

S

Strand Displacement Amplifikation (SDA)



J. Arnemann

Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland

Synonym(e) MDA; Multiple Displacement Amplifikation; SDA

Englischer Begriff strand displacement amplification; SDA; multiple displacement amplification; MDA

Definition Strand Displacement Amplifikation (SDA), alternativ auch Multiple Displacement Amplifikation (MDA) genannt, ist eine Methode, geringe, aber durchaus hochmolekulare DNA-Mengen isothermal zu amplifizieren.

Beschreibung Durch Einsatz der Phi-29-DNA-Polymerase lässt sich durch eine isothermale Amplifikation aus geringsten, durchaus hochmolekularen (bis zu 100 kb langen) DNA-Mengen eine Anreicherung um den Faktor 1000–10.000 erreichen. Die minimale DNA-Mengen werden in der Literatur mit 100 fg bis 1 pg angegeben, d. h. eine Verdünnung 1:1000 der herkömmlichen DNA-Menge für eine klassische PCR-Reaktion.

Im Gegensatz zur klassischen PCR-Amplifikation mit einer Fehlerquote von 1:2000 bp liegt die Fehlerquoten der Phi-29-DNA-Polymerase bei 1:3.000.000 bp und erlaubt daher eine hohe diagnostische Sicherheit bei den amplifizierten DNA-Fragmenten.

Die Phi-29-DNA-Polymerase ist ein sehr stabiles Enzym und kann pro Bindung an die Ziel-DNA bis zu 70.000 Basenpaare mit einer Rate von 25–50 Nukleotiden/s am Stück synthetisieren und die Ziel-DNA damit ersetzen (Displacement).

Die hohe Amplifikationsrate ist dadurch bedingt, dass bei laufender Reaktion sekundäre Primer-Annealing-Ereignisse an den primären Produkten ansetzen und die Syntheserate dadurch vervielfältigen. Die Primer können je nach Applikation variieren. So können Random- oder Hexamer-Primer eingesetzt werden, um potenziell das gesamte Genom einer Zelle zu amplifizieren, aber auch gen- oder sequenzspezifische Primer können eingesetzt werden, um gezielte Regionen, wie z. B. Translokationen oder klonale Rezeptorarrangements in der Leukämie oder Lymphomdiagnostik, zu analysieren.

In der praktischen Durchführung wird die zu amplifizierende DNA durch Hitzedenaturierung einzelsträngig gemacht und unter Zugabe von Nukleotiden, Primern und Phi-29-DNA-Polymerase zum Reaktionsgemisch über Nacht bei 30 °C (isothermal) inkubiert. Eine bis zu 10.000-fache Vermehrung der DNA erlaubt eine sichere diagnostische Analyse.

Literatur

Luthra R, Medeiros LJ (2004) Isothermal multiple displacement amplification – A highly reliable approach for generating unlimited high molecular weight genomic DNA from clinical specimens. *J Mol Diagn* 6:236–242