

Molekulargenetische Untersuchungsmethoden in unserem Labor

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wird ein sequenzspezifisches, komplementäres Oligonukleotidpaar (Sense und Antisense Primer), thermostabile DNA-Polymerase und ein Mix der 4 Nukleotide Guanin (G), Adenin (A), Thymin (T) und Cytosin (C) benötigt. Die Primer haben eine Länge von etwa 18–40 Basenpaaren und werden so ausgewählt, dass die Zielsequenz zwischen ihnen liegt. Die Auswahl der Primer ist ebenfalls ein kritischer Schritt, da neben der Amplifikation von unspezifischen Produkten vor allem die Amplifikation von Pseudogenen vermieden werden muss. Pseudogene sind inaktivierte Gene, deren Sequenz den zu untersuchenden Genen sehr ähnlich ist, wodurch falsche Ergebnisse entstehen können. Die PCR wird in einem speziellen Gerät durchgeführt (Thermocycler), welches in der Lage ist, die Temperatur des Reaktionsblocks sehr rasch zu ändern. Verschiedene Temperaturen sind notwendig, um die DNA zunächst zu denaturieren (Bildung von Einzelsträngen bei 95°C), dann die Anlagerung der Primer zu ermöglichen (sog. Annealing bei 50–65°C) und schließlich die Elongation der Primer entlang der DNA-Matrize zu einem neuen Tochterstrang zu gewährleisten (Temperatur-Optimum der DNA-Polymerase bei 72°C). Dieser Vorgang (Denaturierung, Annealing, Strangelongation) wird auch PCR-Zyklus genannt und 30–60 mal wiederholt. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich idealerweise der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt, die Gesamtreaktion dauert etwa 2–3 Stunden. Vorteile dieser einfachen und universell einsetzbaren Methode sind ihre Robustheit, Spezifität und Sensitivität. Auch geringste Spuren von DNA können mit dieser Methode nachgewiesen und diagnostischen Zwecken zugänglich gemacht werden. Dieser Vorteil bedingt allerdings auch den größten Nachteil: die Kontaminationsgefahr. Aus diesem Grund ist stets darauf zu achten, dass eine DNA-Probe möglichst nicht mit DNA-haltigem Material anderer Individuen in Berührung kommt. Zusätzlich werden in jedem Assay entsprechende Kontaminationskontrollen mitgeführt.

DNA-Sequenzanalyse nach Sanger (Sanger-Sequenzierung)

Diese Methode dient der Aufklärung der Primärstruktur von DNA

Die Suche und der Nachweis unbekannter Mutationen erfordern im Gegensatz zur zielgerichteten Diagnostik aufwändigere Verfahren, die von der Größe der zu untersuchenden Gene abhängen. Auch mit der Einführung neuer Sequenziertechnologien (Next Generation Sequencing/NGS) ist die direkte DNA-Sequenzanalyse der einzelnen codierenden Abschnitte (Exons) eines definierten Gens sowie deren angrenzende Regionen nach Amplifikation durch PCR noch der Goldstandard.

Frederick Sanger entwickelte eine Methode, durch die neue DNA enzymatisch erzeugt wird, welche anschließend analysiert werden kann (Kettenabbruch-Synthese). Bei der Didesoxy-Methode der Sequenzierung (Kettenabbruch-Synthese) wird neben der DNA-Polymerase und dem Nukleotid-Mix zusätzlich fluoreszenzmarkierte Stoppnukleotide (Dideoxy-Nukleotide) eingesetzt, bei deren Einbau es zu einem Abbruch der Reaktion an dieser Stelle kommt. Hierdurch entstehen fluoreszenzmarkierte Kettenabbruchprodukte unterschiedlicher Länge, die sich in einem Polyacrylamid-Gel der Größe nach auftrennen und mittels Laserlichtanregung darstellen lassen. Für dieses Verfahren wurde Frederick Sanger 1980 mit seinem 2. Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.