

Hans-Joachim Müller

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Methodenbuch

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin

Inhaltsverzeichnis

Danksagung V

Vorwort VII

1 Einleitung 1

- 1.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 1
- 1.2 DNA-Polymerasen 3
- 1.3 PCR-Puffer 4
- 1.4 $MgCl_2$ und $MgSO_4$ 4
- 1.5 Nucleotide 4
- 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

2 Allgemeine PCR-Parameter 9

- 2.1 Reaktionsansätze 9
- 2.2 Thermocycler-Profile 10
- 2.3 PCR-Kontaminationen 10
- 2.4 PCR-Kontrollen 10
- 2.5 Allgemeines Troubleshooting 11

3 PCR als Detektionsmethode 13

- 3.1 Einleitung 13
- 3.2 Sensitivität 13
- 3.3 DNA-Polymerasen 14

4 PCR als Klonierungsmethode 15

- 4.1 Lesegenauigkeiten 15
- 4.2 Proofreading-Polymerasen 16
- Literatur 17

5 PCR für die Standard-Klonierung 18

- 5.1 Vorbereitung der PCR-Amplifikate für den Restriktionsverdau 18
- 5.2 Restriktionsverdau 19
 - 5.2.1 Hydrolyse des PCR-Amplifikates 19
 - 5.2.2 Hydrolyse des Vektors 19
 - 5.2.3 Dephosphorylierung des Vektors 19
 - 5.2.4 Agarosegelelektrophorese 20
- 5.3 Ligation 21
 - 5.3.1 Sticky-end-Ligation 21
 - 5.3.2 Blunt-end-Ligation 22

- 5.4 Transformation von Bakterien 23
 - 5.4.1 Herstellung CaCl_2 -kompetenter *E.coli*-Zellen 23
 - 5.4.2 Transformation 23
 - 5.4.3 Analyse rekombinanter Klone 24
 - 5.4.3.1 Überimpfen der Übernachtskulturen 25
 - 5.4.3.2 Mini-Plasmidpräparation 25
 - 5.4.3.3 Restriktionsverdau der isolierten Plasmide 26
- Literatur 26

- 6 T/A-Cloning 27**
 - 6.1 Herstellung der PCR-Fragmente 28
 - 6.2 Ligation des PCR-Fragmentes mit einem T-Vektor 28
 - 6.3 Anfügen an A- oder T-Überhängen an linearisierte DNA-Fragmente 29
 - Literatur 30

- 7 Ligaseunabhängige Klonierung (LIC) 31**
 - 7.1 Generierung der 5'-Überhänge 32
 - 7.1.1 3'-Exonucleasehydrolyse des LIC-Vektors 32
 - 7.1.2 3'-Exonucleasehydrolyse des PCR-Produktes 32
 - 7.2 Hybridisierung der kompatiblen Enden 32
 - Literatur 33

- 8 UNG-Klonierung 34**
 - 8.1 Generierung der 3'-Überhänge 35
 - 8.2 Hybridisierung der kompatiblen Enden 35
 - Literatur 36

- 9 Surf-Klonierung 37**
 - Literatur 38

- 10 Megaprime-PCR 39**
 - 10.1 Amplifikation des genspezifischen Fragmentes A 40
 - 10.2 Amplifikation des Fragmentes B 41
 - 10.3 Reinigung der PCR-Produkte 41
 - 10.4 Verschmelzung der PCR-Fragmente A und B 42
 - Literatur 42

- 11 RT-PCR 43**
 - 11.1 Zweipuffer-RT-PCR 44
 - 11.2 Einpuffer-RT-PCR 45
 - 11.2.1 *AMV* und *Taq/Pwo*-DNA-Polymerase-Mix 46
 - 11.2.2 *Tth*-DNA-Polymerase 47
 - 11.2.2.1 Zweischnitt/Einpuffer-RT-PCR 47
 - 11.2.2.3 Einschnitt/Einpuffer-RT-PCR 48
 - Literatur 50

- 12 RACE-PCR 51**
 - 12.1 RT-PCR des 3'-Endes 52
 - 12.2 RT-PCR des 5'-Endes 54
 - 12.3 Anfügen eines Poly(dG)- oder Poly(dT)-Linkers 55
 - 12.4 Herstellung des Full-Length-PCR-Fragmentes 56
 - Literatur 56

- 13 Quantitative PCR** 57
 - 13.1 Herstellung von QPCR-Standards 58
 - 13.2 Durchführung der QPCR 59
 - 13.3 Auswertung der QPCR 60
 - Literatur 60
- 14 Real-Time-PCR** 61
 - 14.1 TaqMan™-System 63
 - 14.2 Molecular-Beacons-System 65
 - 14.3 Scorpions™-System 67
 - 14.4 FRET™-System 69
 - 14.5 SYBRGreen™-Detektion 71
 - Literatur 73
- 15 Colony-PCR** 74
 - Literatur 75
- 16 PCR zur Mutationsanalyse** 76
 - 16.1 Auffinden von Mutationen 76
 - 16.2 Herstellen von Mutanten 78
 - Literatur 79
- 17 Nested-PCR** 80
 - Literatur 82
- 18 DOP-PCR** 83
 - Literatur 85
- 19 Alu-(IRS)-PCR** 86
 - Literatur 88
- 20 PCR-Optimierung** 89
 - 20.1 Hotstart-PCR 89
 - 20.2 Gradienten-PCR 92
 - 20.3 TouchDown-PCR 92
 - 20.4 Einsatz von DMSO und Formamid 93
 - 20.5 Pufferoptimierungen 95
 - 20.5.1 Pufferoptimierung ohne Gradienten-PCR 95
 - 20.5.2 Pufferoptimierung mit Gradienten-PCR 97
 - Literatur 99
- 21 1-Sekunden-PCR** 100
 - Literatur 103
- 22 Long-Distance-PCR** 104
 - Literatur 106
- 23 Genomtypisierung mit der PCR** 107
 - 23.1 RAPD-PCR 107
 - 23.2 HLA-Klasse II-Typisierung 109
 - 23.3 ARMS-PCR 111
 - 23.4 Multiplex-PCR 114
 - Literatur 116

24 Differential-Display-PCR 117

24.1 Festphasen-cDNA-Synthese 119

24.1.1 Kopplung der Oligonucleotide an die Polystyrene-Partikel 119

24.1.2 Isolierung der polyA-RNA 119

24.1.3 cDNA-Synthese 120

24.2 Durchführung der Differential-Display-PCR 121

24.3 Analyse der erhaltenen DD-PCR-Amplifikate 122

24.4 Blotting-Analyse 122

Literatur 124

Abkürzungen 125**Firmenverzeichnis 128****Internet-Adressen rund um die PCR 130****Index 131**