



Hans-Joachim Müller
Daniel Ruben Prange

PCR – Polymerase- Kettenreaktion

2. Auflage



Springer Spektrum

PCR – Polymerase-Kettenreaktion

Hans-Joachim Müller
Daniel Ruben Prange

PCR – Polymerase- Kettenreaktion

2. Auflage

Hans-Joachim Müller
Neckargemünd, Deutschland

Daniel Ruben Prange
Kiel, Deutschland

ISBN 978-3-662-48235-3 ISBN 978-3-662-48236-0 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-48236-0

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg ist Teil der Fachverlagsgruppe Springer
Science+Business Media
(www.springer.com)

Vorwort zur 2. Auflage „PCR – Das Methodenbuch“

Die erste Publikation über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde vor 30 Jahren (!) von Saiki et al. veröffentlicht.

Heute, im Jahre 2015, gibt es kaum ein molekularbiologisches Experiment oder eine forensische Untersuchung, die nicht auf Verwendung der PCR beruht.

Es wurden im Laufe der letzten 30 Jahre viele verschiedene PCR-Varianten entwickelt und publiziert, aber viele sind dann auch wieder „verschwunden“ und die etablierten Methoden beruhen immer wieder auf dem gleichen Prozedere: Ziel-DNA, Primer, PCR-Mix, Erhitzen, Abkühlen, Erhitzen usw.

In vorliegender 2. Auflage wurden die etablierten Methoden aktualisiert und wichtige neue Applikationen (z. B. Next Generation Sequencing oder die Emulsions-PCR) hinzugefügt.

Da die Automation bei den molekularbiologischen Applikationen fortschreitet, erfordern gerade die letztgenannten Methoden immer weniger Handarbeit, wobei das generelle Verständnis über die einzelnen Schritte vorhanden sein muss.

Dieses „Know-How“ erhalten Sie im vorliegenden PCR-Methodenbuch!

Dr. Hans-Joachim Müller

Studierte Molekularbiologie in Kiel und Hamburg, promovierte am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin und arbeitete als PostDoc im DKFZ in Heidelberg. Autor verschiedener molekularbiologischer Bücher und Schulungsleiter für diverse molekularbiologische Seminare.

Daniel Ruben Prange

Studiert Zell- und Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Danksagung

Dieses Handbuch richtet sich an Technische Assistenten, Studenten, Doktoranden und wissenschaftliche Mitarbeiter, die mehr über die methodische Durchführung verschiedener PCR-Varianten erfahren wollen. Genau dieser Zielgruppe möchten wir auch unsere Danksagung widmen! Denn allein durch die tägliche Arbeit in so vielen verschiedenen Laboratorien auf der Welt, werden neue Ideen entwickelt und innovative Ansätze für die Lösung unterschiedlichster Fragestellungen durch die Frauen und Männer an der Laborbank gefunden. Auch wenn viele moderne Methoden technisch und digital sehr anspruchsvoll sind, entspringt der Grundgedanke zur Lösung eines bestimmten Problems meistens den Mitarbeitern, die im Laboralltag mit eben diesen Problemen konfrontiert sind.

Aufgrund der zahlreich investierten Arbeitsstunden und des innovativen „Brain Powers“ wird die komplexe Welt der Molekularbiologie stetig durch neue Methoden bereichert. Dadurch wird erst ermöglicht, dass eine effiziente, kostengünstige und einfachere Forschung erhalten werden kann und die Kenntnis über verschiedenste Bereiche der Molekularbiologie vorangetrieben wird.

Wir hoffen mit diesem Buch dazu beizutragen, dass möglichst vielen Lesern der Einstieg in die Möglichkeiten der unterschiedlichen PCR-Methoden erfolgreich gelingt, um auch in Zukunft neuen Ideen und Innovationen Nahrung zu geben!

Firmenverzeichnis

Im nachfolgenden sind die Kontaktadressen verschiedener Anbieter molekularbiologischer Produkte aufgeführt (Stand Juli 2015). Für die Vollständigkeit und Richtigkeit der angegebenen Adressen wird keine Gewähr übernommen.

Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Hewlett-Packard-Str. 8, D-76337 Waldbronn, Tel. 0800-603 1000, Fax +49 69 953 07 919, E-Mail: Customer-Care_Germany@agilent.com, Internet: ► <http://www.agilent.com/home>

AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, Tel. +49 6151 9357-0, Fax +49 6151 9357-11, Mail: ► service@de.applichem.com, Internet: ► <http://www.applichem.de>

BD Clontech, Tullastrasse 8–12, 69126 Heidelberg, Tel. +49 (0) 6221 305-0, Fax +49 (0) 6221 305-216, E-Mail: customerservice.bdb.de@europe.bd.com; Internet: ► <http://www.bd.com/de>

Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, 80939 München, Tel. +49-(0)89-31884-0, Fax +49-(0)89-31884-100, E-Mail: ► info@bio-rad.de, Internet: ► <http://www.bio-rad.com>

Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Tel. +49 40 53 801-0, Fax +49 40 53 801-556, E-Mail: eppendorf@eppendorf.com, Internet: ► <http://www.eppendorf.com>

Illumina, 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, USA, Tel. +1-858-202-4500, Fax +1-858-202-4766, Internet: ► <http://www.illumina.com/>

Life Technologies (Invitrogen), Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt, Tel. 0800 083 09 02, Fax 0800 083 34 35, E-Mail: orders_germany@life-

tech.com, Internet: <http://www.lifetechnologies.com>

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Valencienner Str. 11, 52355 Düren, Tel. +49-(0)2421-969-0, Fax +49-(0)2421-969-199, E-Mail: sales@mn-net.com, Internet: ► <http://www.mn-net.com>

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Tel.+49 6151 72-0, +49 6151 72 2000, E-Mail: service@merckgroup.com, Internet: ► <http://www.merck.de>

Promega GmbH, Schildkrötstraße 15, D-68199 Mannheim, Tel. +49 621 8501-0, Fax +49 621 8501-222, E-Mail: de_custserv@de.promega.com, Internet: ► <http://www.promega.com/de>

Qiagen GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, Tel. 02103-29-0, Fax. 02103-29-22000, E-Mail: orders-de@qiagen.com, Internet: ► <http://www.qiagen.com>

Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim, Tel. 0621 759 47 47, Fax 0621 759 40 02, Internet: ► <https://www.roche.de/diagnostics>

Sigma-Aldrich-Aldrich Biochemie GmbH, Georg-Heyken-Straße 14, 21147 Hamburg, Tel. 040 / 79 702-250, Fax 040 / 79 702-200, Internet: ► <https://www.sigmaaldrich.com/germany>

Abkürzungen

µg	Mikrogramm	FRET	Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer
µl	Mikroliter	G	Glycin
6-ROX	6-Carboxy-Rhodamine X	g	Gramm
6-TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rodamine	G	Guanidin
A	Adenosin	GAPDH	Glutathion-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
A	Alanin	ggf.	gegebenenfalls
Abb.	Abbildung	GSP	Genspezifischer Primer
Amp	Ampicillin	GSS	Genspezifische Sequenz
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>	h	Stunde
AP-PCR	Arbitrarily-Primed-PCR	HEG	Hexethylen-Glycol
ARMS-PCR	Amplification-Refractory-Mutation-System-PCR	HEX	Hexachlorofluorescein
ASP-PCR	Allelspezifische-PCR	HLA	Human-Leucocyte-Antigen
bp	Basenpaar	I	Isoleucin
BSA	Bovine-Serum-Albumin (Rinderserumalbumin)	i. d. R.	in der Regel
bzw.	beziehungsweise	IPTG	Iso-Propyl-Thio-β-Galactosid
C	Cytosin	IRS	Interspersed-Repetitive-Sequence
cDNA	complementary oder copy DNA	K	Lysin
CIP	Calf-Intestine-Phosphatase (Kälberdarm-Phosphatase)	Kap.	Kapitel
Cy3	Cyanine 3	kb	Kilobasenpaar
Cy5	Cyanine 5	L	Leucin
Cy5.5	Cyanine 5.5	LB	Luria Broth
D	Asparat	LD-PCR	Long-Distance-PCR
DABCYL	4-(4'-Dimethylaminophenylazo)-Benzoic-Acid	LIC	Ligase-Independent-Cloning
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat	M	Methionin
dCTP	Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat	M	Molar
DD-PCR	Differential-Display-PCR	MgCl₂	Magnesiumchlorid
DEPC	Di-Ethyl Pyrocarbonat	min	Minute(n)
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat	ml	Milliliter
DMSO	Di-Methyl-Sulfoxid	MMLV	<i>Murine-Moloney-Leukemia-Virus</i>
DNA	Desoxy-Ribo Nucleic Acid (Desoxy-ribonucleinsäure)	mRNA	Messenger RNA
dNTP	Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat	ng	Nanogramm
DOP	Degenerate-Oligonucleotid-Primer	OD	Optische Dichte
dsDNA	doppelsträngige DNA	P	Prolin
DTT	Dithiothreitol	PASA	PCR-Amplifikation-spezifischer-Allele
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat	PCR	Polymerase-Chain-Reaction
dUMP	Desoxy-Uracil-5'-Monophosphat	Pfu	<i>Puricoccus furiosus</i>
dUTP	Desoxy-Uracil-5'-Triphosphat	pg	Picogramm
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat	Pol	Polymerase
FA	Formamid	Pwo	<i>Puricoccus woseii</i>
FAM	Fluorescein-Addition-Monomer, Carboxy-Fluorescein	Q	Glutamat
fg	Femtogramm	QPCR	Quantitative-PCR

Abkürzungen

RACE-PCR	Rapid-Amplification-of-Complementary-Ends-PCR
RAPD-PCR	Random-Amplified-Polymorphic-DNA-PCR
RNA	Ribo-Nucleic-Acid (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse-Transkription
RTase	Reverse-Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
S	Serin
SDS	Natrium-(Sodium)-Dodecyl-Sulfat
Sek	Sekunde
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
ssDNA	Einzelstrang-(single strand)-DNA
t	Zeit
T	Temperatur
T	Threonin
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TET	Tetrachloro-6-Carboxy-Fluorescein
Tfl	<i>Thermus flavis</i>
Tli	<i>Thermococcus litoralis</i>
Tma	<i>Thermotoga maritima</i>
Tm-Wert	mittlerer Schmelzwert
Tne	<i>Thermatoga neopolitana</i>
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
u	Einheiten
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
UNG	Uracil-DNA-N-Glycosylase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
x	multipliziert mit
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-4indolyl- β -D-galactopyranosid
xx	einzusetzendes Volumen
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel

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-Profile	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	„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
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

Einleitung

Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange

- 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