

Günter Mertes, Thomas Schärer  
Thomas A. Schild, Gerald Schmidt,  
Dagmar Schuster, Jörg vom Stein

# Automatische genetische Analytik

Unter Mitarbeit von:

Albrecht von Brunn, Karl-Heinz Grzeschik,  
Dietmar Lohmann, Hermann Schmitter,  
Norbert Speich, Jürgen Weber

**WILEY-VCH**

Weinheim • New York • Chichester • Brisbane • Singapore • Toronto

# 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 Tag-DNA-Polymerase 34
  - 3.6.2 rTr/z-DNA-Polymerase 35
  - 3.6.3 Vent<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase 36
  - 3.6.4 P/w-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

#### **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

- 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 Multimarkern 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**