

Günter Mertes, Thomas Schäfer,  
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

This page intentionally left blank

G. Mertes, T. Schäfer, T. A. Schild, G. Schmidt, D. Schuster,  
J. vom Stein

## **Automatische genetische Analytik**

 **WILEY-VCH**

This page intentionally left blank

Günter Mertes, Thomas Schäfer,  
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

Dr. Günter Mertes  
Dr. Thomas Schäfer  
Dr. Thomas A. Schild  
Dr. Gerald Schmidt  
Dr. Dagmar Schuster  
Dr. Jörg vom Stein  
PE-Applied Biosystems  
Brunnenweg 13  
D-64331 Weiterstadt

Das vorliegende Werk wurde sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren und Verlag für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler keine Haftung.

Lektorat: Karin Dembowsky  
Herstellerische Betreuung: Hans-Jochen Schmitt

**Titelbild:** Der Hintergrund zeigt ein Gelbild nach elektrophoretischer Auftrennung und automatischer Multi-color-DNA-Detektion von Multiplex-PCR-Reaktionsprodukten. Das Diagramm im Vordergrund beschreibt das Analyseprinzip der simultanen multifluorophoren Prismen-CCD-DNA-Detektion.

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme  
**Automatische genetische Analytik** / Günter Mertes ... Unter Mitarb.  
von: Albrecht von Brunn ... – Weinheim : VCH, 1997  
ISBN 3-527-30076-7

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), 1997

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, daß diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

All rights reserved (including those of translation into other languages). No part of this book may be reproduced in any form – by photoprinting, microfilm, or any other means – nor transmitted or translated into a machine language without written permission from the publishers. Registered names, trademarks, etc. used in this book, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

Satz: Kühn & Weyh, D-79015 Freiburg  
Druck: Colordruck, D-69181 Leimen  
Bindung: W. Osswald, D-67433 Neustadt  
Printed in the Federal Republic of Germany

# Vorwort

Was hat die Autoren veranlaßt, sich dem Thema „Automatische genetische Analytik“ in Form eines Buches ausführlicher zu widmen?

Zunächst einmal verstehen die Autoren unter „Genetischer Analytik“ die stark erweiterten Anwendungsmöglichkeiten von molekularbiologischen Basistechniken zur molekularen Charakterisierung von DNA mit Hilfe einer speziellen instrumentellen Analysetechnologie. Ziel der „Automatischen genetischen Analytik“ ist es, die molekulare Analyse der DNA zu vereinfachen, zu optimieren und zu automatisieren.

Die Beschäftigung mit diesem Thema hat natürlich mit dem beruflichen Werdegang der Autoren zu tun. Alle Autoren haben nach dem Studium der Biologie oder Chemie in der molekularbiologisch orientierten Forschung gearbeitet. Die Forschungsarbeiten bestanden zunächst aus reiner Grundlagenforschung in den jeweiligen Fachdisziplinen. Aber gerade in diesen sehr verschiedenen Fachausrichtungen von der organischen Grundstoffchemie über die Molekulargenetik der Pflanzen bis hin zur medizinischen Virologie und Tumorgenetik kamen sehr schnell auch anwendungsorientierte Forschungsaspekte in den Blickpunkt. Gemeinsam war allen Anwendungsbereichen aber eine wesentliche methodische Grundlage: die molekulare Analyse einer Biomolekülklasse mit der angelsächsischen Kurzform DNA (*Desoxyribonucleic acid*). Eine weitere Gemeinsamkeit der Autoren und der noch intensivere Bezug zum Thema des vorliegenden Buches ergab sich durch die Kombination des bisherigen Arbeitsfeldes mit neuen Aufgabenbereichen in der instrumentellen Analytik bei einem führenden industriellen Anbieter.

Es wäre aber sicher niemals zu diesem Buch gekommen, wenn nicht auch in den letzten Jahren die generelle Bedeutung der „Genetischen Analyse“ in den unterschiedlichsten Anwendungsbereichen gravierend zugenommen hätte. Als „eingefleischte Molekularbiologen“ haben wir in den letzten Jahren nicht selten gestaunt, daß wir mehr und mehr mit Gesprächspartnern zu tun hatten, die sich, obwohl „molekularbiologisch fachfremd“, sehr interessiert mit DNA-Analysen beschäftigten. Diese Gesprächspartner waren Paläontologen, Anthropologen, Juristen, Politiker, Tier- und Pflanzenzüchter, Lebensmittelproduzenten und natürlich Mitglieder nahezu aller Fachbereiche der medizinischen Wissenschaften. So ist z. B. die forensische DNA-Analytik als Methode innerhalb der Rechtsmedizin und des kriminaltechnischen Dienstes bereits eine Routinemethode geworden. In anderen Bereichen steht diese Entwicklung kurz bevor bzw. ist jetzt schon absehbar. Die methodischen Quantensprünge in den Basistechniken der DNA-Analyse und die Innovationen in der dafür speziell entwickelten instrumentellen Analytik haben diese Entwicklung wesentlich beschleunigt, ja teilweise auch erst möglich gemacht. Beispielhaft wäre da die Entwicklung der

„Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR) zu nennen, die den Zugriff zum Biomolekül DNA um ein Vielfaches einfacher und effektiver gemacht hat. Auch die Entwicklung einer auf nichtradioaktiver Markierung basierenden automatischen DNA-Analyse hat einen wesentlichen Beitrag zur einfachen und effektiven Anwendung der „Genetischen Analytik“ geleistet. Wie oft, wenn rasante methodische Entwicklungen mit einer enormen Ausweitung der Anwendungsmöglichkeiten einhergehen, wächst der Bedarf für eine zusammenfassende Darstellung dieses neuen Fachgebiets.

Damit ist auch die Zielsetzung des Buches schon angesprochen. Die methodischen Möglichkeiten und Anwendungsbeispiele der „Automatischen genetischen Analytik“ sollen in einem zusammenfassenden Überblick dargestellt werden. Dabei soll vor allem Wert auf den gesamten Prozeß vom biologischen Material über die Analyse bis hin zur Datenauswertung und Datenverarbeitung gelegt werden. Die Integration von diesen Teilprozessen mit dem entsprechenden Praxisbezug soll der „rote Faden“ in diesem Buch sein. Es wird dabei weniger auf eine detaillierte Vollständigkeit eingegangen, als mehr auf einen zusammenfassenden Überblick mit Praxisbezug. Gerade der Praxisbezug soll durch die Anwendungsbeispiele von Vertretern verschiedener Fachrichtungen unterstrichen werden. Das Buch wendet sich sowohl an aktuelle oder zukünftige Anwender der molekularen DNA-Analyse, als auch an interessierte Leser, die sich über den aktuellen Stand und die Anwendungsmöglichkeiten der automatischen genetischen Analytik informieren möchten.

Das vorliegende Buch kann und will kein vollständiges Laborhandbuch oder gar Lehrbuch sein. Aus diesem Grund sind Protokolle und Methoden nur beispielhaft dargestellt. Es wird aber an geeigneter Stelle auf weiterführende und detaillierte Literatur hingewiesen. Die dargestellten Methoden und Anwendungsbeispiele bauen auf die am weitesten verbreitete multifluorophore Laser-Scanning-Detektion als Standardtechnologie für die Automatisierung der genetischen Analyse auf. Andere Technologien und Methoden werden nur am Rande erwähnt, und gegebenenfalls auf spezielle Literatur verwiesen wird.

Schließlich möchten wir mit diesem Buch einen aktuellen Überblick über die derzeitigen Methoden und Anwendungsmöglichkeiten der „Automatischen Genetischen Analytik“ geben, ohne diese aber in ihren Folgen zu bewerten, zu kommentieren oder eine ethische Diskussion zu führen. Wegen der ethischen Relevanz und möglichen Folgen aktueller und zukünftiger Anwendungsmöglichkeiten halten die Autoren diese Diskussion aber an anderer Stelle für notwendig und sehen dieses Buch als eine mögliche Informationsgrundlage an.

Die Autoren möchten der WILEY-VCH Verlagsgesellschaft Weinheim für die geduldige und kooperative Zusammenarbeit danken. Wir möchten auch den externen Autoren für die Praxisbeispiele aus ihren Fachgebieten und die gute Kooperation danken. Dieses Buch wäre sicher auch nicht so entstanden ohne den Rat und die Hilfe vieler Kollegen und Freunde.

Für das Autorenteam:  
Dr. Jörg vom Stein

Im Frühjahr 1997

# Geleitwort

Es wird zur Zeit viel von Zukunftstechnologien gesprochen, erhofft man sich doch von deren gezielter Förderung eine deutliche Unterstützung bei der Lösung der heutigen wirtschaftlichen Probleme und eine prosperierende Wirtschaftsentwicklung für die Zukunft.

Doch bei diesen Zukunftstechnologien denkt man in Deutschland bevorzugt und oft fast ausschließlich an die Informations- und Kommunikationstechniken. Diese werden von einer breiten Öffentlichkeit akzeptiert, und niemand bestreitet, daß wir unbedingt an diesem revolutionären Prozeß angemessen teilhaben müssen. Viel weniger beachtet und noch weniger akzeptiert wird die revolutionäre Entwicklung in der Biologie und den Biowissenschaften, die aber einen mindestens ebenso großen Einfluß auf unsere Zukunft haben wird wie die Revolution in der Informationstechnologie.

So wird der molekularen Biologie und deren Anwendungsbereichen wie genetische Analytik, Biotechnologie und Gentechnologie mit großer Skepsis begegnet, und immer noch steht eine Mehrheit diesen Technologien ablehnend gegenüber. Dabei wird allein schon die auf modernen molekularbiologischen Erkenntnissen beruhende genetische Analytik das Leben jedes einzelnen entscheidend beeinflussen. Nahrung und Gesundheit, die Grundbedürfnisse eines jeden, werden von der Entwicklung der genetischen Analytik bestimmt werden.

Das vorliegende Buch „Automatische genetische Analytik“ stellt in einem breiten Rahmen die modernsten Methoden in der genetischen Analytik vor, wobei neben der Analytik selbst auch andere grundlegende Entwicklungen dargestellt werden, wie die moderne DNA Synthese und der hohe Entwicklungsstand der PCR Technik, ohne die eine moderne genetische Analytik undenkbar wäre.

Dies Buch erscheint zu einem Zeitpunkt zu dem die genetische Analytik an ihrer entscheidenden Schwelle steht: dem Übergang von einer Methode für Spezialisten in der Grundlagenforschung zur Routinemethode für ein breites analytisches Anwendungsspektrum. Damit geht in vielen Bereichen eine grundlegende Änderung traditioneller Analysenmethoden einher. Möglich und beschleunigt wird dieser Prozeß durch eine immer weiter gehende Automatisierung der genetischen Analytik und durch die kommerzielle Bereitstellung kompletter und validierter Analysenprodukte.

So ist die genetische Analytik in der Forensik bereits zur essentiellen Routineanalytik geworden, sie überschreitet auf breiter Front die Schwelle zu allen Bereichen der medizinischen Wissenschaften, genauso ist dies der Fall in der Pharmaforschung bei der Entwicklung neuer, gezielt wirkender Arzneimittel. Sie wird zur Routinemethode in den Agrarwissenschaften, und der erste Einstieg in die Lebensmittel- und Umweltanalytik findet gerade statt. Neben den wissen-

schaftlichen Grundlagen der automatischen genetischen Analytik beschreibt dieses Buch auch den beginnenden Routineeinsatz in den fortgeschrittenen Anwendungsbereichen. Dies wurde möglich durch ein Autorenteam, das kompetent und aus eigener praktischer Erfahrung die unterschiedlichen Aspekte der genetischen Analytik in ihrer ganzen Breite darstellen konnte. Somit möge dieses Buch dabei helfen, ein breites Fachpublikum mit dem heutigen Stand der Technik vertraut zu machen und aufzuzeigen, welches Zukunftspotential sich hier eröffnet.

Obwohl in diesem Buch keine ethische Diskussion über die genetische Analytik geführt wird, so kann es doch durch seine klare praxisnahe Beschreibung, was genetische Analytik ist, dazu beitragen, daß in Zukunft emotionsloser und sachlicher über die ethischen Probleme der genetischen Analytik gesprochen werden kann. Dem Autorenteam möchte ich aufrichtig für das Engagement danken. Alle haben die Arbeit an diesem Buch sehr ernst genommen und viel Zeit und Mühe investiert. Das Ergebnis kann sich sehen lassen, und ich hoffe, es kann mit seinen aufklärenden Informationen dazu beitragen, daß die modernen Biowissenschaften auf ein breiteres Verständnis stoßen und daß ungerechtfertigte Ressentiments weiter abgebaut werden.

Dr. Karl-Heinz Franzen

Im Frühjahr 1997

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Bedarf und Konzept einer integrierten automatischen DNA-Analyse</b>	<b>1</b>
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
<b>2</b>	<b>Die DNA-Präparation für die automatische DNA-Analyse</b>	<b>7</b>
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
<b>3</b>	<b>Die PCR als Grundlage in der molekularen DNA-Analyse</b>	<b>19</b>
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	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	34
3.6.2	<i>rTth</i> -DNA-Polymerase	35
3.6.3	Vent <sup>TM</sup> -DNA-Polymerase	36
3.6.4	<i>Pfu</i> -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
<b>6</b>	<b>DNA-Fragmentgrößenbestimmung und Quantifizierung</b>	<b>87</b>
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
<b>7</b>	<b>Grundlagen und Entwicklung der multifluorophoren Laser-Scanning-Technologie</b>	<b>127</b>
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 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**

# **Autorenverzeichnis**

Dr. Günter Mertes  
Dr. Thomas Schäfer  
Dr. Thomas Schild  
Dr. Gerald Schmidt  
Dr. Dagmar Schuster  
Dr. Jörg vom Stein  
PE – Applied Biosystems  
Brunnenweg 13  
64331 Weiterstadt

Dr. Albrecht von Brunn  
Max von Pettenkofer Institut  
Pettenkoferstr. 9a  
80336 München

Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik  
Medizinisches Zentrum für Humangenetik  
der Phillips-Universität Marburg  
Bahnhofsstr. 7a  
35037 Marburg

Dr. Dietmar Lohmann  
Institut für Humangenetik der  
Universitätsklinik Essen  
Virchowstr. 171  
45122 Essen

Dr. Hermann Schmitter  
Bundeskriminalamt  
Abteilung KT31  
Thaerstr. 11  
65193 Wiesbaden

Dr. Norbert Speich  
Labor Dr. Jung & Dr. Niemann,  
Laborarztpraxis Genetisch-Diagnostisches Labor  
Paul-Schalleck-Str. 8  
50939 Köln

Dr. Jürgen Weber  
Institut für molekulare Diagnostik GmbH  
Katzenburgweg 7–9  
53115 Bonn

This page intentionally left blank

# 1 Bedarf und Konzept einer integrierten automatischen DNA-Analyse

*Jörg vom Stein*

In diesem einführenden Kapitel soll der Begriff der „Integrierten automatischen DNA-Analyse“ erläutert und in den Zusammenhang des Buches gestellt werden. Es wird dabei auf die entsprechenden Kapitel des Buches verwiesen, um dem Leser einen direkten Zugang zu den ihn besonders interessierenden Themen und Aspekten zu ermöglichen.

Zunächst einige allgemeine Bemerkungen zum Stichwort „Automatisierung“: Allein die Tatsache, daß ein Verfahren und insbesondere eine Analysemethode den Weg von der manuellen Durchführung hin zu einer Automatisierung durchschritten hat, impliziert bereits wichtige Eigenschaften dieser Analysemethode:

1. Es liegt ein ausreichend hoher und wachsender Anwendungsbedarf für diese Analysemethode vor.
2. Die Automatisierung der Methode ist unter Kosten-Nutzen-Gesichtspunkten möglich und für den Anwender sinnvoll.
3. Die Automatisierung bringt nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Vorteile für die Sicherheit und Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten.

Im weiteren Verlauf des Buches soll deutlich gemacht werden, wie zutreffend diese mehr theoretischen Grundlagen einer Automatisierung für die DNA-Analyse sind.

## 1.1 Was hat die DNA-Analyse so populär gemacht?

Diese Frage scheint mir berechtigt, da DNA-Analysen ganz wertneutral eine gewisse Popularität erlangt haben. Zunächst einmal eine kurze Definition des Begriffs DNA-Analyse: Im Kontext des Buches wird unter DNA-Analyse die molekulare Charakterisierung der DNA mit folgenden Zielen verstanden:

1. Die Analyse der Abfolge der DNA-Bausteine (die DNA-Sequenzierung)
2. Die Bestimmung der Größe von spezifischen DNA-Bruchstücken (die DNA-Fragmentanalyse)
3. Die Bestimmung von Mengenverhältnissen spezifischer DNA-Fragmente zueinander (relative DNA-Quantifizierung)

Sowohl der DNA-Sequenzierung als auch der DNA-Fragmentanalyse sind eigene Kapitel in diesem Buch gewidmet. Auf die relative Quantifizierung von DNA-Fragmenten wird im Rahmen der Beschreibung der DNA-Fragmentanalyse ein-

gegangen. Alle in diesem Buch aufgeführten aktuellen Anwendungsbeispiele basieren auf einer der drei genannten Analysemethoden.

Diese Abgrenzung ist notwendig, weil z. B. folgende Techniken im Kontext dieses Buches keine Berücksichtigung finden, da sie für die dargestellten aktuellen Anwendungen der automatischen genetischen Analyse nicht relevant sind:

- absolute Quantifizierung der DNA
- dreidimensionale DNA-Strukturanalyse
- Molekulargewichtsbestimmung der DNA
- Analyse DNA enthaltener Strukturen (z. B. DNA-Protein-Strukturen)

Nach diesen Begriffsdefinitionen und Abgrenzungen wieder zurück zur Eingangsfrage, was die DNA eigentlich heute so „populär“ gemacht hat. Diese zugegeben etwas salopp formulierte „Popularität“ basiert nicht auf der seit Jahrzehnten bestehenden fachlichen Notwendigkeit, sich innerhalb der Biowissenschaften mit der DNA zu beschäftigen. Vielmehr haben das erlangte Wissen aus diesen Forschungen und zugleich die methodischen Fortschritte die DNA-Analysen in vielen Bereichen des alltäglichen Lebens zu einer zunehmend wichtiger werdenden Größe gemacht. DNA-Analysen sind auf dem Weg, Entwicklungen und Entscheidungen im juristischen, sozialen, medizinischen und wirtschaftlichen Umfeld unseres Lebens zu beeinflussen.

Natürlich tragen auch theoretische und praktische Gründe dazu bei, warum die DNA als Objekt der Analyse in vielen Bereichen bisherige andere Analysemethoden ersetzt. Im wesentlichen sind drei Gründe zu nennen:

1. Die leichte Zugänglichkeit und Stabilität des Biomoleküls DNA ist eine wichtige Grundlage für die Entwicklung und Anwendung von DNA-Analyseverfahren.
2. Die Natur der DNA als biologische Informationseinheit und Datenbank, geschrieben aus vier Buchstaben (die organischen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin), erlaubt bei der Analyse den direkten Zugriff auf die primäre Information, die die Lebensvorgänge codiert und somit auch Organismen unverwechselbar voneinander unterscheidet.
3. Der Informationsgehalt der DNA-Sequenzen ist mittels geeigneter Hard- und Software relativ einfach zu verarbeiten und gezielt auszuwerten.

Für die breite Anwendung der molekularen automatischen DNA-Analyse waren aber methodische Entwicklungen notwendig, die nachfolgend kurz beschrieben werden sollen.

## 1.2 Methodische Quantensprünge machten die DNA „reif“ für die Routineanalyse

Zwei wichtige methodische Grundlagen haben der molekularen DNA-Analyse den Weg zur Automatisierung und zu der rasanten Ausweitung des Anwendungsspektrums geebnet: Zum einen die „Polymerase-Ketten-Reaktion“ (PCR) und zum anderen die „Multifluorophore Laser-Scanning-DNA-Detektion“ (MLSDD). Während die PCR die methodische Voraussetzung schaffte, auf leichte und schnelle Weise Zugriff auf spezifische DNA-Moleküle aus biologischem Material zu bekommen, sorgte die MLSDD für die analytische Voraussetzung, um sicher, schnell und mit hohem Durchsatz die DNA zu analysieren. Beiden methodischen Grundlagen sind in diesem Buch eigene Kapitel gewidmet, so daß hier nicht näher auf die Einzelheiten eingegangen werden soll. Entscheidend und von praktischer Bedeutung ist, daß in den letzten Jahren beide Methoden andere, viel aufwendigere Methoden ablösten, die sehr viel schwieriger zu automatisieren waren. Im Falle der PCR kann man nun aus nahezu jedem beliebigen biologischen Material ausreichend DNA für die Analyse gewinnen, wobei bereits eine Kopie der Zielsequenz ausreicht, um dann die gewünschten DNA-Fragmente anzureichern.

Im Falle der MLSDD hat man seit etwa 9 Jahren eine neue detektionstechnologische Plattform, die bisherige Analysetechniken, die z. B. auf einem radioaktiven DNA-Nachweis beruhten, endlich ablösen konnten. Die Möglichkeiten für weitergehende Entwicklungen im Hinblick auf Probendurchsatz und Methodenflexibilität sind bis heute keineswegs ausgeschöpft und bieten sehr viele Perspektiven für neue Entwicklungen. Ähnliche technologische Ansätze basierend auf einer monofluorophoren Detektion halfen zwar, die auf Radioaktivität basierenden Techniken zu ersetzen, bieten aber nicht die Flexibilität und Weiterentwicklungsmöglichkeiten wie die MLSDD, so daß sie in diesem Buch nur am Rande erwähnt werden.

Mit der PCR und einer routine- und leistungsfähigen DNA-Analysetechnologie waren nun wichtige methodische Voraussetzungen erfüllt, damit die „Automatische genetische Analyse“ als Routine- und Standardmethode in vielen und neuen Anwendungsbereichen eingesetzt werden konnte. Diese neuen methodischen Rahmenbedingungen haben dazu geführt, daß keine fundierten molekularbiologischen Erfahrungen notwendig sind, um die DNA-Analyse in der Routine betreiben zu können. So hat sich natürlich auch der potentielle Anwenderkreis für die automatischen DNA-Analysen stark erweitert. An dieser Stelle soll aber darauf hingewiesen werden, daß zwar die Generierung von „genetischen Daten“ durch die neuen methodischen Möglichkeiten stark vereinfacht worden ist, daß aber die sachgemäße Interpretation und Analyse dieser Daten immer noch einen hohen Grad an Erfahrung und Wissen erforderlich macht. Dies ist gerade bei der Analyse von menschlicher DNA von besonderer Brisanz, da ausgehend von den Ergebnissen einer DNA-Analyse Entscheidungen und Diagnosen von großer Tragweite getroffen werden.

## 1.3 Was bedeutet integrierte automatische genetische Analyse?

Es wurden bereits verschiedenen Techniken der „Automatischen DNA-Analyse“ erwähnt: PCR, DNA-Sequenzierung, DNA-Fragmentanalyse. Diese Aufzählung ist noch nicht vollständig. Wir möchten in dem vorliegenden Buch dem Leser den gesamten Prozeß der automatischen DNA-Analyse vom biologischen Material bis hin zur Datenauswertung aufzeigen und dabei auch in den einzelnen Kapiteln immer wieder auf die Integration der verschiedenen Teilprozesse hinweisen.

### 1.3.1 Teilbereiche der molekularen DNA-Analyse

Ausgehend vom biologischen Material läßt sich die „Automatische DNA-Analyse“ unterschiedlichster Herkunft in folgende Teilbereiche gliedern:

1. Probenvorbereitung der DNA
2. Unterstützende Probenvorbereitung durch synthetische hergestellte DNA (DNA-Synthese)
3. Spezifische DNA-Anreicherung mittels PCR
4. Analyse der DNA durch Sequenzbestimmung, Größenbestimmung oder Quantifizierung
5. Analyse und Interpretation der Daten

Die Probenvorbereitung der DNA beinhaltet die primäre Bereitstellung der DNA aus dem biologischen Material. Die DNA muß dazu aus Zellkulturen, Gewebeproben oder anderen biologischen Materialien isoliert und so weit aufgereinigt werden, daß sie für andere, nachfolgende Arbeitsschritte verwendbar wird. Die DNA-Synthese ist eine automatisierte organisch-chemische Herstellung von DNA-Hilfsmolekülen (z. B. DNA-Primern), die für alle nachfolgenden DNA-Analysenmethoden von essentieller Bedeutung sind. Die DNA-Primermoleküle werden als sogenannte „Starter“ (Primer) sowohl für die Durchführung der PCR als auch für die DNA-Sequenzierung benötigt.

Ausgehend von der isolierten DNA, kann dann ein definierter Zielbereich mittels der PCR spezifisch angereichert werden und schließlich durch die enzymatische DNA-Sequenzierung oder Fragmentanalyse bzw. Quantifizierung analysiert werden. Die gewonnenen Analysedaten werden im letzten Schritt der „Automatischen DNA-Analyse“ ausgewertet, indem sie mit Datenbanken oder anderen Daten verglichen, editiert und dokumentiert werden.

### **1.3.2 Das Konzept der Integration**

In der „Automatischen genetischen Analyse“ geht der Automatisierungsprozeß schrittweise voran. Einzelne Teilprozesse, wie die Sequenzanalyse, Fragmentanalyse und DNA-Synthese, sind schon seit einigen Jahren zumindest teilweise automatisiert. Andere Teilbereiche, wie die PCR, Probenvorbereitung und Datenanalyse, sind gerade im Prozeß der Automatisierung, bzw. Automatisierungslösungen sind in der Entwicklung. Ziel ist es, anwendungsspezifische, komplette automatisierte „Analysestrecken“ zu schaffen. Dabei ist das Konzept der Integration verschiedener Teilprozesse eine entscheidende Größe.

Die Integration muß vorallem folgende Faktoren umfassen:

1. Kompatibilität der Protokolle und Methoden verschiedener Teilprozesse
2. Standardisierung und Datenkompatibilität in allen Teilbereichen
3. Übergreifende und kompatible Automatisierung aller Teilbereiche

In den nachfolgenden Kapiteln soll an geeigneter Stelle auf diese Punkte hingewiesen werden.

This page intentionally left blank

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

*Dagmar Schuster*

## **2.1 Einführung**

Die erfolgreiche DNA-Analytik setzt eine sorgfältige Präparation der für die Reaktion benötigten DNA voraus [1]. Eine Reihe von Präparationsmethoden können hierfür eingesetzt werden, wobei im Rahmen dieses Kapitels nicht auf jede Methode im einzelnen eingegangen werden kann. Die wichtigsten Präparationsmethoden sollen allerdings kurz beschrieben werden [2].

Neue Technologien sind oft Schrittmacher, gerade für die biologische und medizinische Forschung. Sie geben den Anstoß zur Entwicklung von neuen oder erleichtern die Anwendung schon bekannter und grundlegender Arbeitstechniken.

Die präzise Handhabung von Mikrovolumina unter 1 µl gewinnt bei molekularbiologischen Arbeitsmethoden zunehmend an Bedeutung [3]. Zum einen für die Erreichung konstant guter Ergebnisse, zum anderen aber auch, um die Volumina von Reaktionsansätzen zu reduzieren, damit Kosten eingespart werden können. Das gilt vor allem für Methoden, bei denen große Probenmengen anfallen, wie z. B. die DNA-Sequenzierung und DNA-Fragmentanalyse oder Anwendungen der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR).

Automatische Arbeitsstationen für die „Template-Präparation“ und die Sequenzierungsreaktionen sind von entscheidender Signifikanz, um einen hohen Ausstoß von Proben mit hoher Qualität und reproduzierbaren Ergebnissen zu ermöglichen [4]. Es ist mühsam, in „Handarbeit“ diese umfangreichen und großen Projekte abzuarbeiten.

Wichtig ist, eine gute Balance zwischen der Reinheit der „Template-DNA“ und ihren Herstellungskosten zu finden. Ein hoher Aufreinigungsgrad ist immer Voraussetzung für die automatischen Anwendungen.

## **2.2 Vektoren für die DNA-Präparation**

Der Vektor ist eines der wesentlichen Elemente der Gentechnologie. Vektoren können Bakteriophagen (Viren, die kleine Bakterien befallen) und Plasmide (kleine, ringförmige geschlossene DNA-Stücke, die neben den eigentlichen Bakterienchromosomen in der Bakterienzelle existieren) sein. An definierten Stellen