

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	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 ₂ und MgSO ₄	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
2	Allgemeine PCR-Parameter	9
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
2.1	Reaktionsansätze	10
2.2	Thermocycler-Profil	10
2.3	PCR-Kontaminationen	11
2.4	PCR-Kontrollen	11
2.5	Allgemeines Troubleshooting	11
3	PCR als Detektionsmethode	13
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
3.1	Einleitung	14
3.2	Sensitivität	14
3.3	DNA-Polymerasen	14
4	PCR als Klonierungsmethode	17
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
4.1	Lesegenauigkeiten	18
4.2	Proofreading-Polymerasen	18
	Literatur	20
5	PCR für die Standard-Klonierung	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	Ligation	24
5.3.1	Sticky-end-Ligation	25
5.3.2	Blunt-end-Ligation	25
5.4	Transformation von Bakterien	25
5.4.1	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	26
5.4.2	Transformation	26
5.4.3	Analyse rekombinanter Klone	27
	Literatur	28
6	T/A-Cloning	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
7	Ligase-unabhängige-Klonierung (LIC)	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
8	UNG-Klonierung	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
9	Surf-Klonierung	41
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur	43
10	Megaprime-PCR	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

11	RT-PCR	49
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
11.1	„Zwepuffer“ RT-PCR	50
11.2	„Einpuffer“ RT-PCR	51
11.2.1	AMV und <i>Taq/Pwo</i> -DNA-Polymerase-Mix	52
11.2.2	<i>Tth</i> -DNA-Polymerase	52
	Literatur	54
12	RACE-PCR	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
13	Quantitative PCR	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
14	Real-Time-PCR	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
15	Colony PCR	77
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur	79
16	PCR zur Mutationsanalyse	81
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
16.1	Auffinden von Mutationen	82
	Literatur	83
17	Nested PCR	85
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur	87
18	DOP-PCR	89
	<i>Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange</i>	
	Literatur	92

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

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