Nested-PCR

J. Arnemann

Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln,
Deutschland

Synonym(e) Verschachtelte PCR; PCR, verschachtelte

Englischer Begriff nested PCR

Definition Bei einer Nested-PCR wird aus dem Produkt einer ersten PCR-Reaktion (s. ► [PCR \(Polymerase-Kettenreaktion\)](#)) eine zweite mit unterschiedlichen Primern gestartet, um die Spezifität der gewünschten Zielsequenz zu erhöhen.

Beschreibung Das Ziel einer Nested-PCR, auch verschachtelte PCR genannt, besteht in der Anhebung der Spezifität eines PCR-Produkts durch den Einsatz von 2 aufeinander aufbauenden PCR-Reaktionen. Wenn die Bindungseigenschaften ausgewählter Primer suboptimal sind, z. B. weil sie gegebenenfalls noch anderweitig auf dem DNA-Template binden können, ergeben sich in der Darstellung des PCR-Produkts oftmals multiple Banden, die das gewünschte Fragment kontaminieren. Um die Spezifität der Zielsequenz bzw.

des PCR-Fragments zu erhöhen, wird eine zweite PCR-Reaktion mit dem Produkt der ersten Reaktion und einem zweiten, innerhalb des Fragments lokalisierten Primerpaar durchgeführt, aus der Erwartung heraus, dass im Gegensatz zu den unspezifischen PCR-Fragmenten nur die Zielsequenz spezifisch amplifiziert wird. Zur praktischen Durchführung werden in der ersten PCR-Reaktion relativ wenige Zyklen (15 bis maximal 20) durchgeführt. Anschließend wird lediglich ein Bruchteil (0,5–1 µL) des PCR-Produkts aus dem Reaktionsgefäß entnommen und als DNA-Matrize zu einer zweiten PCR-Reaktion pipettiert, die nun ein Primerpaar enthält, das in der Zielsequenz weiter innen lokalisiert ist, d. h. ein kürzeres Fragment ergibt, und eine gegenüber der ersten Reaktion möglichst abweichende ► [Annealing](#)-Temperatur haben sollte. In der zweiten PCR-Reaktion werden i. d. R. bis zu 25 Zyklen durchgeführt. Durch dieses Vorgehen werden die unspezifischen Amplikons nicht weiter amplifiziert und die gewünschte Zielsequenz spezifisch angereichert.

Literatur

Severini GM et al (1993) Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J Clin Microbiol* 31:1345–1349