

Primer-Design

DNA-Primer werden in der Molekularbiologie bei der PCR und der DNA-Sequenzierung eingesetzt. Es handelt es sich hierbei um so genannte einzelsträngige Oligonucleotide, die als Startsequenz für die DNA-Synthesereaktion dienen.

Die PCR (polymerase chain reaktion)

Eine PCR läuft in der Regel in drei Schritten ab. Erstens die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs (95°C), zweites das Annealing, die Hybridisierung der Primer (=Binden der Primer an die DNA-Matrize) und drittens der Elongation, die Kettenverlängerung (72°C) (s. Abbildung 1).

Die PCR wird eingesetzt, um spezifische Sequenzbereiche, von denen die flankierenden Regionen bekannt sein müssen (Primerbindstellen), zu vermehren (amplifizieren).

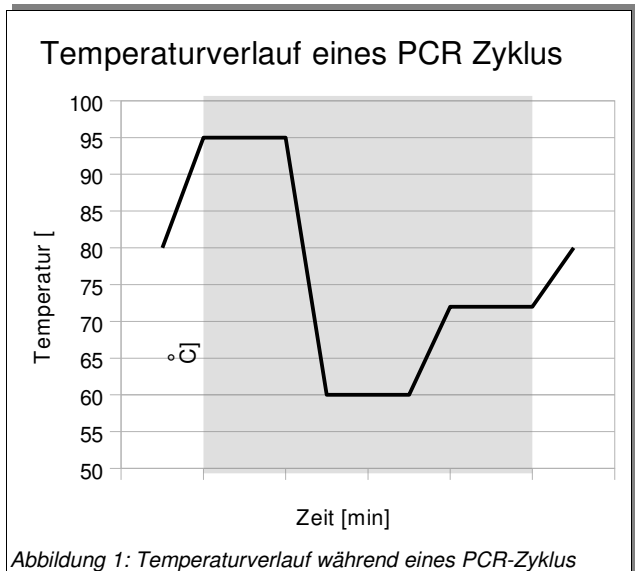
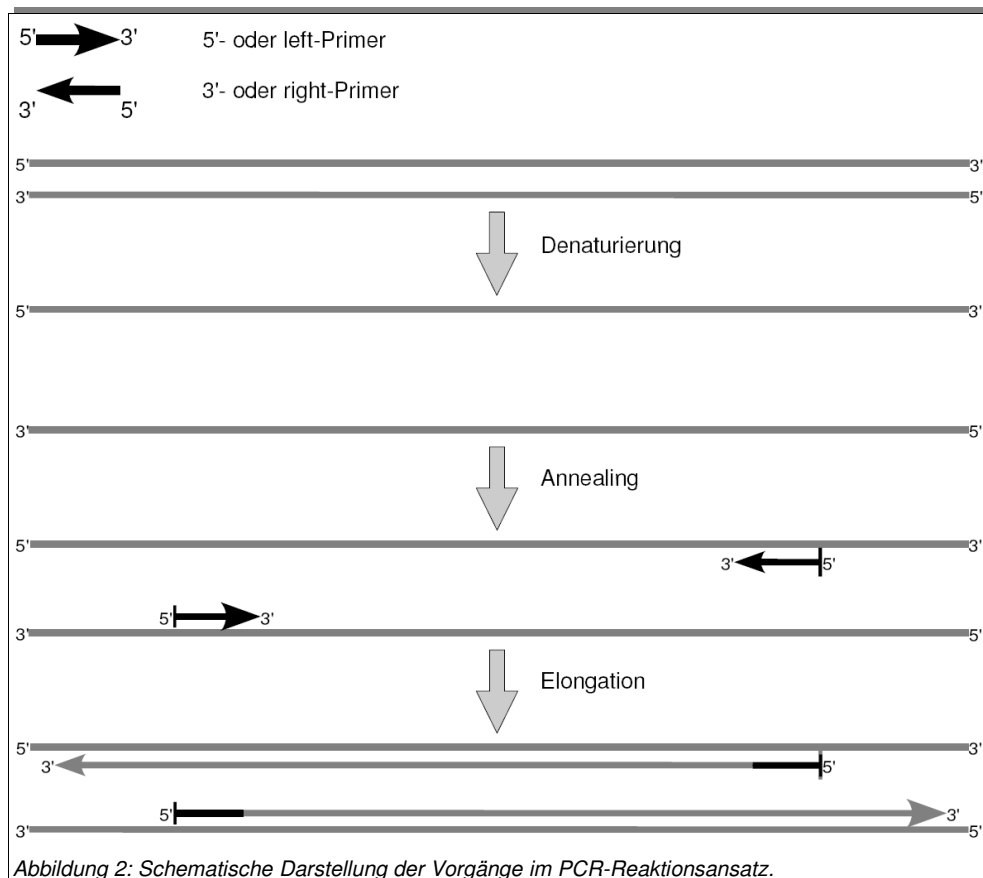


Abbildung 1: Temperaturverlauf während eines PCR-Zyklus

Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 2 die Vorgänge, die während eines PCR-Zyklus im Reaktionsansatz ablaufenschematisch dargestellt.



Auswahl von PCR-Primern

Die **Primer** müssen so gewählt werden, dass sie **spezifisch hybridisieren**. Das heißt, sie dürfen nur an der gewünschten Stelle an der DNA binden. Zu beachten ist dabei, dass das menschliche Genom aus ca. 3.000.000.000 Basenpaaren besteht. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass **am 3'-Ende** mindestens zwei Basen stehen, die drei Wasserstoffbrücken ausbilden (**G oder C**).

Länge des Primers und Wahrscheinlichkeit des Misspriming

Für ein Dinucleotid gibt es 4^2 Kombinationsmöglichkeiten, für ein Trinucleotid 4^3 . Statistisch ist so für ein Trinucleotid alle $4^3 = 64$ Basen eine Hybridisierungsmöglichkeit gegeben. Im Bezug auf das menschliche Genom würde ein Trinucleotid an $3 \cdot 10^9 \cdot 64^{-1} = 4,6875 \cdot 10^7$ Stellen hybridisieren können.

Aufgabe

Bestimmen Sie die Kombinationsmöglichkeiten und die Anzahl der möglichen Bindestellen im menschlichen Genom.

- 8-mer Primer (Oligonucleotid aus 8 Basen)
Kombinationsmöglichkeiten: $4^8 = 65536$
→ mögliche Hybridisierungsstellen im menschlichen Genom: 45776
- 17-mer Primer bindet rein rechnerisch alle $4^{17} = 17\,179\,869\,184$ bp.
→ mögliche Hybridisierungsstellen im menschlichen Genom: kleiner eins

Folgerung:

Ab einer Länge von 17 Nucleotiden ist ein Primer spezifisch, bezogen auf das menschliche Genom ($3 \cdot 10^9$ Nucleotiden).

Annealing- und Schmelztemperatur (T_m)

Die ideale Hybridisierungstemperatur (Annealingtemperatur) muss einerseits so niedrig sein, dass es zur Hybridisierung zwischen Primer und Matrize kommt, und andererseits so hoch, dass sich keine fehlgepaarten Hybride bilden. Diese Temperatur kann man abschätzen, indem man die Schmelztemperatur (T_m) des Hybrids aus Primer und Matrize ermittelt.

Bei T_m dissoziiert („schmilzt“) das vollständig gepaarte Hybrid; bei 1 bis 2°C darunter können sich in der Regel nur richtige Hybride zwischen Primer und Matrize bilden.

Formel zur Ermittlung der T_m :

$$T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T) [^\circ\text{C}]$$

Die Hybridisierungstemperatur in einem PCR-Experiment sollte dann für beide Primer ca. 1 bis 2°C unter der T_m liegen.



Aufgaben

Bestimmen Sie für die folgenden Oligonucleotide die Schmelz- und die Annealingtemperatur.

Primersequenz (5' → 3')	Rechnung	T_m [°C]	Annealing- temp. [°C]
AGACATCAGAGAGAGACCC	$4 \cdot (5+5) + 2 \cdot (8+1) = 40 + 18 = 58$	58	56-57
ACAGGATTTAGCCTACGG	$4 \cdot (5+4) + 2 \cdot (5+4) = 36 + 18 = 54$	54	52-53
TAGCCAGAGGTAGCCCAGG	$4 \cdot (7+5) + 2 \cdot (5+2) = 48 + 14 = 62$	62	60-61

Nennen Sie die zwei Faktoren von denen die Spezifität der Primerhybridisierung im wesentlichen abhängt:

1. von der Länge
2. von der Schmelztemperatur

Ermitteln Sie die Primersequenzen:

Die dargestellte Sequenz soll via PCR amplifiziert werden. Die Primer sollen so gewählt werden, dass sie an den unterstrichenen Bereichen binden.

```

5' - TTGATTGTTTTTCCCCACTGCTGATGCAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAGGTGAACAAGAACGAAAAGTAATAAATTCG - 3'
      |||
3' - AACTAACAAAAAAGGGGGTGACGACTACGTCACACACACACACACACACTCCACTTGTTCTTGCTTTTTCTATTATTAAGC - 5'
  
```

left-Primer: Sequenz: 5' - GATTGTTTTTCCCCACTGC - 3'

right-Primer: Sequenz: 5' - TCTTTTCTTTCTTCTTCACC - 3'

Weitere wichtige Kriterien zum Primerdesign

- Beide Primer dürfen nicht komplementär zueinander sein.
=> sonst Dimerenbildung
- Beide Primer müssen eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen
=> sonst keine spezifische Hybridisierung beider Primer möglich
- Das 5'-Ende des Primers darf nicht komplementär zum 3'-Ende sein
=> sonst Haarnadel-Bildung

