

Download Flash

 [Get Adobe Flash player](#)

Polymerase Kettenreaktion

DNA zugänglich machen

Die meisten Menschen in der Molekularbiologie sind heute nicht alt genug, um sich an Prä-PCR zu erinnern. Aber versuchen Sie, Ihre Arbeit ohne sie zu erledigen, und Sie werden sehen, welchen Unterschied diese einfache kleine Technik gemacht hat.

„Polymerase-Kettenreaktion“ ist jetzt ein Wort in Merriam Websters Collegiate Dictionary und wenn Sie „PCR“ in Google eingeben, erhalten Sie 18.000.000 Treffer. Wenn Sie „PCR-Song“ eingeben, erhalten Sie ein nettes kleines Liedchen von Bio-Rad, das in Ihrem Gehirn herumrasselt wie eine verrückte Katze in Ihrer Garage. [Versuch es.](#)

Als ich im Frühjahr 1983 auf die PCR stieß, versuchte ich, die Nachfrage nach Oligonukleotiden zu steigern, die mein Labor vor der Automatisierung von Hand hergestellt hatte. Unsere neue Maschine von meinem Freund Ron Cook bei Biosearch auf der anderen Seite der Bucht von San Francisco hatte die Arbeitsplatzstabilität im Labor bedroht, indem sie das, wofür wir ungefähr drei Wochen gebraucht hatten, in acht Stunden erledigte – und das alle acht Stunden, ohne Pausen.

Mein Versuch war erfolgreich. Die Nachfrage stieg um etwa eine Million und ich musste keinen meiner Laborkollegen bei Cetus entlassen.

Ich fuhr eine lange und kurvenreiche Straße zwischen Cloverdale und Boonville in Mendocino County hinauf, auf dem Weg zu meiner Wochenendhütte. Meine Freundin schlief und ich war praktisch nüchtern (oder die Straße hätte mein Verderben bewiesen), aber es war spät in der Nacht und ich fühlte mich komisch. Auf 128 waren mir schon seltsame Dinge passiert. Heimliche alte Männer in ... was war das? Ein graues Gewand. In diesem Bereich. Ich habe nichts gesehen. Oder verlorene Zeit: das ausgeprägte Gefühl, das meine frühere Frau teilte, als sie in Boonville einfuhr und sich daran erinnerte, dass wir gerade Cloverdale verlassen hatten, jetzt fünfunddreißig Meilen südöstlich. „Wo sind wir gewesen?“ Ich weiß es nicht; es scheint, als wären wir gerade in Cloverdale gewesen.“ Es war diese Art von Straße, aber heute Nacht, mitten auf dieser Strecke bei Kilometerstein 46,58.

Oligonukleotide sind erstaunliche kleine Dinger, aber mit nur einem Oligonukleotid ist es nicht möglich, eine bestimmte Stelle auf der menschlichen DNA physisch zu lokalisieren. Wenn das menschliche Genom zufällig wäre, würde ein 17-Nukleotid-Oligomer eindeutig eine Position entlang der 6 bis 7 Milliarden Basen in denaturierter menschlicher DNA spezifizieren. Aber es ist nicht zufällig, und jeder 17-mer, der darin ist, ist wahrscheinlich mehr als einmal darin, oder zumindest ist eine etwas andere Version darin. Anfang der achtziger Jahre konnte man das nicht mit Sicherheit wissen, und es gibt kompliziertere Argumente dafür, warum das so ist, aber wenn man sich Gele mit vollständiger menschlicher DNA ansah, die in Restriktionsfragmente zerlegt und mit 20-meren sondiert wurde, sah man a viele Schmierereien. Keine wirklich scharfen Banden wie die Restriktionsverdau von Bakteriophagen-DNA, die Sie als Marker verwenden könnten. Sie waren scharf. Wollte man also eine menschliche DNA-Sequenz genau untersuchen, musste man sie klonen. Zerhacken Sie die DNA in Stücke von mehreren tausend Basenpaaren, isolieren Sie jede davon, indem Sie sie in einer bestimmten Bakterienkolonie züchten, finden Sie heraus, welche Kolonie Ihr Lieblingsstück enthielt, nehmen Sie es von einer Platte und züchten Sie es. Das war die Magie des Klonens, und es war Magie. Wir alle wussten es. Selbst die Hausmeister, die nachts die Besen durch die Labore schoben, spürten es.



Nobelpreisträger 1993

Niemand wusste genau, was vor ihm lag. In den späten siebziger Jahren, gerade als ich anfing, für Cetus zu arbeiten, überzeugten einige prominente Molekularbiologen den Rest des Fachgebiets, sich ein wenig zurückzuhalten, um über Sicherheitsfragen nachzudenken. Konferenzen wurden

Downloads & Links

[Pressemitteilung der Akademie](#)

[Fragen zur PCR](#)

[Interview \(David J. Brown\)](#)



Originaltext

If you type in 'pcr song,' you get a lovely little ditty cou Rad, which will rattle around in your brain like an insan garage.

[Bessere Übersetzung vorschlagen](#)

Einige Fragen zur PCR

Wie hat die PCR die medizinische Welt beeinflusst?

Weit weniger als es hat die medizinjournalistische Welt beeinflusst. Das letzte Mal, dass ich ernsthaft mit Koronararterienproblemen ins Krankenhaus eingeliefert wurde, war 2004, und es gab viele Bluttests und Bildgebungsarbeiten, aber Informationen über meine DNA wurden nicht berücksichtigt. Diese befindet sich noch im Forschungsstadium. Es wird mehr und mehr ein Teil der medizinischen Praxis werden, da die individuelle Verträglichkeit und Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Medikamenten, wie zum Beispiel Heparin, von Bedeutung ist und mit dem DNA-Genotyp zusammenhängt. Die personalisierte Medizin kommt. Sie befindet sich noch im Forschungsstadium.

Transfusionen von Blut und Organen werden anhand von DNA-Typen auf Histokompatibilität überwacht, und verschiedene genetische Störungen sowie Infektionskrankheiten werden sicherlich auf DNA-Ebene untersucht.

Es wird noch viel mehr kommen, als angewendet wurde. Die praktische Medizin bewegt sich zwangsläufig langsamer als die medizinische Forschung.

Wie hat sich Ihr Leben nach dem Nobelpreis verändert?

Meine Lieblingsbeschäftigung ist das Lernen nach den Anweisungen, die ich für mich selbst entdeckte. Einen Nobelpreis zu haben erlaubt es einem, sich dieser Art von Gewohnheit hinzugeben, ohne zu verhungern, und ich habe davon profitiert. Manche Menschen sind nicht so besessen von ihrer eigenen Freiheit und nutzen die Verleihung eines Nobelpreises als Tor zu Macht und Verantwortung und den damit verbundenen finanziellen Belohnungen. Ich übernehme nicht so schnell Verantwortung und bin glücklich ohne diese Dinge. Ich lese gerne umfassend und auf eigene Faust. Einen Nobelpreis zu haben, hat mir die Gelegenheit gegeben, mich so gut zu bilden, dass ich jetzt das Gefühl habe, dass ich ihn wirklich verdiene.

Erzählen Sie uns von dieser neuen Disziplin der Paläobiologie?

einberufen, sogar Gesetze in Cambridge, Massachusetts und Berkeley, Kalifornien, verabschiedet. Wir waren sicher in Emeryville, wo es Glücksspielhäuser, aber nur wenige Gesetze gab. Niemand konnte sich sicher sein, dass es eine so gute Idee war, menschliche Gene in Mikroorganismen einzubauen, die möglicherweise Menschen infizieren könnten. Sie haben es nie herausgefunden, aber als Kompromiss wurden einige E. coli-Stämme als unwahrscheinlicher als andere als katastrophal zerstörerisch für Menschen eingestuft, und wir stimmten zu, nur diese zu verwenden.

E. coli K12 didn't solve my problem with the new oligonucleotide synthesis machine, neither did it solve the problem of rapidly determining whether or not the DNA of a growing fetus contained an unfortunate mutation, giving the parents an opportunity to elect an abortion.

Unconsciously combining the two problems, I started devising methods whereby oligonucleotides could be used to determine single base pair mutations from whole human DNA. Pregnant mothers should not have to wait for the cloners, and the result of running gels and using radioactive probes on genomic DNA were fuzzy for reasons mentioned above. Fuzzy is not a comfortable basis for making a life or death decision. Somebody needed to come up with a way to concentrate a single DNA locus in the presence of millions of similar but different DNA loci without the inevitable delay of cloning.

It was going to happen tonight. That somebody was going to be me. In ten years I would be toasting the health of the Swedish Royals in Stockholm, grinning from ear to ear at my good fortune.

The California buckeyes poked heavy blossoms out into Highway 128. The pink and white stalks hanging down into my headlights looked cold, but they were loaded with warmed oils that dominated the dimension of smell. It seemed to be the night of the buckeyes, but something else was stirring.

My little silver Honda's front tires pulled us through the mountains. My hands felt the road and the turns. My mind drifted back into the laboratory. DNA chains coiled and floated. Lurid blue and pink images of electric molecules injected themselves somewhere between the mountain road and my eyes.

I see the lights on the trees, but most of me is watching something else unfolding.

If a person were to attempt extending a synthetic oligonucleotide prepared to be complementary to a target on human DNA by just one base, using DNA polymerase and dideoxynucleoside triphosphates, using four different tubes each containing all four bases, but only one of them in each tube alpha-labeled with ³²P, optimistically one might be able to discover the identity of the nucleotide on the DNA target just three-prime of the oligomer. Dideoxy-sequencing worked that way...but...Huge but...that only worked on cloned DNA where the ratio of target to non-target DNA was increased by a factor of about a million. Fortunately for me I was thinking about other things that might go wrong than just the brute improbability that only the right sequence would be engaged. I paid just enough attention to this hypothetical problem to plan on using two oligonucleotides, one designed for each strand of the target sequence coming at the base pair in question from either side. Although these two sides would be far distant in the denatured reaction mixture they would still represent complementary strands and if one told me that a 'T' was three-prime to one oligo, the other should have told me 'A' was three-prime to the other. Not much of a control, but I had oligos to burn. In fact that was what I was trying to do. We had excess oligos on our hands.

I was worried about another possible problem. What if the DNA sample, coming as it did from a person's tissue, was contaminated with deoxynucleoside triphosphates of its own. Not especially unlikely, and the sad fact was that DNA polymerase was not terribly fond of dideoxies, when the natural substrate was around. Very likely it would add a few deoxynucleotides to the proffered oligomer before getting around to the dideoxies, labeled or not. This would destroy the simplicity I was hoping for, a test that could be completed in one shift in a hospital laboratory. So I started thinking of ways to get rid of any possible stray nucleotides in the sample before I did the experiment.



There were at least three misconceptions driving me towards PCR. I was very close. But I didn't know what I was close to. I misconceived that I was just solving some little technical detail. Good. I didn't clutch. I don't think normal people can look directly at something that is going to have a huge effect on them. We are better creeping up from the side.

My second misconception was that the procedure I was planning would work at all. The probabilities of the complexity of the sample, which PCR was going to solve very shortly, were very much against it. I drove on.

The third misconception was more subtle and was shared by my colleagues. There is an enzyme that could have disposed of the hypothetical stray deoxynucleoside triphosphates, bacterial alkaline phosphatase. It would clip off their little triphosphate tails in a flash, but then I would have to get rid of it, before I added my precious dideoxies, or it would clip off their tails, too. Everyone knew that BAP, as we referred to it, could not be irreversibly heat denatured, so you couldn't get rid of it easily. The discovery of the natural renaturation of heat denatured BAP was famous. It established that the three-dimensional structure of a protein would refold based on its sequence alone. There was a product called MAT-BAP on the market to get rid of BAP after it was no longer desired in a reaction, by having the protein attached to an insoluble matrix. I had never had any luck with this product, and neither I, nor anyone else in the field, realised that if you take a microliter of BAP from a commercial supply, and use it quickly, before it loses its zinc atom into a buffer that contains no appreciable zinc, it will work for a short time, and then it will be subject to irreversible heat denaturation. I discovered that much later, but fortunately did not know it at the time. The famous refolding experiment was done in a high zinc buffer.

So I considered other ways to get rid of deoxynucleoside triphosphates.

Klenow! That would polymerise them, given an oligomer to start with and some single-stranded DNA for a template. Klenow was the polymerase that I had planned to use anyhow. How clever. I would use it twice for two purposes. First I would denature my sample, separated into four tubes, add the primers I would later use in the main event, bring to 37 degrees and wait. The polymerase should polymerise all the nucleotides.

Now I would heat the mixture to remove the oligos that may have been extended indefinitely now, cool to 37 degrees, add some more polymerase which would have been denatured by the heat, and add the dideoxynucleotides. I had it...PCR, but I didn't see it yet.

There would be a vast excess of oligomers, now fresh ones would land on the target strands and hopefully be extended by one radioactive nucleotide. What could go wrong? What if the oligomers in

It's not a new discipline, just newly invigorated. I had the good fortune to work down the hall from the great paleobiologist Allan Wilson when I was a graduate student at Berkeley and Allan was struggling with established conceptions about human origins and evolution in general. He needed better ways to measure real evolutionary distance than immunology provided, and I was thrilled to provide him with PCR, and he was thrilled to begin using it in his lab, which was one of the first to put it to any real use.

He thought I should have called it "in vitro cloning." I liked "Polymerase Chain Reaction.. The discipline of paleobiology would certainly not care to part with it now, under any name.

In your opinion what is the point where science meets with business. How can business affect the world of science?

I have never encountered a business person with any true interest in science. Why should he be interested? He had the choice, and he chose business. It is only through good fortune that money ends up in the hands of scientists, who know how to use it for anything other than making more money, and it is a sorry situation indeed, since much scientific research is not cheap.

Sometimes very fortunate scientists get rich, like Craig Venter, and then they can let their imagination direct their research, but this is the rare exception. Most scientists are constrained to do the bidding of businessmen, and it can be immensely frustrating for the scientist and unproductive for society in general. Most biological research ventures fail because the boss is highly subject to scientific illusions and has no idea how to separate truly good ideas from the highly simplified and often distorted things that filter up to him. He is usually under the influence of even less informed investors, and subject to misinformation from inferior scientists eager to have his favor. It is an unsavory world which I have never enjoyed.

Wie seit Jahrtausenden bekannt ist, sind „Philosophenkönige“ schwer an staatliche Zuwendungen zu bekommen, obwohl sie theoretisch eine vorzuziehende Alternative darstellen, haben das ähnliche Problem, dass sie oft von wissenschaftlichen Inkompetenten verwaltet werden, die nach Macht und persönlicher Sicherheit suchen, anstatt weit verbreitet zu sein nützlich Wissen. Gute Wissenschaftler mögen keine Verwaltungsjobs, was uns genau dort lässt, wo wir sind. Wissenschaft wird im Allgemeinen von Nichtwissenschaftlern geleitet.

Wir stolpern weiter.

Fragen von Maria Vasilescu

the 'get rid of the triphosphates' step had been extended a long way?

I very quickly brought the Honda to a stop near the roads edge, but sticking out into the potential logging trucks. With me, my girlfriend still asleep, and my new invention in peril, I contemplated what would happen if they had been extended a long way. Their extension products would be primed by the other oligos and these would also now be extended.

I would have doubled the signal, and I could do that over and over, and I could add a tremendous excess of my own deoxynucleoside triphosphates as they are cheap, soluble in water and legal in California.

I'd better get out of the road.

A few hundred yards down 128 was a pullout. By the time I got there the rest had fallen grandly into place. I could design the oligos some distance from each other. After three cycles they would make a double stranded DNA molecule corresponding exactly to the DNA template between them, and that would double in concentration every subsequent cycle. Anything else that happened would be of no concern. After ten cycles I would have a thousand. I knew my powers of two, because I wrote computer programs I understood the power of reiterative loops. Thirty cycles would be somewhere around a billion. The product would overwhelm anything that was unintended because it would be self catalytic, and only the site of interest would bind the necessary two oligos together in their little reproductive dance.

Ich habe in dieser Nacht nicht geschlafen. Am nächsten Morgen kaufte ich zwei Flaschen Navarro Vineyards Pinot Noir und hatte mich am Nachmittag in einen unruhigen Schlaf gelegt. Es gab Diagramme von PCR-Reaktionen auf jeder Oberfläche, die Bleistift oder Buntstift in meiner Kabine nehmen würde. Ich bin in einer neuen Welt aufgewacht.

[Heim](#) [Biografie](#) [PCR](#) [Altermune](#) [Wissenschaft](#) [Bücher](#) [Vorlesungen](#)
[Kontakt](#)

*Copyright © 2009 Kary Mullis
Alle Rechte vorbehalten.*

Design & Hosting von: **WHITEINKSTUDIO**