

# 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

X      *Inhalt*

- 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

**4    Die DNA-Synthese als grundlegendes Werkzeug in der molekularen DNA-Analyse    45**

- 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

**5    DNA-Sequenzanalyse    65**

- 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
-----	------------	-----

## **XII     *Inhalt***

- 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 Multimarkersystemen 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

## **8   Datenverarbeitung in der genetischen Analyse 149**

- 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

## **9 Identifizierung von Genen und Markern 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

## **10 Polymorphismus- und Mutationsanalyse 179**

- 10.1 Segregationsanalyse gekoppelter polymorpher Marker 180
- 10.2 Mutationsanalyse 183
- 10.3 Zusammenfassung 189
- 10.4 Literatur 189

## **11 DNA-Analytik in der Forensik 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

## **12 DNA-Sequenzierung in der medizinischen Mikrobiologie 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**