

Inhalt

1 Was ist denn “Molekularbiologie”, bitteschön?	1
1.1 Das Substrat der Molekularbiologie, oder: Molli-World für Anfänger	2
1.2 Was brauche ich zum Arbeiten?	7
1.3 Sicherheit im Labor	9
2 Einige grundlegende Methoden	12
2.1 Nucleinsäure ist gleich Nucleinsäure und auch wieder nicht	12
2.2 Methoden zur DNA-Präparation	14
2.2.1 Bakterienmedien	14
2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA	16
2.2.3 Minipräparation	16
2.2.4 Maxipräparation	18
2.2.5 Präparation von Phagen-DNA	20
2.2.6 Präparation einzelsträngiger DNA mittels Helferphagen	25
2.2.7 Präparation von genomischer DNA	25
2.3 Die Reinigung von Nucleinsäuren	27
2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	27
2.3.2 Anionenaustauschersäulen	29
2.3.3 Glasmilch / Silica-Membranen	31
2.3.4 Cäsiumchlorid-Dichtegradient	32
2.3.5 Fällung mit PEG	33
2.3.6 Dialyse	34
2.3.7 Magnetic Beads	35
2.3.8 Proteinbindende Filtermembranen	35
2.3.9 Alkohol-Fällung	36
2.3.10 Konzentratoren	36
2.3.11 Exonuclease-Phosphatase-Verdau	36
2.4 Konzentrieren von Nucleinsäuren	37
2.4.1 Alkohol-Fällung	37
2.4.2 Konzentratoren	40
2.4.3 Speed-vac	41
2.4.4 “Aussalzen”	42
2.5 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen	42
3 Das Werkzeug	47
3.1 Restriktionsenzyme	47
3.2 Gele	58
3.2.1 Agarosegele	58

3.2.2	DNA-Fragmente aus Agarosegelen isolieren	66
3.2.3	Polyacrylamidgele (PA-Gele)	70
3.2.4	DNA-Fragmente aus PA-Gelen isolieren	73
3.2.5	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	73
3.2.6	Kapillarelektrophorese	74
3.2.7	Mikrochip-Kapillarelektrophorese	75
3.3	Blotten	75
3.3.1	Southern Blot	76
3.3.2	Northern Blot	79
3.3.3	Dot und Slot Blot	81
4	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	84
4.1	Die Standard-PCR	84
4.2	Neue Entwicklungen	96
4.3	Tipps zur Verbesserung der PCR	96
4.3.1	Nested PCR	99
4.3.2	Multiplex PCR	100
4.3.3	Amplifikation langer DNA-Fragmente (> 5kb)	100
4.4	PCR-Anwendungen	101
4.4.1	Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	101
4.4.2	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	102
4.4.3	Amplifikation zufälliger Produkte	104
4.4.4	Klassische quantitative PCR	106
4.4.5	Real-time quantitative PCR	109
4.4.6	Inverse PCR	115
4.4.7	Biotin-RAGE und Supported PCR	116
4.4.8	Mutagenese mit modifizierten Primern	116
4.4.9	Amplification Refractory Mutation System (ARMS)	117
4.4.10	in-situ-PCR	118
4.4.11	Cycle Sequencing	119
4.4.12	cDNA-Synthese	119
4.4.13	Einzelzell-PCR	119
5	RNA	121
5.1	Methoden der RNA-Isolierung	122
5.2	Methoden der mRNA-Isolierung	125
5.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	126
5.4	In-vitro-Transkription (RNA-Synthese)	127
5.5	Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)	129
5.6	RNA-Interferenz (RNAi)	134

6 Die Klonierung von DNA-Fragmenten	139
6.1 Die Grundlagen des Klonierens	139
6.1.1 Klonieren von PCR-Produkten	146
6.1.2 Klonieren mit Rekombinase-Systemen	149
6.2 Mit welchen Vektoren klonieren?	152
6.2.1 Plasmide	152
6.2.2 Phagen	155
6.2.3 Cosmide	157
6.2.4 PACs und BACs	158
6.2.5 YACs	158
6.3 Welche Bakterien?	160
6.4 Herstellen kompetenter Zellen und Transformation	160
6.5 Probleme beim Klonieren	165
6.6 Die Lagerung von Klonen	166
7 Wie man DNA aufspürt	169
7.1 Herstellung von Sonden	169
7.1.1 Methoden zur Herstellung markierter Sonden	171
7.2 Hybridisierung	175
7.3 Nachweis der markierten DNA	177
7.3.1 Autoradiographie	177
7.3.2 Nicht-radioaktive Nachweismethoden	179
7.4 Screenen von rekombinanten DNA-Banken	182
7.5 Two-hybrid system	186
7.6 Phage display	190
8 DNA-Analyse	192
8.1 Sequenzierung	192
8.1.1 Radioaktive Sequenzierung	194
8.1.2 Nicht-radioaktive Sequenzierung, automatische Sequenziergeräte	197
8.1.3 Schrotschuss-Sequenzierung	199
8.1.4 Kurioses zum Thema Sequenzieren: Octamere	199
8.1.5 Minisequenzierung	200
8.1.6 Pyrosequenzierung zum Ersten	202
8.1.7 Pyrosequenzierung zum Zweiten	203
8.1.8 Weitere Methoden der Massen-Parallelsequenzierung	205
8.1.9 Die Zukunft der Sequenzierung	210
8.2 Methoden zur Analyse von DNA auf Mutationen	212
8.2.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	212
8.2.2 Single-strand conformation polymorphism (SSCP)	213

8.2.3	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	215
8.2.4	Temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE)	217
8.2.5	Heteroduplexanalyse (HA)	218
8.2.6	Amplification refractory mutation system (ARMS)	218
8.2.7	Enzymatische Spaltung von Fehlpaarungen (EMC)	218
8.2.8	Protein truncation test (PTT)	220
9	Untersuchung der Funktion von DNA-Sequenzen	222
9.1	Untersuchung der Transkription in Geweben	223
9.1.1	Ribonuclease protection assay (RPA)	223
9.1.2	Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)	224
9.1.3	in-situ-Hybridisierung	224
9.1.4	Chromosomale Lokalisierung eines Gens (FISH)	227
9.1.5	in-situ-PCR	229
9.1.6	Microarrays	229
9.1.7	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	235
9.2	Mutagenese	237
9.3	in-vitro-Translation	247
9.4	Expressionssysteme	249
9.4.1	Bakterielle Expressionssysteme	249
9.4.2	Baculovirus-Expressionssysteme	250
9.4.3	Weitere Expressionssysteme	252
9.4.4	Heterologe Expression in Säugerzellen	253
9.4.5	Transfektionsmethoden	255
9.4.6	Kotransfektion mehrerer Gene	263
9.4.7	Transiente und stabile Transfektionen	264
9.4.8	Reportergene	265
9.5	Transgene Mäuse	273
9.5.1	Methoden des Gentransfers	274
9.6	Regulation der Transgenexpression	279
9.6.1	Das Tet-System	279
9.6.2	Das Ecdyson-System	281
9.7	Gentherapie	281
9.8	Genomik	283
10	Tipps für die Karriereplanung, oder: Der ganz kleine Macchiavelli für Jungforscher	287
11	Zu guter Letzt	296

12 Anhang	298
12.1 Nützliche Tabellen	298
12.2 Standardlösungen	299
12.3 Glossar	301
13 Wer, was, wo?	305
13.1 Lieferanten / Adressen	305
13.2 Literatur	309
Register	311