangebot an DNA-Polymerasen zu einer Vielzahl an Namen geführt, die zum Teil aus Marketing-Aspekten eingeführt wurden und auf keinem wissenschaftlichen Fundament basieren.

### Annealingtemperatur

Eine weitere Variable ist die Annealingtemperatur, die meist anhand der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) geschätzt wird. In den meisten Labors werden von den berechneten Schmelztemperaturen 3 °C bis 5 °C Grad abgezogen. Viele Formeln stehen dem Anwender zur Verfügung, um die Schmelztemperatur zu bestimmen<sup>[3]</sup>. Die am häufigsten verwendete Formel

$$T_m = (A+T) \times 2 \text{ °C} + (G+C) \times 4 \text{ °C}$$

wurde ursprünglich für Hybridisierungsversuche mit Oligonukleotiden bei einer 1 M-

Polymerase mit Ursprung	Optimale Extensions-Temperatur	Extensionsrate [kbp/min]	Einige publizierte Fehlerraten	5'→3'/3'→5'-Exonuklease-Aktivität	Extra Nukleotid-Anhang	Halbwertszeit
Deep Vent <i>Pyrococcus</i> Spezies GB-D	75 °C	1,4	2,7×10 <sup>-6</sup> 1,2×10 <sup>-5</sup> 8,0×10 <sup>-5</sup>	nein/ja (4fach höher als Vent)	95 % blunt	95 °C/23 h 100 °C/8 h
Deep Vent (exo <sup>-</sup> )	75 °C	1,4	2,0×10 <sup>-4</sup>	nein/nein	70 % blunt 30 % Einzelbasen	95 °C/23 h
KOD1 <i>Thermococcus kodakaraensis</i>	75 °C	6,0–7,8	2,6×10 <sup>-6</sup>	nein/ja	blunt	95 °C/12 h 100 °C/3 h
Pab oder Isis <i>Pyrococcus abyssi</i>	70–80 °C	–	2,0×10 <sup>-6</sup> 6,6×10 <sup>-7</sup>	nein/ja	blunt	100 °C/5 h
Pfu <i>Pyrococcus furiosus</i>	72–80 °C	0,5–1,5	1,3×10 <sup>-6</sup>	ja/ja	blunt	95 °C/95 % Aktivität nach 1 h Inkubation
Pfu (exo <sup>-</sup> )	72–80 °C	0,5–1,5	4,7×10 <sup>-5</sup>	nein/nein	blunt	95 °C/95 % Aktivität nach 1 h Inkubation
Pwo <i>Pyrococcus woesei</i>	72 °C	–	–	nein/ja	blunt	100 °C/2 h
Taq <i>Thermus aquaticus</i>	75–80 °C	2–4,5	8,9×10 <sup>-5</sup> 7,2×10 <sup>-5</sup> 8,0×10 <sup>-6</sup> 3,3×10 <sup>-6</sup>	ja/nein	3'A	97 °C/10 min 95 °C/40 min
Tli oder Vent <i>Thermococcus litoralis</i>	72–80 °C	1	5,7×10 <sup>-5</sup> 4,4×10 <sup>-5</sup> 2,4×10 <sup>-5</sup> 2,8×10 <sup>-6</sup>	nein/ja	95 % blunt ends	95 °C/6,7 h 100 °C/1,8 h
Tli oder Vent (exo <sup>-</sup> )	72–80 °C	1	1,9×10 <sup>-4</sup> 5,4×10 <sup>-6</sup>	nein/nein	70 % blunt 30 % Einzelbasen	95 °C/6,7 h 100 °C/1,8 h
Tfl <i>Thermus flavus</i>	70–74 °C	2–4	–	ja/nein	3'A	97 °C/10 min 95 °C/40 min
Tth <i>Thermus thermophilus</i>	70–74 °C	2,0	–	ja/nein	3'A	95 °C/20 min
UITma <i>Thermotoga maritima</i>	65–75 °C	–	7,4×10 <sup>-5</sup> 5,0×10 <sup>-5</sup> 3,2×10 <sup>-5</sup>	nein/ja	95 % blunt	97,5 °C/50 min

**Tab. 2:** Einige thermophile DNA-Polymerasen mit ausgewählten Eigenschaften wie Herkunft, Extensionstemperatur, Extensions- und Fehlerrate, Exonuklease-Aktivität, Nukleotid-Anhang und Halbwertszeit.

Salzkonzentration entwickelt und ist für eine Primerkonstruktion größer 20 bp zu ungenau.

Besser sind da schon die Formeln:

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \text{ °C} \times \log_{10} ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) + 0,41 \text{ °C} \times (\text{G} + \text{C})\% - 675/\text{bp Primer}$$

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \text{ °C} \times \log_{10} (\text{J}^+) + 0,41 \text{ °C} \times (\text{G} + \text{C})\% - 600/\text{bp Primer}$$

mit J<sup>+</sup>= gesamte Kationenkonzentration

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + 0,41 \text{ °C} \times (\text{G} + \text{C})\% - 650/\text{bp Primer}$$

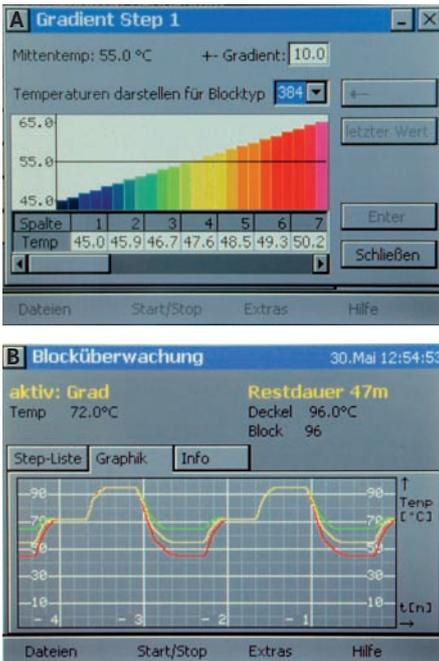
Aber auch online kann man sich die T<sub>m</sub> berechnen lassen, z. B. unter: [www.promega.com/biomath/calc11.htm](http://www.promega.com/biomath/calc11.htm)

Um die optimale Annealingtemperatur zu ermitteln, wird häufig ein Temperaturgradient gefahren. Diese Option bieten viele moderne Thermocycler (**Abb. 1**). Ein maximaler Gradient von ± 10 °C scheint sinnvoll, da man bei noch größeren Werten schon in die Aktivitätsbereiche der DNA-Polymerasen hineingelangen würde.

Unspezifisches Anlagern der Oligonukleotide an die Matrizen kann man durch den Einsatz von Temperaturdekrementen reduzie-

ren. Bei diesem „Touchdown-PCR“ genannten Verfahren wird die Annealingtemperatur von Zyklus zu Zyklus verringert.

Es scheint offensichtlich, dass für die Optimierung einer PCR unter Umständen viel Aufwand betrieben werden muss. Umso wichtiger ist es, bei diesem sensiblen Prozess die Reproduzierbarkeit zu erhalten. Im Laufe der Zeit hat sich aus diesem Grunde eine relativ konservative Einstellung durchgesetzt. Dennoch gibt es immer wieder Weiterentwicklungen, die eine methodische Verbesserung mit sich bringen und etablierte Systeme ablösen. ■



◀ **Abb. 1:** A, Temperaturdarstellung eines Gradienten von  $\pm 10$  °C bei einem Mittelwert von 55 °C in einem 384-Well-Silberblock. B, Blocküberwachung eines LabCyclers einer Gradienten-PCR ( $\pm 10$  °C) mit einer Mitteltemperatur von 55 °C, Elongationstemperatur von 72 °C sowie Denaturierungs- und Heizdeckeltemperatur von 96 °C in einem 96-Well-Silberblock. Verlauf: grüne Linie Annealingtemp.<sup>Max</sup>, gelbe Linie Annealingtemp.<sup>Mittel</sup>, rote Linie Annealingtemp.<sup>Min</sup>.

**Literatur**

[1] Schoder, D., Schmalwieser, A., Schaubeger, G., Hoorfar, J., Kuhn, M., Wagner, M. (2005): Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2724–2728.  
 [2] Abu Al-Soud, W., Rådström, P. (1998): Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3748–3753.  
 [3] von Ahsen, N., Wittwer, C. T., Schütz, E. (2001): Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg<sup>2+</sup>, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin. Chem.* 47: 1956–1961.

**Korrespondenzadresse:**



Dr. Kay Terpe  
 SensoQuest GmbH  
 The Next Generation of  
 Thermocyclers  
 Hannah-Vogt-Straße 1  
 D-37085 Göttingen  
 Tel.: 0551-250-3244 oder  
 0551-389195 23  
 Fax: 0551-389195 24  
 k.terpe@sensquest.de  
 www.sensquest.com

# WWW. SENSQUEST .COM

- Deutsch & Englisch
- Gradient, Rampe, Inkremente
- Heiz-, Kühlrate: 4,2°C/sec, 3,2°C/sec
- Geringer Stromverbrauch
- Farbiger Touchscreen
- Intuitive Software
- Schnell-Blockwechsel-System
- Silberblöcke 384, 96, 48



## The Next Generation of Thermocyclers