

Simulation einer Polymerase-Kettenreaktion

mit unterschiedlichen Polymerisationsfehlerraten

Selina Müller

29. Juni 2017

Molekulare Algorithmen

1. Einführung in die PCR
2. Fehler bei der PCR
3. Simulation der PCR

Einführung in die PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion

Kopierprozess der DNA (Strangduplikation).

Benötigt:

- Template
- Primer
- Polymerase (Enzym)

Die PCR besteht aus den Operationen Melting, Annealing und Polymerisation.

Durch Erhitzen der DNA-Stränge werden die Wasserstoffbrücken aufgebrochen und es entstehen komplementäre Einzelstränge.

Zusammenlagern von mindestens zwei Molekülen (müssen antiparallel sein) und Bildung von Wasserstoffbrücken. Im Falle der PCR: Primer lagern sich an den Anfangs- oder Endsequenzen der Einzelstränge ab.

Die fehlenden Nukleotide der Einzelstränge werden vom 3'-Ende ab aufgefüllt. Dies geschieht durch das Enzym Polymerase, welches auch die Temperatur des Vorgangs bestimmt.

Fehler bei der PCR

Annealing

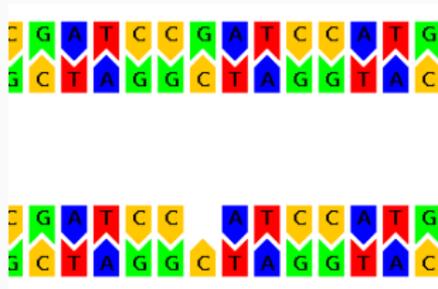
- Bei einem unvollständigen Prozess können Reste von Einzelsträngen übrig bleiben (auch dann, wenn komplementäre Sequenzen vorhanden sind).
- Es kann nichtlineare DNA entstehen (Sequenzen, welche nicht durchgängig komplementär sind, lagern sich an).
- Anstatt einer Template-Primer-Interaktion kann es auch zu unerwünschter Template-Template-Interaktion kommen.

Template1Template2#a47 No: 2 SeqLength: 100



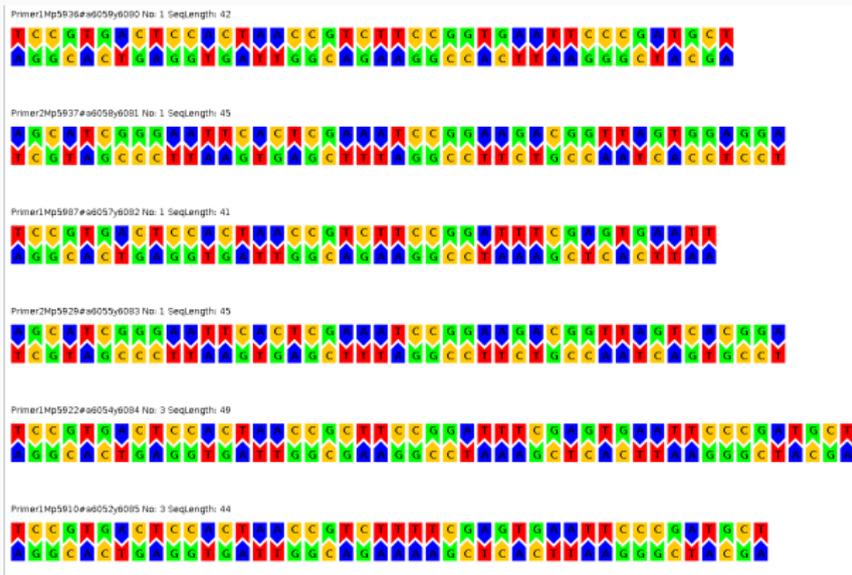
Polymerisation

Fehler in der Polymerisation führen zu DNA-Strängen mit fehlenden Basen oder gar ganzen Sequenzen.



Simulation der PCR

Virtuelle Reagenzgläser zur Simulation von DNA-Operationen mit Seiteneffekteinflüssen.



Synthese

The screenshot displays a software window with two tabs: "Standard" and "Seiteneffekte". The "Seiteneffekte" tab is active. It contains the following fields and controls:

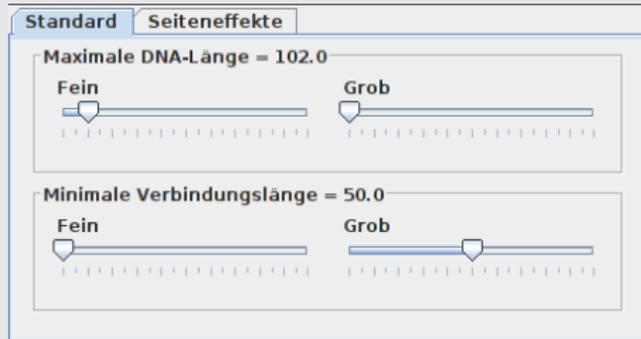
- Tubename:** Tubel
- Sequenzn...:** Template1
- Sequenz: ...:** cacagagaatggatgcgtcgatcacgaaatgaggcgtaa... (truncated)
- Anzahl der Kopien = 11.0**
- Fein:** A slider control with a shield icon on the left and a horizontal bar with tick marks below it.
- Grob:** A slider control with a shield icon on the left and a horizontal bar with tick marks below it.

Seiteneffekte: Mutationsrate und Deletionsrate.

Union

Seiteneffekt: Verlustrate.

Annealing



Seiteneffekt: Verlustrate.

Melting

Seiteneffekt: Unvollständige Ausführung

Polymerisation

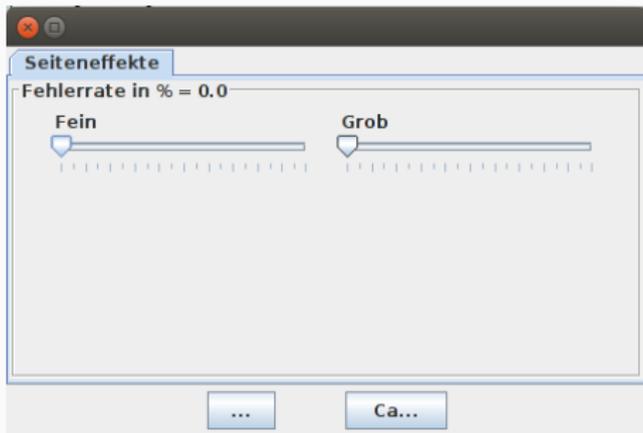
Seiteneffekt: Fehlerrate.

- 2 Templates mit je 100 Basen (11 Exemplare)
- 2 Primer mit je 15 Basen (50 Exemplare)
- PCR-Durchlauf mit 0.0% Fehlerrate bei der Polymerisation
- weitere PCR-Durchläufe mit variierender Fehlerrate bei der Polymerisation

Erscheinung	Anzahl
Template1Primer1	10
Template2Primer2	10
Template1Template2	1
Primer1Primer2	1
Primer1Primer2Primer1Primer2	17

Tabelle 1: Ergebnis von Synthese, Union und Annealing ohne Seiteneffekteinflüsse bei je 11 Startexemplaren der Templates und je 50 Startexemplaren der Primer.

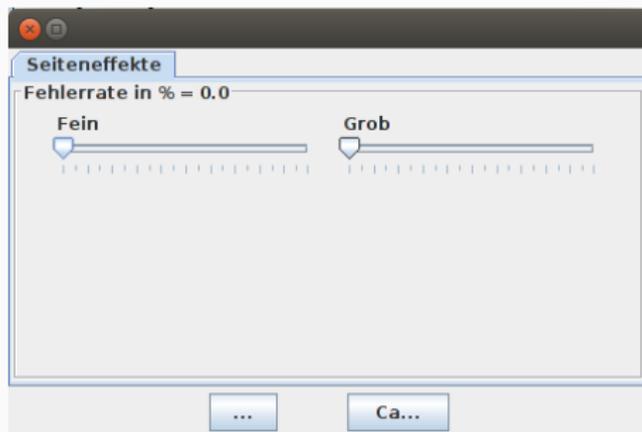
Durchlauf mit Fehlerrate: 0.0



Bei einer fehlerfreien PCR sollten sich die Einzelstränge bei jedem neuen Zyklus verdoppeln.

(Bestes) Simulationsergebnis: 11 Einzelstränge -> 21 Einzelstränge.

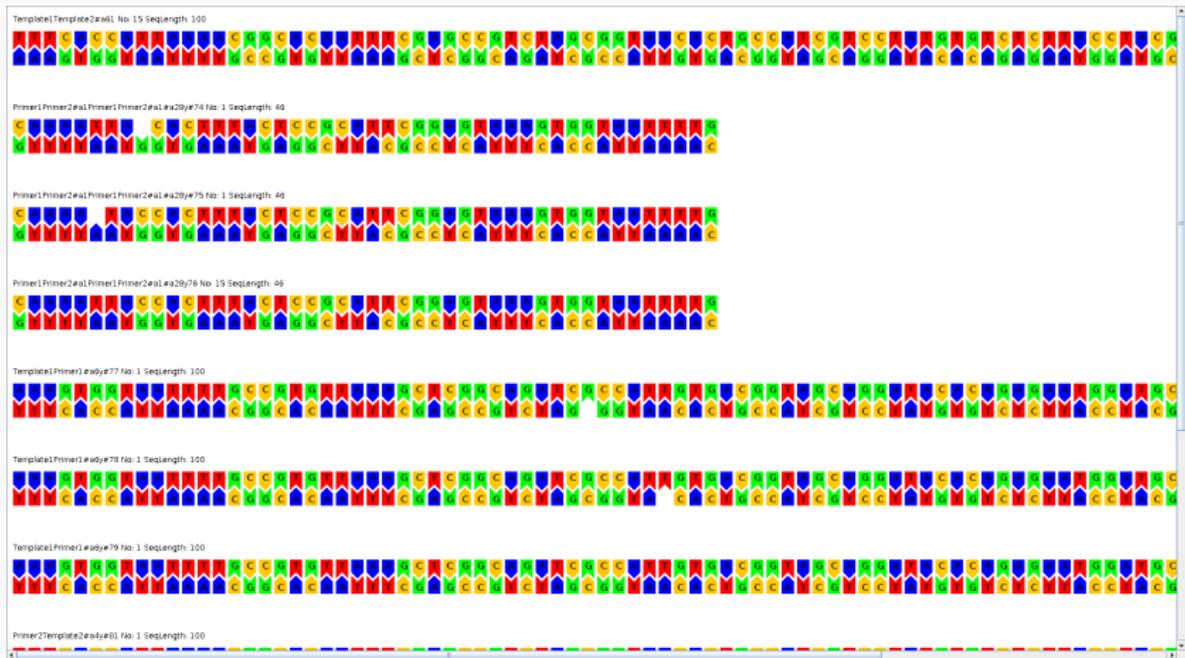
Variierung der Fehlerraten



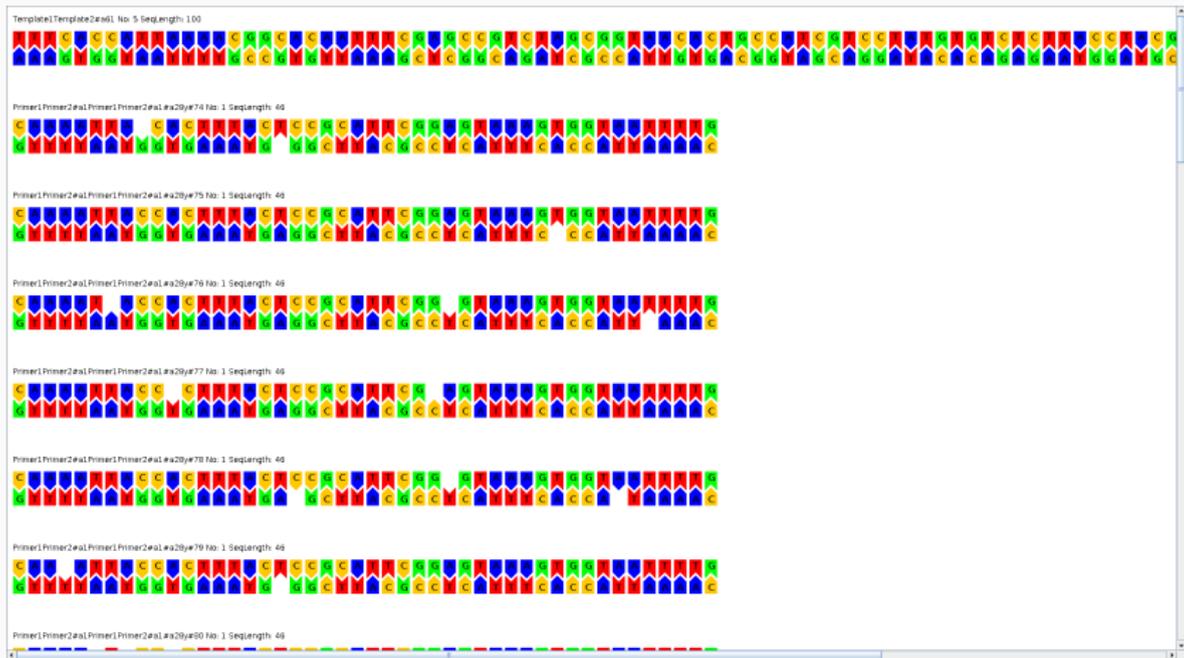
Fehlerraten

0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0, 8.0, 10.0, 20.0, 50.0, 80.0, 99.0.

Polymerisationsfehlerrate 0.5%



Polymerisationsfehlerrate 5.0%



Polymerisationsfehlerrate 50.0%



Variierung der Fehlerraten

Fehlerrate	T1	T2	V.-Rate	Fehlerrate	T1	T2	V.-Rate
00.0%	21	21	1,9 ¹ (2 ¹)	03.0%	13	13	1,2 ¹
00.2%	20	20	1,8 ¹	05.0%	13	13	1,2 ¹
00.5%	18	18	1,6 ¹	08.0%	13	13	1,2 ¹
00.8%	18	16	1,6 ¹ / 1,4 ¹	10.0%	13	13	1,2 ¹
01.0%	16	15	1,4 ¹ / 1,3 ¹	20.0%	13	13	1,2 ¹
01.5%	16	15	1,4 ¹ / 1,3 ¹	50.0%	13	13	1,2 ¹
02.0%	15	14	1,3 ¹ / 1,2 ¹	80.0%	13	13	1,2 ¹
02.5%	13	14	1,2 ¹	99.0%	13	13	1,2 ¹

Tabelle 2: Resultierende Stranganzahl bei variierender Fehlerrate mit einer Anfangsanzahl von 11 DNA-Einzelsträngen.

Variierung der Fehlerraten

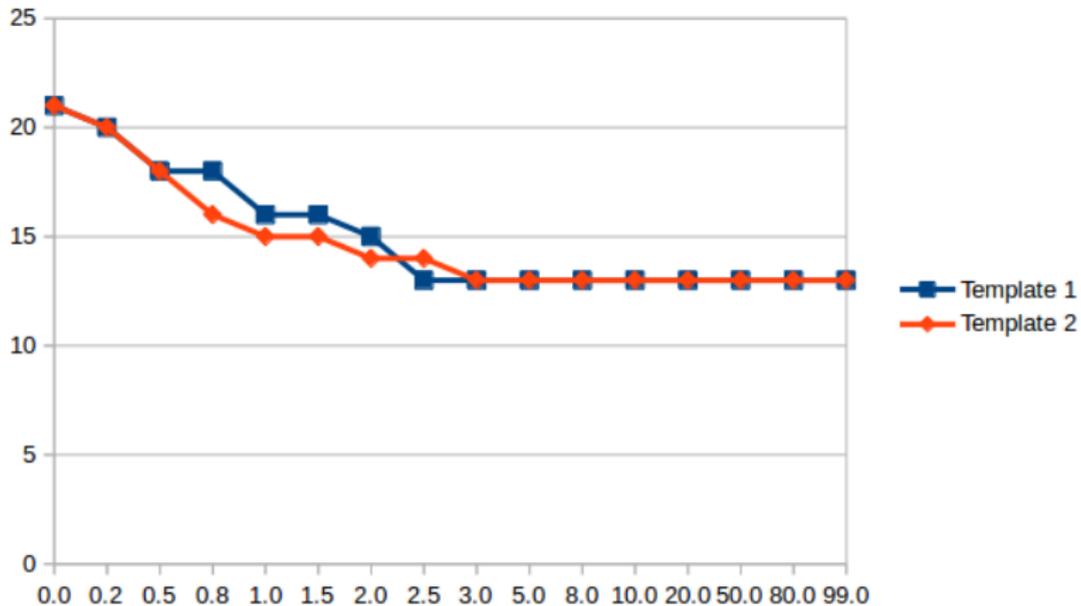


Abbildung 1: Resultierende Stranganzahl bei variierender Fehlerrate mit einer Anfangszahl von 11 DNA-Einzelsträngen.

Demo

- Thomas Hinze, Monika Sturm. *Rechnen mit DNA: eine Einführung in Theorie und Praxis*. Oldenburg, 2004.
- Paul Stothard. *The Sequence Manipulation Suite*.
http://www.bioinformatics.org/sms2/sample_dna.html
(19.06.2017)
- John A. Pezza, Rebecca Kucera, Luo Sun. <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/polymerase-fidelity-what-is-it-and-what-does-it-mean-for-you>
(24.06.2017)
- https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Nucleic_Acid/DNA/DNA_Denaturation (22.06.2017)