

Inhalt

Vorwort	V	1.11.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	21
Autorenverzeichnis	VII	1.11.2	Antibiotika	21
Abkürzungsverzeichnis	IX	1.11.2.1	Genetische Marker	22
		1.11.2.2	Restriktions-Modifikationssysteme von <i>E. coli</i>	22
1 Allgemeine Methoden	1	1.11.2.3	Der Gebrauch des genetischen Codes	23
		1.11.2.4	Keimzahlbestimmungen	24
		1.12 Proteinisolierung		24
1.1 Absorptionsmessungen	1	1.12.1	Chromatographische Verfahren	25
1.1.1 Absorptionsmessung im UV-Bereich	2	1.12.1.1	Ionenaustauschchromatographie	27
1.1.2 Absorptionsmessung im sichtbaren Bereich ..	3	1.12.1.2	Gelpermeationschromatographie	30
1.1.3 Trübungsmessung	3	1.12.1.3	Hydrophobe Chromatographie	32
1.1.4 Fluoreszenzmessung	4	1.12.1.4	Affinitätschromatographie	33
1.2 Radioaktivitätsmessung	4	1.12.2	Fällung	35
1.3 Autoradiographie und Fluorographie	5			
1.4 Zentrifugationstechniken	6	2 Gelelektrophoresen		37
1.5 Steriles Arbeiten	7		(<i>Ute Dechert</i>)	
1.5.1 Sterilisation	8	2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ...		37
1.5.2 Steriles Arbeiten	8	2.1.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ...		40
1.5.3 Silikonisieren von Glasgeräten	9	2.1.2 Gelelektrophorese in Tris-Tricin- Puffersystemen		44
1.6 Phenolextraktion	9	2.1.3 Kontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ...		46
1.7 Fällungsmethoden	10	2.1.4 Gradienten-Gelelektrophorese		47
1.7.1 Präzipitation von Nucleinsäuren	11	2.1.5 Diskontinuierliche Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen		49
1.8 Säulenchromatographische Trennverfahren für kleine Mengen Nucleinsäuren	12	2.1.6 Isoelektrische Fokussierung (IEF)		51
1.8.1 Ionenaustauschchromatographie an DEAE (Diethylaminoethyl)-Cellulose	12	2.1.7 Zweidimensionale Polyacrylamid- Gelelektrophorese		55
1.8.2 Gelpermeationschromatographie an Sephadex G-50 oder G-100	13	2.1.8 Automatisierte Elektrophorese		59
1.9 Markierung von Nucleinsäuren	14	2.2 Nachweismethoden für Proteine		59
1.9.1 Endmarkierung von DNA	14	2.2.1 Coomassie Blau-Färbung		60
1.9.1.1 5'-Phosphorylierungen von DNA	14	2.2.2 Silberfärbung		62
1.9.1.2 3'-Endmarkierung von DNA	15	2.2.2.1 Merril-Verfahren		63
1.9.2 Radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation	16	2.2.2.2 Ansorge-Verfahren		63
1.9.3 Markierung von DNA-Fragmenten durch random priming	18	2.2.3 Fluoreszenzfärbung		65
1.10 Dephosphorylierung von DNA	19	2.2.4 Fluoreszenzmarkierung		66
1.11 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	19	2.2.5 Detektion von Proteinen in Gelen durch SDS-Präzipitation		67
		2.3 Gelelektrophorese von Nucleinsäuren		68
		2.3.1 Agarose-Gelsysteme		69
		2.3.1.1 Puls-Feld-Gelelektrophorese		70
		2.3.1.2 Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA ..		74
		2.3.1.3 Denaturierende alkalische Agarose- Gelelektrophorese für DNA		76

2.3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese für RNA nach Denaturierung mit Glyoxal und DMSO	78	3.1.3.2	Lyse von Geweben	106
2.3.2	Polyacrylamid-Gelsysteme	80	3.1.3.3	Lyse von Hefe	106
2.3.2.1	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese für DNA	80	3.1.3.4	Lyse von Bakterien	106
2.3.2.2	Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für DNA	82	3.1.3.5	Isolierung genomischer DNA aus Blut, Kulturzellen, Tiergeweben, Hefen und Bakterien	107
2.4	Anfärbung von Nucleinsäuren in Gelen	84	3.2	Isolierung von Plasmid-DNA	107
2.4.1	Anfärbung von Nucleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid	85	3.2.1	Wichtige allgemeine Parameter	107
2.5	Elution von Nucleinsäuren aus Gelen	87	3.2.1.1	Plasmid-Kopienzahl	108
2.5.1	Elution von DNA aus LM-Agarosegelen	88	3.2.1.2	Wirtsstamm	108
2.5.2	Elution von DNA aus LM-Agarosegelen durch GELase*	89	3.2.1.3	Wachstum der Bakterien	108
2.5.3	Elution von DNA aus Agarosegelen durch reversible Bindung an Silica/Glasfaser-Membranen	90	3.2.1.4	Antibiotika	108
2.5.4	Elektroelution von hochmolekularer DNA aus Agarosegelen	91	3.2.2	Minipräparation von Plasmid-DNA	109
2.5.5	Diffusionselektion von DNA aus Polyacrylamidgelen	92		Reinheitsgrad der DNA und Technologien für die Plasmidminipräparation	110
3	Isolierung von DNA	95		Probendurchsatz und Automatisierung	110
	<i>(Carolina Río Bártulos, Hella Tappe, Sophie Rothhämel*)</i>		3.2.2.1	Klassische Minipräparation von Plasmid-DNA	111
	Klassische Verfahren	95	3.2.2.2	Minipräparation von Plasmid-DNA mit Silikatechnologie und Zentrifugation	111
	Silikagel basierende Verfahren	95	3.2.2.3	Minipräparation von Plasmid-DNA im Hochdurchsatz-Format mittels Filtrationstechnologie	114
	Anionenaustauschchromatographie	95	3.2.2.4	Weitere Alternativen im Bereich Minipräparation von Plasmid-DNA	115
	Filtrationsverfahren	96	3.2.2.5	Besonderheiten bei Minipräparationen von Plasmid-DNA	116
	Hinweise zum Arbeiten mit DNA	96	3.2.2.6	Analyse von Plasmid-DNA nach der Minipräparation	116
3.1	Isolierung chromosomaler DNA	96	3.2.3	Großpräparation von Plasmid-DNA	117
	Allgemeine Hinweise	97	3.2.3.1	Anzucht der Bakterien	118
3.1.1	Silikageltechnologie	97	3.2.3.2	Alkalische Lyse	118
	Allgemeine Hinweise	97	3.2.3.3	Weitere Reinigung der Plasmid-DNA	119
3.1.1.1	Vollblut und Körperflüssigkeiten	98	3.2.3.4	Reinigung von Plasmid-DNA über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	119
3.1.1.2	Gewebe	99	3.2.3.5	Entfernung von genomischer DNA-Kontamination	121
3.1.1.3	Lyse weiterer Ausgangsmaterialien	100	3.2.3.6	Analyse der Plasmid-DNA	121
	Lysate jeder Art	104	3.2.4	DNA-Präparation und Analyse von Plasmiden mit großem Insert (PAC, BAC)	122
3.1.2	Probenkonzentrierung	104	3.2.4.1	DNA-Isolierung von <i>E. coli</i> -Zellen mit PAC- oder BAC-Plasmiden	122
3.1.3	Anionenaustausch-Technologie	104	3.2.4.2	Restriktionskartierung und Größenbestimmung klonierter DNA-Fragmente	125
3.1.3.1	Lyse von Blut, <i>buffy coat</i> oder Zellkulturen	105	3.2.4.3	Aufreinigung von PAC- und BAC-Insert-DNA durch präparative Puls-Feld-Gelelektrophorese	126
			3.3	Isolierung von Phagen-DNA	128
			3.3.1	Großpräparation von λ -DNA	128

3.3.1.1	Anzucht der Phagen mittels Plattenlysate ...	129	4.2.3.1	Kompetitive RT-PCR	160
3.3.1.2	Anzucht der Phagen mittels Flüssiglysate (Mini- und Midi-Lysate)	129	4.2.3.2	<i>Real time</i> -PCR und -RT-PCR	161
3.3.1.3	Protokoll zur Isolierung der λ -DNA	130	4.2.3.3	Quantifizierung von Zielnucleinsäuren	162
3.3.2	Präparation von M13-Phagen-DNA	131	4.2.3.4	<i>Real time</i> -PCR und RT-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden ...	163
3.3.2.1	Präparation von M13-Phagen-DNA durch Silikamembran-Technologie und Zentrifugation	131	4.2.3.5	<i>Real time</i> -Multiplex-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden ...	165
3.4	Analyse von Ausbeute, Reinheit und Länge der isolierten Nucleinsäure	132	4.2.3.6	<i>Real time</i> -PCR und -RT-PCR mit DNA- bindenden Fluoreszenzfarbstoffen	167
			4.2.3.7	<i>Real time-one step</i> -RT-PCR	168
			4.2.4	<i>in situ</i> -PCR	170
4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	135	5	Klonierung von cDNA (cDNA-Phagenbank)	173
	(Henning Schmidt, Sophie Rothhämel*)			(Cornel Mülhardt)	
4.1	Grundprinzip und Einsatzgebiete der PCR ...	135	5.1	Klonierung von cDNA mit λ-Vektoren	173
4.1.1	Wesentliche Komponenten der PCR	137	5.1.1	cDNA-Synthese und Vorbereitung zur Ligation	176
	Templates	137	5.1.1.1	cDNA-Erststrangsynthese	176
	Primer	137	5.1.1.2	cDNA-Zweitstrangsynthese	177
	DNA-Polymerasen	138	5.1.1.3	Auffüllreaktion	178
4.1.2	Durchführung der PCR (Basisprotokoll) ..	138	5.1.1.4	Eco RI-Linkerligation und -phosphorylierung	178
4.1.3	PCR-Geräte (Thermocycler) und Nachweissysteme für PCR-Produkte	141	5.1.1.5	Hydrolyse der cDNA	179
4.1.4	Anwendungsgebiete der PCR	142	5.1.1.6	Größenfraktionierung der cDNA	180
4.2	Verschiedene PCR-Techniken	143	5.1.1.7	Ligation der cDNA mit λ -Vektor-DNA ...	182
4.2.1	Amplifikation von DNA	143	5.1.2	Titerbestimmung	182
4.2.1.1	<i>Hot start</i> -PCR	143	5.1.3	Amplifikation	183
4.2.1.2	Multiplex-PCR	144	5.1.4	TCA-Präzipitation	184
4.2.1.3	<i>High fidelity</i> -PCR	145	5.2	Klonierung von cDNA mit λ-gt11	185
4.2.1.4	<i>Long range</i> -PCR	146	5.2.1	<i>in vitro</i> -Verpackung von λ -gt11-DNA ...	188
4.2.1.5	Inverse PCR zur Amplifikation unbekannter Sequenzabschnitte	148	5.2.1.1	Herstellung von Verpackungsextrakt	188
4.2.2	Amplifikation von RNA (RT-PCR)	149	5.2.1.2	<i>in vitro</i> -Verpackung	189
4.2.2.1	Grundprinzip der Reverse Transkriptase- Reaktion	149	5.2.1.3	Lagerung von λ -Phagenbanken und -Lysaten	190
4.2.2.2	Enzymatische Aktivitäten der Reversen Transkriptase	151	5.2.2	Titerbestimmung	190
4.2.2.3	Stabile RNA-Sekundärstrukturen	152	5.2.2.1	Überprüfung der Qualität der cDNA- Phagenbank durch PCR-Screening	192
4.2.2.4	Priming der cDNA-Synthese	153	5.2.3	Amplifikation	192
4.2.2.4.1	Primer-Typen	154	5.2.4	Screening der λ -gt11-cDNA-Bank mit Antikörpern	194
4.2.2.5	Verschiedene Reverse Transkriptasen	155	5.2.4.1	Pseudoscreening: Entfernung der Anti- <i>E. coli</i> - und Anti-Phagen-Immunglobuline aus Antikörperseren	196
4.2.2.6	Methoden der RT-PCR	155	5.2.4.2	Screening mit Antikörpern und Nachscreening	197
4.2.3	Quantitative PCR und RT-PCR	160	5.2.5	Möglichkeiten eines Authentizitäts- nachweises positiver λ -gt11-Klone	200

5.2.5.1	Isolierung des β -Galactosidase-Fusionsproteins durch SDS-Gelelektrophorese	201	6.2.3	Etablierung der Genbank	221
5.2.5.2	Gewinnung von Antikörpern zum Rescreening und für Western-Blots	203	6.3	Herstellung von DNA-Bibliotheken in künstlichen, bakteriellen Chromosomen (BAC)	222
5.2.6	Isolierung und Reinigung des β -Galactosidase-Fusionsproteins	204	6.3.1	BAC-Vektoren	223
5.2.6.1	Etablierung von lysogenen <i>E. coli</i> Y1 089-Zellen	204	6.3.2	Präparation von HMW-DNA und Größenselektion der DNA-Fragmente zur Klonierung in einen BAC-Vektor	224
5.2.6.2	Rohlysatherstellung aus lysogenen <i>E. coli</i> Y1 089-Zellen	206	6.3.2.1	Präparation des BAC-Vektors	225
5.2.6.3	Reinigung von β -Galactosidase-Fusionsproteinen aus dem Rohlysat	206	6.3.2.2	Plasmidaufreinigung	225
5.3	Klonierung von cDNA in Plasmide	208	6.3.2.3	Vorbereitung des Vektors zur Ligation	225
5.3.1	Präparation von Plasmid-DNA mit 3'-überstehendem Thymidin	208	6.3.2.4	Isolierung von Megabasen-DNA aus Pflanzen	226
5.3.2	Ligation von amplifizierter cDNA mit Plasmid-DNA	209	6.3.2.5	Einbetten der Pflanzenzellkerne in Agaroseblöcke	227
5.3.3	Herstellung von transformationskompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	209	6.3.2.6	DNA-Isolierung in der Agarose	227
5.3.4	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	211	6.3.2.7	Partieller DNA-Verdau, grobes Einstellen des Selektionsfensters	228
6	Klonierung von genomischer DNA (genomische Genbank)	213	6.3.2.8	Partieller DNA-Verdau, Feineinstellung des Selektionsfensters	228
	(Cornel Mülhardt*)		6.3.2.9	Vorbereitung partiell verdauter DNA zur Ligation	228
6.1	Klonierung mit dem Bakteriophagen λ-EMBL3	213	6.3.2.10	Ligation	229
6.1.1	Partialhydrolyse der chromosomalen DNA	214	6.3.2.11	Transformation	230
6.1.2	Größenfraktionierung von DNA durch Saccharose Dichtegradientenzentrifugation	215	7	Isolierung und Markierung von RNA	233
6.1.3	Vektorhydrolyse und Ligationsreaktion	216		(Martin Schröder)	
6.1.4	<i>in vitro</i> -Verpackung der Ligationsprodukte	217	7.1	Arbeiten mit RNA	234
6.1.5	Titerbestimmung und Ausplattieren der Phagenbank	217	7.1.1	Arbeitsbedingungen	234
6.2	Klonierung mit Cosmiden	218	7.1.2	Vorbereiten von Geräten	234
6.2.1	Vektorhydrolyse, Phosphatasebehandlung und Ligationsreaktion	220	7.1.3	RNase-Inhibitoren	235
6.2.2	<i>in vitro</i> -Verpackung der Ligationsprodukte	221	7.1.3.1	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	235
			7.1.3.2	Vanadylribonucleosid-Komplexe	236
			7.1.3.3	RNasin/RNAGuard	236
			7.1.4	Ansetzen von Lösungen	237
			7.1.5	Probenmaterial	237
			7.1.5.1	RNAlater*	237
			7.1.6	Fällung von RNA	238
			7.2	Methoden zur Isolierung von RNA	238
			7.2.1	Isolierung von RNA aus Prokaryoten	239
			7.2.1.1	Grampositive Prokaryoten	239
			7.2.1.2	Gramnegative Prokaryoten	240
			7.2.2	Isolierung von RNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	241
			7.2.3	Isolierung von RNA aus Pflanzenzellen	241
			7.2.4	Isolierung von RNA aus tierischen Zellen	243
			7.2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	243

7.2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben	244	8.6	miRNA	271
7.2.4.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus glycoprotein- und oligosaccharidreichen Geweben	245	8.6.1	Prozessierung von miRNAs	271
7.2.4.4	Isolierung cytoplasmatischer und nucleärer RNA	246	8.6.2	Isolierung von miRNAs aus einer Probe	273
7.3	Reinigung und Fraktionierung von RNA	248	8.6.2.1	Anreicherung von miRNAs	274
7.3.1	Hydrolyse von DNA mit DNase I	249	8.6.2.2	Detektion der miRNAs, Quantifizierung und Analyse	274
7.3.2	Isolierung von poly(A) ⁺ -mRNA durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose	250	9	Gewebepräparation	275
7.3.3	Isolierung von poly(A) ⁺ -mRNA mit Oligo(dT)-Cellulose ohne Säulen-chromatographie	251		<i>(Tanja Arndt, Sophie Rothhämel)</i>	
7.4	Synthese und Markierung von RNA durch <i>in vitro</i>-Transkription	252	9.1	Konservierungsmethoden für Gewebe	275
7.4.1	<i>in vitro</i> -Transkription markierter RNA	255	9.2	Fixieren, Einbetten und Schneiden von Gewebe in Paraffinwachs	276
7.4.1.1	<i>in vitro</i> -Transkription radioaktiv markierter RNA	255	9.3.1	Kryogeleinbetten von Gewebe	277
7.4.1.2	<i>in vitro</i> -Transkription Digoxigenin markierter RNA	256	9.3.2	Schneiden der in Kryogel eingebetteten Gewebe am Kryostat	278
7.4.2	<i>in vitro</i> -Transkription unmarkierter RNA	257	10	Detektion von Protein und Nucleinsäure auf Membran	279
7.5	Qualitätskontrolle und Lagerung der RNA-Präparation	258	10.1	Western Blotting	279
7.5.1	Qualitätskontrolle einer RNA-Präparation	258		<i>(Steffen Bade, Niels Röckendorf, Andreas Frey, Arnd Petersen)</i>	
7.5.2	Lagerung von RNA	260	10.1.1	Vorbereiten der Proben	279
8	RNA-interference	261	10.1.2	Gelelektrophoretische Trennung des Proteingemisches	281
	<i>(Tobias Bopp, Matthias Klein)</i>		10.1.3	Gel-Blot: Elektrophoretischer Transfer in Wet- und Semi-Dry-Verfahren	282
8.1	Design von siRNA	262	10.1.4	Dot-Blot	289
8.1.1	siRNA-Design	262	10.1.5	Färbung der transferierten Proteine	290
8.2	Methoden zur Herstellung von siRNA	263	10.1.6	Nachweisreaktion: Bindung der Erst- und Zweitantikörper	291
8.2.1	PCR-Expressionskassetten	264	10.1.7	Visualisierung: Fluoreszenz, Farb- oder Chemilumineszenz-Reaktion	298
8.2.2	siRNA-Expressionsvektoren	265	10.1.8	Trouble Shooting	304
8.2.3	Abbau langer dsRNA durch Enzyme der RNase III-Familie	265	10.2	Nucleinsäure Blotting (Southern/Northern)	309
8.2.4	<i>in vitro</i> -Transkription	266		<i>(Sophie Rothhämel*)</i>	
8.2.5	Chemische Synthese von siRNA	267	10.2.1	Transfertechniken (Blotting)	310
8.3	Transfektionsmethoden für siRNA	268	10.2.1.1	Dot-Blot	310
8.3.1	Lipid/aminbasierte Transfektionsmethoden	268	10.2.1.2	Southern-Blot	311
8.3.2	Elektroporation	268	10.2.1.3	Northern-Blot	312
8.4	Analyse des knock downs	268	10.2.1.4	Kolonietransfer	313
8.4.1	Nachweis auf mRNA-Ebene	269	10.2.1.5	Plaque-Transfer	315
8.4.2	Nachweis auf Proteinebene	269			
8.4.3	Trouble Shooting	269			
8.5	Ratschläge für ein erfolgreiches siRNA-Experiment	269			

10.2.2	Hybridisierungen	316	11.4.1	Auswahl der verwendeten Antikörper	340
10.2.2.1	Richtlinien zur Berechnung der Schmelztemperatur bei der Hybridisierung	317	11.4.2	Vorbereitung von Paraffinschnitten für die Immunhistochemie	340
10.2.2.2	Richtlinien zur Hybridisierung und Markierung von Nucleinsäuren	318	11.4.3	Vorbereitung von in Kryogel eingebetteten gefrorenen Schnitten für die Immunhistochemie	342
10.2.2.3	Hybridisierung von Genbanken sowie Southern-Blots	319	11.4.4	Blockieren unspezifischer Antikörper/Antigen-Wechselwirkungen und Antikörperinkubation	342
10.2.2.4	Hybridisierung von Genbanken sowie Southern-Blots mit Oligonucleotidproben ..	322	11.4.5	Generierung des ABC-Komplexes und enzymatische Umsetzung des Farbsubstrates	343
10.2.2.5	Hybridisierung von Northern-Blots	323	11.5.1	Nuclear-fast-Red-Gegenfärbung für NBT/BCIP gefärbte ISH	345
10.2.3	Wiederverwendung der Filter (Sondentfernung)	324	11.5.2	Hematoxylin- und Eosin-Gegenfärbung der DAB-gefärbten Schnitte	345
10.2.4	Selektion und Vereinzelung positiver Klone	325	11.5.3	Entwässern und Eindecken der gefärbten Schnitte	346
10.2.4.1	Vorgehen bei Koloniehybridisierungen ..	325	11.5.4	Durchführung von Doppel-ISH	347
10.2.4.2	Vorgehen bei der Plaque-Hybridisierung ..	326	11.5.5	Durchführung von Doppel-IHCs	347
			11.5.6	Kombination von <i>in situ</i> -Hybridisierung und Immunhistochemie	347
			11.5.7	Automatisierung der <i>in situ</i> -Hybridisierung und der Immunhistochemie	347
11	Detektion von mRNA und Protein <i>in situ</i>	327	11.6	Trouble Shooting	348
	(Tanja Arndt, Sophie Rothhämel*)		11.6.1	Trouble Shooting der ISH	348
11.1.1	<i>in situ</i> -Hybridisierung	327	11.6.2	Trouble Shooting der IHC	349
11.1.2	Immunhistochemie	328			
11.1.3	Auswahl der verwendeten Gewebetypen ..	328	12	Transfektion von Säugerzellen ..	351
11.2.1	Auswahl der RNA-Sonden	328		(Michael Teifel)	
11.2.2	<i>in vitro</i> -Transkription der RNA-Sonden ..	328	12.1	Einführung	351
11.2.3	Vorbereitung von Paraffinschnitten für die Hybridisierung mit einer DIG-markierten RNA-Sonde	330	12.1.1	Chemische Transfektionsmethoden	351
11.2.4	Vorbereitung von gefrorenen und mit Kryogel eingebetteten Schnitten für die Hybridisierung mit einer DIG-markierten RNA-Sonde	332	12.1.2	Physikalische Transfektionsmethoden	353
11.2.5	Hybridisierung von Gewebeschnitten mit DIG-markierten Sonden	333	12.1.3	Biologische Transfektionsmethoden	356
11.2.6	Detektion der DIG-markierten Sonde mittels Antikörper und Farbreaktion	334	12.1.4	Methoden zur Steigerung von Genexpression und Transfektionseffizienz	360
11.3.1	Alternativprotokoll: Radioaktive Markierung der RNA-Sonde	336	12.1.5	Stabile Expression und Genamplifikation ..	361
11.3.2	Waschen der Objektträger	337	12.2	Zellkulturmethoden	362
11.3.3	Dippen der Objektträger	338	12.2.1	Beschichtung von Kulturgefäßen	362
11.3.4	Entwicklung der Objektträger	339	12.2.2	Kultivierung von Säugerzellen am Beispiel der Fibroblastenzelllinie BHK 21	362
			12.2.3	Subkultivierung von BHK 21	363
			12.2.4	Zellzählung durch den Trypanblau-Ausschlusstest	363
			12.2.5	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen...	364
			12.2.6	Herstellung von Zellextrakten durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen	364

12.2.7	MTT-Test	365	13.3	Transformation von <i>Aspergillus oryzae</i>-Protoplasten durch Behandlung mit Polyethylenglykol	391
12.2.8	Bestimmung der Geneticintoleranzdosis ..	366	13.3.1	Herstellung von <i>Aspergillus niger</i> -, <i>A. foetidus</i> - und <i>A. oryzae</i> -Protoplasten	391
12.3	Transfektionsmethoden	366	13.3.2	Transformation von <i>Aspergillus oryzae</i> -Protoplasten	393
12.3.1	Versuchsplanung	366	13.4	Biologische Transformation von <i>Trichoderma reesei</i>	394
12.3.2	Calciumphosphat-Transfektion	367	13.5	Transformation von <i>Aspergillus foetidus</i> durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	397
12.3.3	DEAE-Dextran-Transfektion	368	13.5.1	Herstellung von elektrokompetenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen	397
12.3.4	Transfektion mit aktivierten Dendrimeren ..	369	13.5.2	Transformation von elektrokompetenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen	398
12.3.5	Lipofektion	370	13.5.3	Transformation von <i>Aspergillus foetidus</i> durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	399
12.3.5.1	Herstellung der Liposomen	370	13.6	Transformation von <i>Neurospora crassa</i>-Sporen durch Elektroporation	400
12.3.5.2	Lipofektion mit DDAB- oder DOTAP-Liposomen	372	13.7	Präparation von genomischer DNA aus <i>Aspergillus niger</i>	403
12.3.5.3	Lipofektion mit kommerziell erhältlichen Lipofektionsreagenzien	372	14	Genexpression in <i>E. coli</i> und Insektenzellen: Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine	407
12.3.6	Elektroporation	373		(<i>Achim Aigner</i>)	
12.3.7	Transfektion mit komplexen Transfektionsreagenzien	373	14.1	Vorüberlegungen zur Auswahl von Wirtszelle und Expressionsvektor	407
12.3.8	Transfektion bestimmter Zelltypen mit speziell optimierten Transfektionsreagenzien	374	14.2	Expression eines eukaryotischen GST-Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	410
12.4	Nachweis der Expression und Bestimmung der Transfektionseffizienz	374	14.2.1	Konstruktion des Expressionsvektors	411
12.4.1	Nachweis von β -Galactosidase mittels X-Gal-Färbung	374	14.2.2	Expression des GST-Fusionsproteins	412
12.4.2	Nachweis von β -Galactosidase in Zellextrakten	375	14.2.3	Reinigung des GST-Fusionsproteins	413
12.4.3	Messung von Luciferaseaktivität in Zellysaten	376	14.2.4	Spaltung eines GST-Fusionsproteins	415
12.4.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz ..	376	14.3	Baculovirussystem: Expression eines eukaryotischen Proteins in Insektenzellen	416
12.4.5	Selektion auf stabile Expression und Isolierung resistenter Klone	377	14.3.1	Konstruktion des Expressionsvektors	418
12.5	Trouble Shooting	378	14.3.2	Herstellung der rekombinanten Bacmid-DNA zur Transfektion von Insektenzellen	419
13	Transformationsmethoden für filamentöse Pilze	385	14.3.3	Handhabung, Kultivierung und Infektion von Insektenzellen	421
	(<i>Hella Tappe*</i>)		14.3.4	Transfektion von Sf9-Insektenzellen mit rekombinanter DNA	422
13.1	Selektionsmarker für filamentöse Pilze	386	14.3.5	Bestimmung günstiger Expressionsparameter	423
13.1.1	Dominante Selektionsmarker	386			
13.1.2	Gegenselektionssysteme	387			
13.1.3	Essenzielle Gene als Selektionsmarker (Auswahl)	389			
13.2	Gewinnung einer Sporenlösung filamentöser Pilze	390			

14.3.6	Bestimmung des viralen Titers über Plaque-Test	424	16	Verminderung der Genexpression über Ribozym-Targeting	455
14.3.7	Reinigung eines sekretierten Expressions- produkts mit His-tag unter nativen Bedingungen	426	16.1	Vorüberlegungen zur Ableitung von Ribozymen	456
14.3.8	Reinigung eines nicht sekretierten Expressionsprodukts mit His-tag unter denaturierenden Bedingungen	427	16.2	Herstellung von Ribozymen gegen den HER-2-Rezeptor	457
15	Das <i>Pichia pastoris</i>- Expressionssystem	431	16.2.1	Identifizierung geeigneter Zielsequenzen und Ableitung der Ribozymsequenzen	457
	(Christoph Reinhart, Christoph Krettlner*)		16.2.2	Auswahl des Expressionsvektors und Klonierung der Ribozyme	460
15.1	Die Charakteristika des <i>Pichia pastoris</i>- Systems	432	16.2.3	Herstellung stabiler ribozymtransfizierter Zelllinien mit konstitutiver Ribozym- expression	462
15.1.1	Vergleich mit anderen Expressions- systemen	432	16.2.4	Analyse und Vergleich der Ribozym- aktivität	463
15.1.2	<i>Pichia pastoris</i> -Expressionsvektoren	432	17	Analyse der Genregulation	467
15.1.3	Integration der rekombinanten Vektoren ins <i>Pichia pastoris</i> -Genom	433		(Korden Walter, Monika Lichtinger*)	
15.1.4	<i>Pichia pastoris</i> -Wirtsstämme	435	17.1	Bestimmung von DNase I hypersensitiven Stellen	469
15.2	Proteinexpression mit dem <i>Pichia pastoris</i>- System	437	17.2	<i>in silico</i>-Identifizierung von regulatorischen DNA-Elementen und DNA-Bindungsstellen für Transkriptions- faktoren	474
15.2.1	Transformation von <i>Pichia pastoris</i>	437	17.3	Präparation von Proteinextrakten aus Säugerzellen	475
15.2.1.1	Optimierte Elektroporation von <i>Pichia pastoris</i>	438	17.3.1	Präparation von Zellkernextrakten	476
15.2.1.2	LiCl-Transformation von <i>Pichia</i> <i>pastoris</i>	439	17.3.2	Präparation von cytoplasmatischen Extrakten	477
15.2.2	Analyse des <i>Mut</i> -Phänotyps rekombinanter <i>Pichia pastoris</i> -Klone	441	17.3.3	Kurzprotokoll zur Präparation von Zellkernextrakten	477
15.2.3	Selektion von <i>Pichia pastoris</i> -Klonen mit mehrfach integrierten Expressions- kassetten	442	17.4	EMSA (<i>Electrophoretic mobility shift</i> <i>assay</i>)	478
15.2.4	Proteinproduktion im 20 ml-Maßstab zur Durchmusterung mehrerer <i>Pichia pastoris</i> - Klone	443	17.4.1	Selektion und radioaktive Markierung der DNA-Fragmente	479
15.2.5	Proteinproduktion im 1 l-Maßstab	447	17.4.2	EMSA-Reaktion	480
15.2.6	<i>Pichia pastoris</i> im Fermenter	447	17.4.3	Nachweis der DNA-Bindeproteine durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	481
15.2.7	Zellaufschluss und Präparation von Rohmembranen in größerem Maßstab	450	17.4.4	Bestimmung der Spezifität	481
15.2.8	Lagerung von <i>Pichia pastoris</i>	452	17.5	<i>in vitro</i>-DNase I-Footprinting	482
15.2.9	Trouble Shooting für den gesamten praktischen Teil	452	17.5.1	DNase I-Footprinting	483
			17.5.2	DNA-Sequenzierung nach Maxam-Gilbert	484
			17.6	Funktionelle Analyse von DNase I hypersensitiven Stellen und Transkriptions- faktoren	486
			17.7	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	487

17.8	Bestimmung der Position von Nucleosomen mittels MNase	492	19.1.2	Analyse der Genexpressionsdaten	540
17.9	DNA-Methylierung	495	19.2	Gespottete Microarrays mit synthetischen Oligonucleotiden (50- bis 70-meren) oder PCR-Produkten	541
18	Peptid-Arrays auf Cellulosemembranen	501	19.2.1	Microarray-Analyse mit synthetischen Oligonucleotiden	542
	<i>Niels Röckendorf, Steffen Bade, Hans-Heiner Gorris, Andreas Frey</i>		19.2.1.1	Oligonucleotid-Design	542
18.1	Synthese der filtergebundenen Peptidbibliothek	501	19.2.1.2	Resuspendieren, Drucken und Lagerung der Oligonucleotide	542
18.1.1	Aminoderivatisierung des planaren Trägers und Definition der <i>spots</i>	502	19.2.2	Array-Herstellung	543
18.1.2	Synthese der Peptidkette	503	19.2.2.1	DNA-Immobilisierung	544
18.1.3	N-terminale Modifikation der fertigen Peptide und Entschützen der Aminosäureseitenketten	505	19.2.2.2	Prähybridisierung und Waschen der Microarrays	544
18.1.4	Praktische Vorbereitungen und Materialien	506	19.2.2.3	Überprüfung der <i>spot</i> -Morphologie	545
18.1.5	Durchführung	514	19.2.3	Markierung und Hybridisierung der Zielmoleküle (<i>targets</i>) für die Expressionsanalyse	546
18.1.5.1	Routine-Arbeitsschritte	517	19.2.4	Hybridisierung der Microarrays	549
18.1.5.2	Aminoderivatisierung des Celluloseträgers ..	518	19.2.5	Auswertung	551
18.1.5.3	Definition der <i>spots</i> und Verlängerung der Membrananker	520	19.3	Isolation und Anreicherung von micro-RNA	551
18.1.5.4	Synthesesyklus	521	19.3.1	Isolation von Gesamt-RNA aus Paraffinmaterial	552
18.1.5.5	End- <i>capping</i> und Abspaltung der Aminosäureseitenketten-Schutzgruppen ..	523	19.3.2	Auftrennung von Gesamt-RNA und kurzen RNA-Stücken (< 200 nt)	553
18.1.5.6	Lagerung der Peptidbibliotheken	523	19.3.3	Anreicherung von kurzen Sequenzen (10 bis 40 nt)	554
18.2	Screening der Peptidbibliotheken	523	20	Webbasierte Sequenzanalyse und Datenbankabfragen	557
18.2.1	Durchführung des <i>screenings</i>	524		<i>Josef Hermanns, Gerd Moeckel</i>	
18.3	Regeneration (<i>stripping</i>) der Peptidbibliothek	526	20.1	Allgemeine Datenbankabfragen	558
18.3.1	Vorbereitung	527	20.1.1	Molekularbiologische Datenbanken	559
18.3.2	Durchführung	528	20.1.1.1	DNA-Sequenzdatenbanken	559
19	Genexpressionsanalyse mit Microarrays	531	20.1.1.2	Proteinsequenz-Datenbanken	561
	<i>(Susanne Kneitz*)</i>		20.1.1.3	Charakteristische Sequenzbereiche/ Sequenzmotive	562
19.1	Genexpressions-Arrays mit <i>on-chip</i> synthetisierten Oligonucleotiden	534	20.1.1.4	3D-Strukturdatenbanken	563
19.1.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen	536	20.1.1.5	Literaturdatenbanken	563
			20.2	Textbasierte Suche	565
			20.2.1	NCBI und Entrez	565
			20.2.2	EBI und SRS	566
			20.2.3	Anwendungsbeispiel	568
			20.3	Sequenzinformationen	570
			20.3.1	Internetportale	571
			20.3.2	Sequenzanalyse	572
			20.3.2.1	DNA-Sequenzbausteine	572
			20.3.2.2	Sequenzformate	572

A2.3.2.2	Spaltung in Lösung: Endoproteinase Lys-C	636	A2.6	Aminosäure-Analyse	642
A2.3.2.3	Enzymatische Fragmentierung im Gel	637	A2.6.1	Hydrolyse	642
A2.3.2.4	Enzymatische Fragmentierung von der PVDF-Membran	637	A2.6.2	Derivatisierung	643
A2.4	Isolierung von Peptiden	638	A2.7	Kombinierte Techniken	644
A2.4.1	Peptidtrennung mittels HPLC	639	A2.7.1	N-terminale Leitersequenzierung: Kopplung von Massenspektrometrie und Edman-Chemie	645
A2.5	Bestimmung der carboxyterminalen Sequenz	640	A2.7.2	C-terminale Leitersequenzierung	645
A2.5.1	Endgruppenbestimmung mittels Carboxypeptidasen	641	A2.8	Zusammenfassung	646
				Register	647