

C. R. Newton und A. Graham

PCR

Aus dem Englischen übersetzt
von Kurt Beginnen

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin · Oxford

Inhalt

Vorwort	11
Danksagung	13
Abkürzungen	14
I. Grundreaktion und Methoden	
1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
1.1 Literatur	25
2. Geräte, Reagentien und Hilfsmittel	27
2.1 Geräte	27
2.2 Wahl der Enzyme	30
2.2.1 <i>Taq</i> /Amplitaq®-DNA-Polymerase	32
2.2.2 <i>Vent</i> [™] -DNA-Polymerase	33
2.2.3 <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	34
2.2.4 <i>Tht</i> -DNA-Polymerase	34
2.2.5 <i>UITma</i> [™] -DNA-Polymerase	35
2.3 Weitere PCR-Reagentien	35
2.3.1 Desoxynucleosidtriphosphate	35
2.3.2 Puffer und MgCl ₂	36
2.3.3 Hemmstoffe und Beschleuniger der PCR	37
2.3.4 DNA-Matrize	39
2.4 Primer	40
2.4.1 Konstruktion der Primer	40
2.4.2 Schmelztemperatur (T_m) der Primer	41
2.4.3 Markierung der Primer	42
2.4.4 Berechnung der Primer-Konzentration	43
2.5 Hilfsmittel	44
2.6 Literatur	45

3.	Vervielfältigung des richtigen Amplikons	47
3.1	Nachweis und Untersuchung von Amplikons	47
3.2	Vermeiden von Verunreinigungen	53
3.2.1	Uracil- <i>N</i> -Glykosylase	55
3.2.2	UV-Strahlung	56
3.2.3	Behandlung mit Enzymen	56
3.2.4	Behandlung mit Psoralen	56
3.3	Spezifität der Reaktion	57
3.4	Heißstart (<i>hot start</i>)	57
3.5	Verschachtelte PCR	59
3.6	Literatur	59

II. PCR-Techniken und Anwendungen

4.	Klonierung von PCR-Produkten	63
4.1	Einführung von Restriktionsschnittstellen	63
4.2	Klonierung über glatte Enden	64
4.3	T-A-Vektoren	65
4.4	Bildung von Restriktionshälften	65
4.5	Klonieren ohne Ligation (LIC)	66
4.6	Konstruktion einer cDNA-Bank mit Hilfe der PCR	68
4.7	Literatur	70
5.	Isolierung und Konstruktion von DNA-Klonen	71
5.1	PCR von Genbanken	71
5.2	Verankerte PCR	72
5.2.1	RACE-PCR	72
5.2.2	Ligationsverankerte PCR	75
5.3	RNA-(RT-)PCR	75
5.4	PCR mit degenerierten Primern	77
5.5	Literatur	78
6.	Modifikation von PCR-Produkten	81
6.1	Einbau von Promotoren und Ribosomenbindungsstellen	81
6.2	Einsatz von Primern für die Insertion zusätzlicher Restriktionsschnittstellen	83
6.3	Literatur	84

7.	Verknüpfen überlappender PCR-Produkte	85
7.1	Bildung neuer Genkombinationen aus genomischer DNA	85
7.2	Synthetische Gene	88
7.3	Literatur	89
8.	PCR-Mutagenese	91
8.1	Deletion von Sequenzen	91
8.2	Basensubstitutionen	92
8.3	Insertionsmutagenese	97
8.4	Literatur	99
9.	Sequenzierung von PCR-Produkten	101
9.1	Direkte Sequenzierung	103
9.2	Asymmetrische PCR	105
9.3	Sequenzierung einzelsträngiger DNA mit der Exonuclease III von Lambda	107
9.4	Zyklische Sequenzierung	107
9.5	Direkte Sequenzierung an einer Festphase	109
9.6	Genamplifizierung mit anschließender Sequenzierung der Transkripte (GAWTS)	110
9.7	Chemische Sequenzierung	111
9.8	PCR für archäologische Untersuchungen	112
9.9	Literatur	114
10.	Charakterisierung unbekannter DNA-Bereiche	117
10.1	Vektoretten-PCR	117
10.2	Inverse PCR	120
10.3	Literatur	122
11.	Nachweis von Krankheitserregern	123
11.1	Viren	124
11.1.1	Menschliche Retroviren	124
11.1.2	Andere klinisch relevante Viren	126
11.2	Bakterien	126
11.3	Untersuchungen an archivierten histologischen Präparaten	127
11.3.1	Mit Hämatoxylin oder Eosin gefärbte Gewebe- schnitte	128
11.3.2	Mit Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material	128
11.3.3	Zellabstriche	129

11.4	<i>In situ</i> -PCR	129
11.5	Literatur	131
12.	Charakterisierung bekannter Mutationen	133
12.1	System der amplifizierungsresistenten Mutation (ARMS)	133
12.1.1	Grundprinzipien	133
12.1.2	Entwurf von Primern für ARMS	135
12.2	Hybridisierung allelspezifischer Oligonucleotide an fixierte PCR-Produkte im Dot-Blot	137
12.3	Umgekehrter Dot-Blot	138
12.4	RFLP-Analyse	139
12.5	Gendiagnostik mit Multiplex-Analysen	139
12.5.1	Multiplex-PCR-Analysen bei der Duchenne-Muskeldystrophie	140
12.5.2	Multiplex-ARMS bei Cystischer Fibrose	141
12.6	Spezielle Methoden	142
12.6.1	Nachweis von Mutationen durch Einführen einer Restriktionsschnittstelle	142
12.6.2	Amplifizierung mit kompetitiven Oligonucleotid-primern (COP)	143
12.6.3	Mutationstest durch Primerverlängerung (PEST)	144
12.6.4	Mutationsnachweis mit Hilfe der 5'→3'-Exo-nucleaseaktivität der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	144
12.7	Nachweis einzelner entarteter Zellen im Anschluß an eine Krebsbehandlung	145
12.8	Diagnostik bei der <i>in vitro</i> -Befruchtung	146
12.9	Literatur	146
13.	Charakterisierung unbekannter Mutationen	149
13.1	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	149
13.1.1	Parallele DGGE	152
13.1.2	Senkrechte DGGE	152
13.2	Untersuchung von Polymorphismen im Einzelstrang (SSCP)	154
13.3	Chemische Spaltung von Fehlpaarungen	157
13.4	Literatur	159
14.	Fingerprint-Analysen	161
14.1	Zufällig amplifizierte polymorphe DNA (RAPD)	161
14.2	Mikrosatelliten	162
14.3	Typisierung von HLA-Antigenen der Klasse II	165
14.4	Literatur	167

15.	PCR-Einsatz im Rahmen der Kartierung des menschlichen Genoms	169
15.1	Durchsuchen von Genbanken und Kartierung der Enden von Cosmiden und künstlichen Hefechromosomen mit der PCR	169
15.2	Zuordnung von Amplikons zu den Chromosomen	170
15.3	Alu-PCR	171
15.4	Tests an transgenen Tieren	172
15.5	Amplifizierung kleingeschnittener Chromosomen	173
15.6	Literatur	174
16.	Quantitative PCR	175
16.1	DNA	177
16.2	RNA	178
16.3	Literatur	179
Anhang A: Glossar		181
Anhang B: Bezugsquellen		191
Anhang C: Weiterführende Literatur		197
Anhang D: Patentrechte		199
Index		201