

Inhaltsverzeichnis

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	8
2 Einige grundlegenden Methoden	11
2.1 Nucleinsäure ist gleich Nucleinsäure und auch wieder nicht	11
2.2 Vom Fällern und Konzentrieren von Nucleinsäuren	13
2.2.1 Alkohol-Fällung	13
2.2.2 Konzentratoren	16
2.2.3 Speed-vac	17
2.2.4 „Aussalzen“	17
2.3 Die Reinigung von Nucleinsäuren	17
2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	18
2.3.2 Fällung mit PEG	19
2.3.3 Anionenaustauschersäulen	19
2.3.4 Glasmilch	21
2.3.5 Cäsiumchlorid-Dichtegradient	21
2.3.6 Dialyse	22
2.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen	23
2.5 Methoden zur DNA-Präparation	26
2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	26
2.5.2 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab	28
2.5.3 Bakterienmedien	31
2.5.4 Präparation von Phagen-DNA	32
2.5.5 Präparation einzelsträngiger DNA mittels Helferphagen	36
2.5.6 Präparation von genomischer DNA	36
3 Das Werkzeug	38
3.1 Restriktionsenzyme	38
3.2 Gele	46
3.2.1 Agarosegele	46
3.2.2 DNA-Fragmente aus Agarosegelen isolieren	51
3.2.3 Polyacrylamidgele	54
3.2.4 DNA-Fragmente aus PA-Gelen isolieren	57
3.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	57
3.2.6 Kapillarelektrophorese	58

3.3 Blotten	59
3.3.1 Southern Blot	59
3.3.2 Northern Blot	62
3.3.3 Dot und Slot Blot	64
4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	65
4.1 Die Standard-PCR	65
4.2 Tips zur Verbesserung der PCR	75
4.2.1 Nested PCR	77
4.2.2 Multiplex PCR	77
4.2.3 Amplifikation langer DNA-Fragmente	78
4.3 PCR-Anwendungen	79
4.3.1 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	79
4.3.2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	79
4.3.3 Amplifikation zufälliger Produkte	81
4.3.4 Quantitative PCR	83
4.3.5 Inverse PCR	86
4.3.6 Biotin-RAGE und Supported PCR	87
4.3.7 Mutagenese mit modifizierten Primern	87
4.3.8 ARMS	88
4.3.9 in-situ-PCR	89
4.3.10 Cycle Sequencing	90
4.3.11 cDNA-Synthese	90
4.3.12 Einzelzell-PCR	90
5 RNA	92
5.1 Methoden der RNA-Isolierung	93
5.2 Methoden der mRNA-Isolierung	95
5.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	96
5.4 In-vitro-Transkription (in-vitro-Synthese von RNA)	98
6 Die Klonierung von DNA-Fragmenten	100
6.1 Mit welchen Vektoren klonieren?	108
6.1.1 Plasmide	108
6.1.2 Phagen	110
6.1.3 Cosmide	112
6.1.4 PACs und BACs	113
6.1.5 YACs	114
6.2 Welche Bakterien?	115
6.3 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	115
6.4 Probleme beim Klon?	120
6.5 Die Lagerung von Klonen	121

7	Wie man DNA aufspürt	123
7.1	Herstellung von Sonden	123
7.1.1	Methoden zur Herstellung markierter Sonden	125
7.2	Hybridisierung	129
7.3	Nachweis der markierten DNA	131
7.3.1	Autoradiographie	131
7.3.2	Nicht-radioaktive Nachweismethoden	133
7.4	Screenen von rekombinanten DNA-Banken	136
8	DNA-Analyse	140
8.1	Sequenzierung	140
8.1.1	Radioaktive Sequenzierung	142
8.1.2	Nicht-radioaktive Sequenzierung und automatische Sequenziergeräte	144
8.2	Methoden zur Analyse von DNA auf Mutationen	146
8.2.1	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	146
8.2.2	Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	147
8.2.3	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	149
8.2.4	Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE)	151
8.2.5	Heteroduplexanalyse (HA)	152
8.2.6	ARMS	152
8.2.7	Enzymatische Spaltung von Fehlpaarungen (EMC)	152
8.2.8	Protein Truncation Test (PTT)	154
9	Untersuchung der Funktion von DNA-Sequenzen	156
9.1	Untersuchung der Transkription in Geweben	157
9.2	Mutagenese	162
9.3	in-vitro-Translation	170
9.4	Expressionssysteme: Bakterien, Baculovirus, Säugerzellen und andere	171
9.4.1	Bakterielle Expressionssysteme	171
9.4.2	Baculovirus-Expressionssysteme	172
9.4.3	Heterologe Expression in Säugerzellen	174
9.4.4	Weitere Expressionssysteme	175
9.4.5	Transfektionsmethoden	176
9.4.6	Kotransfektion mehrerer Gene	184
9.4.7	Transiente und stabile Transfektionen	184
9.4.8	Reportergene	186
9.5	Transgene Mäuse	191
9.5.1	Methoden des Gentransfers	192
9.6	Regulation der Transgenexpression	198
9.6.1	Das Tet-System	198
9.6.2	Das Ecdyson-System	199
9.7	Gentherapie	200

10	Der Computer und Du	202
11	Zu guter Letzt	207
12	Anhang	209
12.1	Standardlösungen	209
12.2	Glossar	211
13	Wer, was, wo?	215
13.1	Lieferanten / Adressen	215
13.2	Literatur	218
14	Register	220