

Inhaltsverzeichnis

1	Was bitte ist denn »Molekularbiologie«?	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
Literatur		11
2	Einige grundlegende Methoden	13
2.1	Nucleinsäure ist gleich Nucleinsäure und auch wieder nicht	15
2.2	Methoden zur DNA-Präparation	16
2.2.1	Bakterienmedien	17
2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	17
2.2.3	Minipräparation	18
2.2.4	Maxipräparation	20
2.2.5	Präparation von Phagen-DNA	22
2.2.6	Präparation einzelsträngiger DNA mittels Helferphagen	25
2.2.7	Präparation von genomischer DNA	26
2.3	Die Reinigung von Nucleinsäuren	27
2.3.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	27
2.3.2	Anionenaustauschersäulen	29
2.3.3	Glasmilch/Silikat-Membranen	31
2.3.4	Cäsiumchlorid-Dichtegradient	32
2.3.5	Fällung mit PEG	33
2.3.6	Dialyse	34
2.3.7	<i>Magnetic beads</i>	34
2.3.8	Proteinbindende Filtermembranen	35
2.3.9	Alkoholfällung	35
2.3.10	Konzentratoren	36
2.3.11	Exonuclease-Phosphatase-Verdau	36
2.4	Konzentrieren von Nucleinsäuren	36
2.4.1	Alkoholfällung	36
2.4.2	Konzentratoren	39
2.4.3	<i>SpeedVac</i>	40
2.4.4	»Aussalzen«	40
2.5	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen	40
2.5.1	OD-Messung mittels Absorptionsspektrometrie	40
2.5.2	Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel	42
2.5.3	Dot-Quantifizierung	42
2.5.4	Fluorometrische Bestimmung	43
2.5.5	Nucleinsäure-Messstäbchen	43
2.5.6	Enzymatischer Nachweis	44
Literatur		44

3	Das Werkzeug	47
3.1	Restriktionsenzyme	48
3.1.1	Der Aktivitätstest, oder: Was ist eine Einheit und wie viel bekomme ich für mein Geld?	51
3.1.2	Wie macht man einen Restriktionsverdau?	52
3.1.3	Schwierigkeiten beim Restriktionsverdau	54
3.1.4	Nachschlagewerke zum Thema Restriktionsverdau	58
3.1.5	Neuere Entwicklungen	58
3.2	Gele	58
3.2.1	Agarosegele	58
3.2.2	DNA-Fragmente aus Agarosegelen isolieren	65
3.2.3	Polyacrylamidgele (PA-Gele)	69
3.2.4	DNA-Fragmente aus PA-Gelen isolieren	71
3.2.5	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	71
3.2.6	Kapillarelektrophorese	72
3.2.7	Mikrochip-Kapillarelektrophorese	72
3.3	Blotten	72
3.3.1	Southern Blot	73
3.3.2	Northern Blot	76
3.3.3	Dot und Slot Blot	77
Literatur		79
4	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	81
4.1	Die Standard-PCR	82
4.2	Neue Entwicklungen	92
4.3	Tipps zur Verbesserung der PCR	93
4.3.1	<i>Nested PCR</i>	95
4.3.2	<i>Multiplex PCR</i>	95
4.3.3	Amplifikation langer DNA-Fragmente (> 5 kb)	96
4.4	PCR-Anwendungen	97
4.4.1	Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	97
4.4.2	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)</i>	97
4.4.3	Amplifikation zufälliger Produkte	98
4.4.4	Klassische quantitative PCR	101
4.4.5	<i>Real-time quantitative PCR</i>	103
4.4.6	Inverse PCR	108
4.4.7	Biotin-RAGE und Supported PCR	108
4.4.8	Mutagenese mit modifizierten Primern	109
4.4.9	<i>Amplification Refractory Mutation System (ARMS)</i>	110
4.4.10	<i>in-situ-PCR</i>	110
4.4.11	<i>Cycle sequencing</i>	111
4.4.12	cDNA-Synthese	111
4.4.13	Einzelzell-PCR	112
Literatur		113