

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 | Amplifikation 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 |