3 Darstellung der entwickelten Applikation

Bei der entwickelten und zu etablierenden Applikation handelt es sich um eine PCR-basierte Methode zum Nachweis von Basenaustauschen, kleineren Insertionen und Deletionen, die durch den Einsatz der SSCP dargestellt werden können. Abbildung 3 erläutert das Prinzip des Verfahrens.

An humaner genomischer DNA wird mit einem Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Oligonukleotid), die eine Mutation oder polymorphe Stelle im Genom flankieren, eine spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer sind beide mit unterschiedlichen, universellen Oligonukleotidsequenzen verlängert und dienen somit als „template“ (Basis) für den nächsten Schritt. Die universellen Oligonukleotidsequenzen kommen nicht im zu untersuchenden Material vor, so dass sie die spezifische PCR nicht stören, sondern lediglich koamplifiziert werden. Anschließend werden zwei unterschiedliche universelle Oligonukleotide zum PCR-Produkt zugegeben, die komplementär zu den verlängerten Enden der Vorwärts- und Rückwärtsprimer sind. Beide universellen Oligonukleotide sind an ihrem 5’-Ende mit je einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach der erneuten Amplifikation liegen somit zwei genomische DNA-Doppelstränge (Allel 1 und Allel 2) als Kopie vor, wobei jeder Einzelstrang mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Alternativ werden für eine Ein-Schritt-PCR alle vier Oligonukleotide in eine Reaktion zusammengegeben, in der die spezifische und die universelle PCR hintereinander als ein Reaktionsschritt läuft. Die am 5’- Ende fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte werden denaturiert und schnell abgekühlt. Die schnelle Abkühlung bewirkt, dass sich die komplementären Einzelstränge nicht wieder zu Doppelsträngen zusammenlagern. Bei der kapillarelektrophoretischen Trennung unter nichtdenaturierenden Bedingungen im Polymer genügt ein einziger Unterschied in der Basensequenz, damit sich unterschiedliche Faltstrukturen in den beiden Strängen ausbilden (SSCP). Dabei nimmt jeder DNA-Einzelstrang eine seiner Sequenz entsprechende Konformation an, was zu unterschiedlichen Laufeigenschaften der Stränge führt. Da die Stränge mit jeweils zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann die Laufbande beider Stränge separat als „Peak“ ausgewertet werden. Um Sequenzunterschiede in den Amplikons zu sehen, wird immer eine Wildtyp-DNA-Probe mit den zu untersuchenden Proben verglichen. Ist das Fluoreszenzmuster nicht gleich, so handelt es sich bei der

unbekannten Probe um einen Mutationsträger bzw. einen Polymorphismus. Die gefundene Variation im jeweiligen Amplikon kann zur Bestätigung sequenziert werden. Ist die Untersuchung als Zwei-Schritt-PCR durchgeführt worden, kann dafür ein Aliquot des spezifischen PCR-Produktes mit unmarkierten komplementären universellen Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer sequenziert werden.

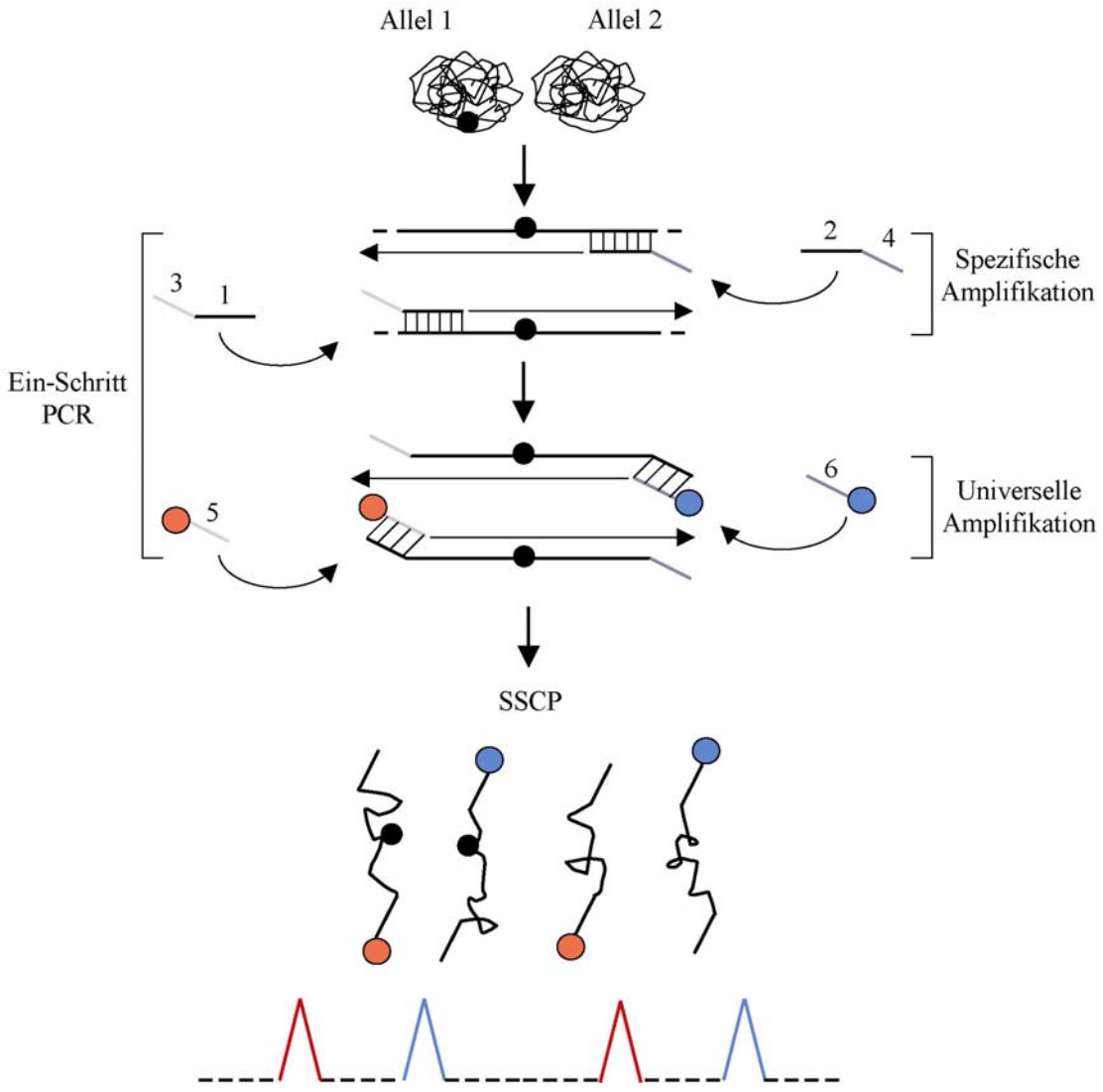

Abbildung 3: Schematische Darstellung der entwickelten und angewandten Applikation zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen auf der DNA. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer bestehen aus einem spezifischen und universellen Anteil. Der universelle Bereich enthält keine humane Sequenz. Bei einer spezifischen PCR hybridisiert nur der spezifische Anteil der Primer an die DNA. Bei einer anschließenden universellen Amplifikation können komplementäre fluoreszenzmarkierte universelle Primer zur Markierung eingesetzt werden, um die Konformation von PCR-Produkten während einer SSCP zu untersuchen. *1* Vorwärtsprimer am 5'-Ende verlängert durch eine universelle Oligonukleotidsequenz *3*. *2* Rückwärtsprimer am 5'-Ende verlängert durch eine universelle Oligonukleotidsequenz *4*. *5* Am 5'-Ende fluoreszenzmarkierte universelle Oligonukleotidsequenz komplementär zu 3. *6* Am 5'-Ende fluoreszenzmarkierte universelle Oligonukleotidsequenz komplementär zu *4*.