

# Inhalt

## 1 Bedarf und Konzept einer integrierten automatischen DNA-Analyse 1

- 1.1 Was hat die DNA-Analyse so populär gemacht? 1
- 1.2 Methodische Quantensprünge machten die DNA „reif“ für die Routineanalyse 3
- 1.3 Was bedeutet integrierte automatische genetische Analyse? 4
- 1.3.1 Teilbereiche der molekularen DNA-Analyse 4
- 1.3.2 Das Konzept der Integration 5

## 2 Die DNA-Präparation für die automatische DNA-Analyse 7

- 2.1 Einführung 7
- 2.2 Vektoren für die DNA-Präparation 7
- 2.3 DNA-Präparation durch PCR 9
- 2.4 Methoden zur Plasmidpräparation 9
  - 2.4.1 Alkalische Lyse 9
  - 2.4.2 Boiling-Methode 10
- 2.4.3 Aufreinigung der Plasmid-DNA über Säulen 10
- 2.5 „Solid-Phase“-DNA-Präparation 12
- 2.6 Molekularbiologische Workstation 12
- 2.7 Auswirkungen der DNA-Template-Qualität auf die automatische DNA-Sequenzierung 17
- 2.8 Literatur 17

## 3 Die PCR als Grundlage in der molekularen DNA-Analyse 19

- 3.1 PCR – das Grundprinzip 19
- 3.2 Automatisierung der PCR 22
- 3.3 Optimierung von PCR-Reaktionen 24
  - 3.3.1 Reaktionsparameter 24
  - 3.3.2 Optimierungsstrategien 28
- 3.4 Optimierung der Amplifikationspräzision 29
- 3.5 Spezielle PCR-Verfahren 30
  - 3.5.1 Touchdown-PCR 30
  - 3.5.2 Nested-PCR 31
  - 3.5.3 Hot-Start-Technik 32
- 3.6 Thermostabile Enzyme 33
  - 3.6.1 *Taq*-DNA-Polymerase 34
  - 3.6.2 *rTth*-DNA-Polymerase 35
  - 3.6.3 Vent<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase 36
  - 3.6.4 *Pfu*-DNA-Polymerase 36

3.6.5	UITma™-DNA-Polymerase	36
3.7	PCR und Kontaminationen	37
3.8	Analyse der Amplifikationsprodukte	38
3.8.1	Gelelektrophorese	39
3.8.2	High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	40
3.8.3	Kapillar-Elektrophorese (CE)	40
3.8.4	TaqMan™-Assay zur Analyse von PCR-Produkten	41
3.9	Literatur	43
<b>4</b>	<b>Die DNA-Synthese als grundlegendes Werkzeug in der molekularen DNA-Analyse</b>	<b>45</b>
4.1	Entwicklung der DNA-Synthese	45
4.2	Chemische Grundlagen der DNA-Synthese	45
4.3	Chemischer Ablauf der DNA-Synthese	48
4.3.1	Detritylierung	48
4.3.2	Monomeraddition	49
4.3.3	Capping	50
4.3.4	Oxidation	50
4.4	Automatisierung der DNA-Synthese	50
4.5	Optimierung der DNA-Synthese	52
4.6	Aufarbeitung von Oligonukleotiden	52
4.6.1	Gelelektrophorese	53
4.6.2	High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	55
4.6.3	Kapillar-Elektrophorese	58
4.7	Mögliche Konsequenzen der Verwendung nichtgereinigter Oligonukleotide auf spätere Anwendungen	58
4.8	Markierung von Oligonukleotiden	59
4.8.1	Biotin-Markierung	59
4.8.2	Phosphorylierung	60
4.8.3	Fluoreszenzmarkierung	61
4.9	Anwendungen von Oligonukleotiden	62
4.10	Literatur	62
<b>5</b>	<b>DNA-Sequenzanalyse</b>	<b>65</b>
5.1	Einleitung	65
5.2	Sequenzier-Techniken	65
5.2.1	Maxam-Gilbert-Sequenzierung	65
5.2.2	Sequenzierung nach Sanger	66
5.2.3	„Cycle-Sequenzierung“	68
5.2.4	Multiplex-Sequenzierung	70
5.3	Templates	70
5.3.1	Phagen und Phagemide	70
5.3.2	Plasmide und Cosmide	71
5.3.3	PCR-Produkte	72

5.3.4	Magnetic Beads	72
5.4	Markierungs-Methoden	73
5.4.1	Sequenzierung mit markierten Primern	73
5.4.2	Sequenzierung mit markierten Desoxynukleotiden	74
5.4.3	Sequenzierung mit markierten Didesoxynukleotiden (DyeTerminatoren)	75
5.4.4	Nachträgliche Sequenz-Markierung	75
5.5	Der Weg zur vollständigen Sequenz	76
5.5.1	Geringer Aufwand für die Probenvorbereitung	77
5.5.2	Kurze Analysezeiten mit hoher Genauigkeit	78
5.5.3	Hohe Leseweiten	79
5.5.4	Vergleichende Sequenzbestimmung	83
5.5.5	Detektionsverfahren	83
5.6	Datendarstellung	84
5.7	Literatur	86

## 6 DNA-Fragmentgrößenbestimmung und Quantifizierung 87

6.1	Einführung in die DNA-Fragmentanalyse	87
6.2	Markierung der DNA-Fragmente	89
6.2.1	Fluoreszenzmarkierte Primer	89
6.2.2	Markierung mit fluoreszenzmarkierten dNTPs	91
6.2.3	Markierung von dsDNA mit Fluoreszenzdimeren (Interkalatoren)	92
6.3	Exakte Längenbestimmung mit Hilfe eines internen Längenstandards	94
6.4	Sensitivität, Kapazität und Reproduzierbarkeit der automatischen Fragmentlängenbestimmung	97
6.5	Automatische Datenanalyse	97
6.6	Quantitative Anwendungen in der Fragmentanalyse	98
6.7	Mutations-Detektions-Methoden	100
6.7.1	Die Identifizierung von Mutationen	100
6.7.2	PCR-basierende Mutations-Detektions-Methoden	102
6.7.3	Multiplex-PCR für die Detektion von Deletionen	102
6.7.4	Detektion von Punktmutationen	103
6.7.5	Vergleich und Bewertung der verschiedenen Mutations- Detektions-Methoden	108
6.8	Kopplungsanalysen	109
6.9	STR-Analysen in der forensischen Spurenkunde	113
6.10	Automatische genetische Analyse in der Landwirtschaft	117
6.11	Literatur	123

## 7 Grundlagen und Entwicklung der multifluorophoren Laser-Scanning- Technologie 127

7.1	Einleitung	127
-----	------------	-----

7.2	Die Ausgangssituation: Monomarkersysteme auf der Basis radioaktiver Nuklide oder einzelner Fluorochrome zur Detektion von DNA-Fragmenten	127
7.2.1	Radioaktivität	128
7.2.2	Chemilumineszenz	128
7.2.3	Fluorescein- und Rhodaminderivate, Ethidiumbromid, TOTO™	129
7.2.4	Detektion von Emissionsstrahlung bei nichtradioaktiven Monomarkersystemen	130
7.2.5	Datenerfassung und -interpretation	131
7.3	Multimarkersysteme auf der Basis von Fluoreszenzfarbstoffen zur Detektion von DNA-Fragmenten	133
7.3.1.	Das Systemkonzept	134
7.3.2	Chemische Struktur und physikalische Grundlagen der Fluorophore: Absorption, Emission und Empfindlichkeit	136
7.4	Laser-(Scanning-)Technologie als Grundlage eines Multimarker-Detektionssystems	138
7.4.1	Grundlagen der „On-line“-Detektion von Multimarker-systemen	139
7.4.2	Das Systemkonzept der Laser-Scanning-Technologie: Der Aufbau einer Multimarker-DNA-Analysestation mit hoher Kapazität	140
7.4.3	Das Systemkonzept der Laserdetektion bei der Multimarker-DNA-Analyse in Kapillaren	143
7.5	Variable Medien und Gellängen: Die vielseitigen Möglichkeiten der Elektrophorese mit „On-line“-Detektion	145
7.6	Perspektiven in der Detektionstechnologie	147
7.7	Literatur	148
<b>8</b>	<b>Datenverarbeitung in der genetischen Analyse</b>	<b>149</b>
8.1	Grundanforderungen: Integration, Automatisierung und Flexibilität	149
8.1.1	Integration	149
8.1.2	Automatisierung	150
8.1.3	Flexibilität	150
8.2	Einzelne Arbeitsprozesse der Datenverarbeitung in der genetischen Analyse	151
8.2.1	Datenvisualisierung	151
8.2.2	Dateneditierung	153
8.2.3	Datenanalyse	154
8.2.3.1	Sequenzalignment und Homologieanalysen	156
8.2.3.2	Sequenzassembling und Konsensussequenz-Generierung	157
8.2.3.3	Datenbanksuche	157
8.2.3.4	Sequenzstruktur- und Motivanalyse	158

8.2.3.5	Analyse des Informationsgehalts von DNA-Sequenzen	158
8.2.4	Datenarchivierung/Datenbanken	159
8.3	Spezifische Anforderungen bei der Analyse von DNA-Fragmentdaten	160
8.4	Kriterien für die Auswahl der Hard- und Software	162
8.4.1	Plattformübergreifendes Arbeiten	163
8.4.2	Erweiterbarkeit	163
8.4.3	Netzwerkfähigkeit	164
8.5	Sicherheit der Datenverarbeitung	164
<b>9</b>	<b>Identifizierung von Genen und Markern</b>	165
9.1	Genetische Kartierung	166
9.2	Kartierung von genetischen Markern	168
9.3	Automatisierung der Genotypisierung	170
9.4	Perspektiven der genetischen Kartierung	173
9.5	Literatur	177
<b>10</b>	<b>Polymorphismus- und Mutationsanalyse</b>	179
10.1	Segregationsanalyse gekoppelter polymorpher Marker	180
10.2	Mutationsanalyse	183
10.3	Zusammenfassung	189
10.4	Literatur	189
<b>11</b>	<b>DNA-Analytik in der Forensik</b>	191
11.1	Spurenmaterial in Kriminalfällen	191
11.2	Aussagekraft bei Übereinstimmungen von Erbmerkmalen	192
11.3	Forensisch bedeutsame Polymorphismen	192
11.4	Methoden der VNTR-Typisierung	194
11.4.1	Southern-Analyse	194
11.4.2	Polymerase Chain Reaktion (PCR)	195
11.5	Aussichten der VNTR-Typisierung	199
11.6	Weitere Aspekte der DNA-Analyse in der Forensik	200
11.7	Literatur	201
<b>12</b>	<b>DNA-Sequenzierung in der medizinischen Mikrobiologie</b>	203
12.1	Einführung	203
12.2	Theoretische Grundlagen	204
12.3	Humanes Immundefizienzvirus	204
12.3.1	Sequenzvariation von HIV-Subtypen	206
12.3.2	Sequenzvariation in der PND des HIV-1/gp120-Oberflächenproteins	206

**XIV      *Inhalt***

- 12.3.3 Bestimmung antiretroviraler Resistenzen gegen HIV-Therapeutika 207
- 12.4. Hepatitis B-Virus 210
- 12.5 Resistenzentwicklungen bei bakteriellen Erregern 211
- 12.6 Ausblick 212
- 12.7 Literatur 212

**13 Anwendung molekularbiologischer Methoden im Agrarbereich 215**

- 13.1 Einleitung 215
- 13.2 Malignes Hyperthermie-Syndrom beim Schwein (MHS) 215
- 13.3 Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (BLAD) 217
- 13.4 Molekularbiologische Bestimmung der Milchproteinvarianten 218
- 13.5 DNA-Fingerprinting 219
- 13.6 DNA-Mikrosatelliten-Analyse 219
- 13.7 Zusammenfassung 222
- 13.8 Literatur 223

**Glossar 225**

**Sachverzeichnis 231**