Long range PCR

J. Arnemann

Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland

Synonym(e) Distanz-PCR

Englischer Begriff long range PCR

Definition Die Long range PCR ermöglicht die Amplifikation von größeren und komplexen DNA-Abschnitten von über 30 kb Länge.

Beschreibung Die klassische PCR-Reaktion (s. ► [PCR \(Polymerase-Kettenreaktion\)](#)) amplifiziert sicher DNA-Targets mit einer durchschnittlichen Länge von 3–4 kb. Bei Amplifikation von größeren Targetlängen unter Standardbedingungen kann wegen vermehrt unspezifischer Reaktionen eine Zunahme der Fehlerrate auftreten. Bei einer Amplifikation größerer Templates von 5–30 kb Länge müssen spezielle (Taq-)Polymerasen oder auch Kombinationen davon mit spezifischen Protokollen eingesetzt werden. Verschiedene

„Long range PCR“-Kits sind kommerziell verfügbar und auf die Amplifikation größerer DNA-Abschnitte zugeschnitten. Zuverlässige Protokolle werden dabei gestellt.

Allgemein gilt, dass der Reaktionsansatz auf Eis zu erfolgen hat und anschließend schnellstmöglich in einen auf 94 °C vorgeheizten Cyclor überführt und das Cyclor-Programm gestartet werden muss. Die eingesetzten Primer sollten zwischen 20–40 bp lang sein und einen GC-Gehalt von 40–60 %, optimalerweise über 50 %, sowie einen Schmelzpunkt (T_m) von über 60 °C haben. Bei problematischen Templates mit einem sehr hohen GC-Gehalt empfiehlt sich oftmals eine Zugabe von Additiven, wie z. B. DMSO, Formamid oder einem Spezialmix des Kitherstellers. Im PCR-Protokoll sollte die Elongationstemperatur 68 °C statt 72 °C betragen und die Elongationszeit entsprechend der Größe des Templates nach der Faustformel 2,5 s/100 bp individuell berechnet werden.

Literatur

Cheng S, Fockler C, Barnes W, Higuchi R (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci* 91:5695–5699