

Hans-Joachim Müller  
Daniel Ruben Prange

# PCR – Polymerase- Kettenreaktion

2. Auflage



Springer Spektrum

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
1.1	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	2
1.2	DNA-Polymerasen .....	3
1.3	PCR-Puffer .....	4
1.4	MgCl <sub>2</sub> und MgSO <sub>4</sub> .....	5
1.5	Nucleotide .....	5
1.6	PCR-Beschleuniger .....	5
1.7	Inhibitoren .....	5
1.8	Oligonucleotide .....	6
1.9	PCR-Matrize .....	7
1.10	PCR-Thermocycler .....	7
	Literatur .....	8
<b>2</b>	<b>Allgemeine PCR-Parameter</b> .....	9
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
2.1	Reaktionsansätze .....	10
2.2	Thermocycler-Profile .....	10
2.3	PCR-Kontaminationen .....	11
2.4	PCR-Kontrollen .....	11
2.5	Allgemeines Troubleshooting .....	11
<b>3</b>	<b>PCR als Detektionsmethode</b> .....	13
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
3.1	Einleitung .....	14
3.2	Sensitivität .....	14
3.3	DNA-Polymerasen .....	14
<b>4</b>	<b>PCR als Klonierungsmethode</b> .....	17
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
4.1	Lesegenauigkeiten .....	18
4.2	Proofreading-Polymerasen .....	18
	Literatur .....	20
<b>5</b>	<b>PCR für die Standard-Klonierung</b> .....	21
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
5.1	Vorbereitung der PCR-Amplifikate für den Restriktionsverdau .....	22
5.2	Restriktionsverdau .....	22
5.2.1	Hydrolyse des PCR-Amplifikates .....	22
5.2.2	Hydrolyse des Vektors .....	23
5.2.3	Dephosphorylierung des Vektors .....	23
5.2.4	Agarosegelelektrophorese .....	23

5.3	<b>Ligation</b> .....	24
5.3.1	Sticky-end-Ligation .....	25
5.3.2	Blunt-end-Ligation .....	25
5.4	<b>Transformation von Bakterien</b> .....	25
5.4.1	Herstellung $\text{CaCl}_2$ -kompetenter <i>E.coli</i> Zellen .....	26
5.4.2	Transformation .....	26
5.4.3	Analyse rekombinanter Klone .....	27
	Literatur .....	28
<b>6</b>	<b>T/A-Cloning</b> .....	29
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
6.1	Herstellung der PCR-Fragmente .....	30
6.2	Ligation des PCR-Fragmentes mit einem T-Vektor .....	30
6.3	Anfügen von A- oder T-Überhängen an linearisierte DNA-Fragmente .....	31
	Literatur .....	32
<b>7</b>	<b>Ligase-unabhängige-Klonierung (LIC)</b> .....	33
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
7.1	Generierung der 5'-Überhänge .....	34
7.1.1	3'-Exonucleasehydrolyse des LIC-Vektors .....	34
7.1.2	3'-Exonucleasehydrolyse des PCR-Produktes .....	34
7.2	Hybridisierung der kompatiblen Enden .....	34
	Literatur .....	36
<b>8</b>	<b>UNG-Klonierung</b> .....	37
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
8.1	Generierung der 3'-Überhänge .....	38
8.2	Hybridisierung der kompatiblen Enden .....	38
	Literatur .....	39
<b>9</b>	<b>Surf-Klonierung</b> .....	41
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur .....	43
<b>10</b>	<b>Megaprime-PCR</b> .....	45
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
10.1	Amplifikation des genspezifischen Fragmentes A .....	46
10.2	Amplifikation des Fragmentes B .....	47
10.3	Reinigung der PCR-Produkte .....	47
10.4	Verschmelzung der PCR-Fragmente A und B .....	47
	Literatur .....	48

<b>11</b>	<b>RT-PCR</b> .....	49
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
11.1	„Zweipuffer“ RT-PCR .....	50
11.2	„Einpuffer“ RT-PCR .....	51
11.2.1	AMV und Taq/Pwo-DNA-Polymerase-Mix .....	52
11.2.2	Tth-DNA-Polymerase .....	52
	Literatur .....	54
<b>12</b>	<b>RACE-PCR</b> .....	55
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
12.1	RT-PCR des 3'-Endes .....	56
12.2	RT-PCR des 5'-Endes .....	58
12.3	Anfügen eines Poly(dG)- oder Poly(dT)-Linkers .....	59
12.4	Herstellung des „Full Length“ PCR-Fragmentes .....	59
	Literatur .....	59
<b>13</b>	<b>Quantitative PCR</b> .....	61
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
13.1	Herstellung von QPCR-Standards .....	62
13.2	Durchführung der QPCR .....	63
13.3	Auswertung der QPCR .....	64
	Literatur .....	64
<b>14</b>	<b>Real-Time-PCR</b> .....	65
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
14.1	TaqMan™ System .....	68
14.2	Molecular Beacons System .....	69
14.3	Scorpions™ System .....	71
14.4	FRET™ System .....	73
14.5	SYBRGreen™ Detektion .....	74
	Literatur .....	76
<b>15</b>	<b>Colony PCR</b> .....	77
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur .....	79
<b>16</b>	<b>PCR zur Mutationsanalyse</b> .....	81
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
16.1	Auffinden von Mutationen .....	82
	Literatur .....	83
<b>17</b>	<b>Nested PCR</b> .....	85
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur .....	87
<b>18</b>	<b>DOP-PCR</b> .....	89
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur .....	92

<b>19</b>	<b>Alu- (IRS) PCR</b> .....	93
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur .....	95
<b>20</b>	<b>PCR-Optimierung</b> .....	97
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
20.1	<b>Hotstart-PCR</b> .....	98
20.2	<b>Gradienten-PCR</b> .....	100
20.3	<b>TouchDown-PCR</b> .....	100
20.4	<b>Einsatz von DMSO und Formamid</b> .....	101
20.5	<b>Pufferoptimierungen</b> .....	102
20.5.1	Pufferoptimierung ohne Gradienten-PCR .....	102
20.5.2	Pufferoptimierung mit Gradienten-PCR.....	104
	Literatur .....	105
<b>21</b>	<b>1-Sekunden-PCR</b> .....	107
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur .....	110
<b>22</b>	<b>Long Distance-PCR</b> .....	111
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur .....	113
<b>23</b>	<b>Genotypisierung mit der PCR</b> .....	115
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
23.1	<b>RAPD-PCR</b> .....	116
23.2	<b>HLA-Klasse II Typisierung</b> .....	117
23.3	<b>ARMS-PCR</b> .....	119
23.4	<b>Multiplex-PCR</b> .....	122
	Literatur .....	124
<b>24</b>	<b>Differential Display PCR</b> .....	125
	<i>Thomas Röder</i>	
24.1	<b>Festphasen cDNA-Synthese</b> .....	127
24.1.1	Kopplung der Oligonucleotide an die Polystyrene-Partikel.....	127
24.1.2	Isolierung der polyA-RNA .....	128
24.1.3	cDNA-Synthese .....	128
24.2	<b>Durchführung der Differential-Display-PCR</b> .....	129
24.3	<b>Analyse der erhaltenen DD-PCR-Amplifikate</b> .....	129
24.4	<b>Blotting-Analyse</b> .....	130
	Literatur .....	131
<b>25</b>	<b>Emulsions-PCR (BEAMing)</b> .....	133
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur .....	138

<b>26</b>	<b>PCR-basierte Sequenzierung</b> .....	139
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
26.1	<b>Illumina Sequenzierung</b> .....	140
26.2	<b>Ion Torrent Sequenzierung</b> .....	141
	Literatur .....	143
	<b>Serviceteil</b> .....	145
	Stichwortverzeichnis .....	146