

# Inhalt

Vorwort zur 1. Auflage ..... 12

Vorwort zur 2. Auflage ..... 13

---

## 1 Das Leben und seine Bestandteile

**1.1 Der Aufbau von DNA und RNA** ..... 17

**1.2 Der genetische Code** ..... 20

**1.3 Die Gene** ..... 22

1.3.1 Die Genstruktur in Prokaryoten .. 22

1.3.2 Genstruktur in Eukaryoten ..... 24

**1.4 Proteine** ..... 26

**1.5 Die Zelle** ..... 30

---

## 2 Grundlagen der Arbeit im Labor

**2.1 Wasser** ..... 34

**2.2 Messung des pH-Werts** ..... 35

**2.3 Puffer** ..... 36

**2.4 Waagen** ..... 36

**2.5 Mikropipetten** ..... 38

**2.6 Gefäße im Labor** ..... 40

**2.7 Zentrifugen** ..... 41

**2.8 Mischen und Konzentrieren** .. 44

2.8.1 Konzentrieren ..... 45

2.8.2 Pufferwechsel ..... 45

**2.9 Probenlagerung** ..... 46

**2.10 Steriles Arbeiten** ..... 46

**2.11 Geräte für den Aufschluss von Geweben** ..... 49

**2.12 Pflege und Aufzucht von *Escherichia coli*** ..... 51

2.12.1 Nährmedien ..... 52

2.12.2 Antibiotika ..... 53

2.12.3 Lagerung von Bakterien ..... 55

---

### 3    **Aufreinigung von Nukleinsäuren**

|   |    |  |    |
|---|----|--|----|
| <b>3.1    Gegenspieler erfolgreicher DNA- und RNA-Isolationen</b> . . .     | 59 | 3.4.2    Übersicht über den Einsatz von Kits   | 70 |
| 3.1.1    Nukleasen  | 59 | <b>3.5    Ausgewählte DNA-Aufreinigungsverfahren</b>                                 | 71 |
| 3.1.2    Scherkräfte  | 60 | 3.5.1    Die Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>                                   | 71 |
| 3.1.3    Chemische Verunreinigungen   | 60 | 3.5.2    Die Isolation von DNA aus Pflanzen mit CTAB                                 | 72 |
| 3.1.4    EDTA und zweiwertige Ionen: das Yin und Yang der Molekularbiologie | 61 | 3.5.3    Isolation von DNA aus Blut oder Zellkulturen                                | 74 |
| <b>3.2    Extraktion von Nukleinsäuren</b>                                  | 62 | 3.5.4    Isolation hochmolekularer DNA   | 75 |
| <b>3.3    Die weitere Aufreinigung der DNA</b>                              | 64 | <b>3.6    Die Isolation von RNA</b>  | 76 |
| 3.3.1    Phenolextraktion   | 64 | <b>3.7    Tipps zum Erzielen hoher Ausbeuten bei der Isolation von Nukleinsäuren</b> | 78 |
| 3.3.2    Ethanol-fällung  | 65 | <b>3.8    Quantifizierung von Nukleinsäuren</b>                                      | 79 |
| 3.3.3    Isopropanolfällung   | 67 | 3.8.1    DNA-Bestimmung im Photometer  | 79 |
| 3.3.4    PEG-Fällung  | 68 | 3.8.2    Konzentrationsbestimmung mittels optischer Dichte                           | 81 |
| 3.3.5    Entfernen von Polysacchariden mit CTAB                             | 68 |  |    |
| 3.3.6    Tropfdialyse   | 68 |  |    |
| <b>3.4    Silica Matrices</b>   | 69 |  |    |
| 3.4.1    Von Nukleinsäuren und Silica Matrices                              | 69 |  |    |

---

### 4    **Polymerase-Kettenreaktion**

|   |    |   |     |
|---|----|---|-----|
| <b>4.1    Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion</b> | 85 | 4.5.2    Gradienten-PCR und <i>Touch-Down</i> PCR | 96  |
| <b>4.2    Die Komponenten der PCR</b>               | 86 | 4.5.3 <i>Nested</i> PCR                           | 97  |
| 4.2.1    Die Ausgangs-DNA                           | 86 | 4.5.4    Multiplex PCR                            | 97  |
| 4.2.2    Thermostabile DNA-Polymerasen              | 86 | 4.5.5    Einführen von Restriktionsschnittstellen | 98  |
| 4.2.3    Puffer, Magnesium und dNTPs                | 89 | 4.5.6    Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)      | 99  |
| 4.2.4    Primer                                     | 91 | 4.5.7    Kolonie-PCR                              | 102 |
| <b>4.3    Geräte für die PCR</b>                    | 93 | 4.5.8    Quantitative PCR                         | 103 |
| <b>4.4    Die Standard-PCR</b>                      | 94 | <b>4.6    Anwendungen der PCR</b>                 | 105 |
| <b>4.5    Ausgewählte PCR-Methoden</b>              | 94 | <b>4.7    Optimierung der PCR-Reaktion</b>        | 105 |
| 4.5.1 <i>Two-Step</i> PCR                           | 94 |   |     |

---

## 5 Klonieren für Einsteiger

|            |  |     |            |   |     |
|------------|--|-----|------------|---|-----|
| <b>5.1</b> | <b>Restriktionsenzyme</b> .....                    | 109 | <b>5.6</b> | <b>Der Weg zum klonierten Gen.</b> ..   | 123 |
| 5.1.1      | Restriktionsenzyme des Typs II ...                 | 110 | <b>5.7</b> | <b>Der ungerichtete Einbau einer amplifizierten DNA in einen Vektor</b> ..... | 123 |
| 5.1.2      | Restriktionsenzyme im Labor ...                    | 113 | 5.7.1      | Die Klonierung über eine Restriktionsstelle .....                             | 124 |
| 5.1.3      | Methylasen und Typ IIM-Enzyme .                    | 115 | 5.7.2      | TA-Klonierung und TOPO-Cloning  | 125 |
| 5.1.4      | Typ IIS-Enzyme .....                               | 116 | 5.7.3      | Klonierung in ein Letal-Plasmid ..  | 126 |
| <b>5.2</b> | <b>Ligation</b> .....                              | 116 | 5.7.4      | Zyklische <i>Blunt End</i> Klonierung. .                                      | 126 |
| <b>5.3</b> | <b>(De)Phosphorylierung von DNA</b> .....          | 118 | <b>5.8</b> | <b>Der gerichtete Einbau von DNA in einen Vektor</b> .....                    | 127 |
| 5.3.1      | Dephosphorylierung .....                           | 118 | <b>5.9</b> | <b>Wenn es mal nicht klappt ...</b> .....                                     | 129 |
| 5.3.2      | Phosphorylierung .....                             | 119 |            |   |     |
| <b>5.4</b> | <b>Enzyme für spezielle Aufgaben</b> .....         | 121 |            |   |     |
| <b>5.5</b> | <b>Die Transformation von <i>E. coli</i></b> ..... | 121 |            |   |     |

---

## 6 Vektoren

|            |  |     |             |   |     |
|------------|--|-----|-------------|---|-----|
| <b>6.1</b> | <b>Plasmide</b> .....                                  | 132 | <b>6.8</b>  | <b>Künstliche Chromosome: YACs, BACs und PACs</b> .....                     | 148 |
| <b>6.2</b> | <b>Klonierungsplasmide</b> .....                       | 135 | <b>6.9</b>  | <b>Hefen als Klonierungs- und Expressionssystem</b> .....                   | 149 |
| 6.2.1      | Blau-Weiß-Screening .....                              | 135 | 6.9.1       | Hefe als Modellorganismus .....   | 149 |
| 6.2.2      | Letalvektoren .....                                    | 138 | 6.9.2       | Vektoren für Hefe .....   | 151 |
| <b>6.3</b> | <b>Expressionsplasmide</b> .....                       | 139 | 6.9.3       | Transformation von Hefe .....   | 152 |
| 6.3.1      | Promotoren für Expressionsvektoren .....               | 140 | <b>6.10</b> | <b>Pflanzen als Bioreaktoren</b> ....                                       | 152 |
| 6.3.2      | Weitere regulative Sequenzen ...                       | 141 | 6.10.1      | Die Transformation von Pflanzen .   | 153 |
| 6.3.3      | Expression in das Periplasma ...                       | 141 | 6.10.2      | Transiente Transformationsverfahren .....                                   | 155 |
| 6.3.4      | Einschlusskörperchen [ <i>Inclusion Bodies</i> ] ..... | 141 | <b>6.11</b> | <b>Die Transformation von Säugetieren und tierischen Zellkulturen</b> ..... | 156 |
| 6.3.5      | <i>Tag</i> -Sequenzen .....                            | 142 | 6.11.1      | Säugetiere als Modellorganismen .   | 156 |
| <b>6.4</b> | <b>Reportergene</b> .....                              | 142 | 6.11.2      | Säuger-Zellkulturen .....   | 157 |
| <b>6.5</b> | <b>Phagen</b> .....                                    | 146 | 6.11.3      | Vektoren für tierische Zellen .....   | 158 |
| <b>6.6</b> | <b>Phagemide</b> .....                                 | 147 | 6.11.4      | Transfektion tierischer Zellkulturen .....                                  | 159 |
| <b>6.7</b> | <b>Shuttle-Vektoren</b> .....                          | 147 |             |   |     |

---

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| <b>7</b>    | <b>Elektrophorese und Hybridisierung von Nukleinsäuren</b> |     |
| <b>7.1</b>  | <b>Agarose-Gelelektrophorese von DNA</b> .....             | 162 |
| <b>7.2.</b> | <b>Die Detektion der DNA im Gel</b> .....                  | 167 |
| <b>7.3</b>  | <b>Präparative Agarosegele</b> .....                       | 169 |
| <b>7.4</b>  | <b>Auftrennen von RNA im Agarosegel</b> .....              | 170 |
| <b>7.5</b>  | <b>Fehlersuche bei Agarose-Gelelektrophorese</b> .....     | 170 |
| <b>7.6</b>  | <b>Hybridisierung von Nukleinsäuren</b> .....              | 171 |
| 7.6.1       | Southern und Northern Blot .....                           | 173 |
| 7.6.2       | Herstellung der Sonde und Hybridisierung .....             | 174 |
| <b>7.7</b>  | <b>Microarrays</b> .....                                   | 174 |

---

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| <b>8</b>   | <b>Fortgeschrittene Klonierung</b>                                   |     |
| <b>8.1</b> | <b>Klonsammlungen und synthetische Gene</b> .....                    | 179 |
| 8.1.1      | Klonsammlungen .....   | 180 |
| 8.1.2      | Synthetische Gene und Genfragmente .....                             | 180 |
| <b>8.2</b> | <b>Rekombinase-basierte Klonierung</b> .....                         | 181 |
| <b>8.3</b> | <b>Mutageneseverfahren</b> .....                                     | 183 |
| <b>8.4</b> | <b>PCR-basierte Klonierungsverfahren: RF-Cloning und oePCR</b> ..... | 186 |
| <b>8.5</b> | <b>Synthetische Biologie</b> .....                                   | 188 |
| <b>8.6</b> | <b>Biobricks</b> .....   | 189 |
| <b>8.7</b> | <b>Nahtlose Klonierungsverfahren</b> .....                           | 189 |
| 8.7.1      | Golden Gate Klonierung .....   | 190 |
| 8.7.2      | <i>Cut-Ligation</i> Verfahren .....                                  | 191 |
| 8.7.3      | Multiple Insertionen mittels Golden Gate Klonierung .....            | 192 |
| 8.7.4      | Golden Gate basierte Tool Kits am Beispiel des MoClo Kits .....      | 192 |
| <b>8.8</b> | <b>Gibson Assembly</b> .....   | 195 |
| <b>8.9</b> | <b>Vergleich der Verfahren</b> .....                                 | 198 |

---

## 9 Proteinaufreinigung

|  |     |  |     |
|--|-----|--|-----|
| <b>9.1 Homogenisation</b> . . . . .                    | 203 | <b>9.5 Quantifizierung von Proteinen</b> . . . . .                                   | 217 |
| 9.1.1 Proteasen . . . . .                              | 204 | 9.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .                                      | 217 |
| 9.1.2 Phenoloxidasen . . . . .                         | 206 | 9.5.2 BCA-Test . . . . .   | 219 |
| <b>9.2 Extraktion von Proteinen</b> . . . . .          | 207 | 9.5.3 Welchen Test benutzen? . . . . .   | 220 |
| 9.2.1 Homogenisationspuffer . . . . .                  | 207 | <b>9.6 Aufreinigungsverfahren für getaggte Proteine aus <i>E. coli</i></b> . . . . . | 221 |
| 9.2.2 Abtrennen von Zell- und Gewebetrümmern . . . . . | 208 | 9.6.1 Bakterienanzucht und Homogenisation . . . . .                                  | 222 |
| 9.2.3 Fraktionierung des Rohextrakts . . . . .         | 208 | 9.6.2 Weitere Aufreinigung des heterologen Proteins . . . . .                        | 224 |
| <b>9.3 Dialyse und Konzentrierung</b> . . . . .        | 211 |  |     |
| <b>9.4 Weitere Aufreinigungsschritte</b> . . . . .     | 212 |  |     |
| 9.4.1 Chromatographie . . . . .                        | 213 |  |     |
| 9.4.2 Chromatographische Trennprinzipien . . . . .     | 215 |  |     |
| 9.4.3 <i>Magnetic Beads</i> . . . . .                  | 216 |  |     |

---

## 10 Gelelektrophorese von Proteinen

|  |     |  |     |
|--|-----|--|-----|
| <b>10.1 Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</b> . . . . .                 | 229 | <b>10.4 Weitere Elektrophoreseverfahren für Proteine</b> . . . . . | 239 |
| <b>10.2 Die denaturierende SDS-PAGE</b> . . . . .                                | 229 | 10.4.1 Native PAGE . . . . .                                       | 239 |
| 10.2.1 Herstellung eines Proteinextrakts für die SDS-Gelelektrophorese . . . . . | 229 | 10.4.2 Isoelektrische Fokussierung . . . . .                       | 239 |
| 10.2.2 Herstellen des Gels . . . . .   | 232 | 10.4.3 2-D-Gelelektrophorese . . . . .                             | 239 |
| 10.2.3 Der Gellauf . . . . .   | 235 | <b>10.5 Western Blotting</b> . . . . .                             | 241 |
| <b>10.3 Das Färben der Gele</b> . . . . .  | 237 | <b>10.6 Massenspektrometrische Verfahren</b> . . . . .             | 246 |

---

## 11 Immunbiochemische Methoden

|             |  |     |             |  |     |
|-------------|--|-----|-------------|--|-----|
| <b>11.1</b> | <b>Antikörper</b> .....                                    | 251 | <b>11.3</b> | <b>ELISA</b> .....                                     | 261 |
|             |  |     | 11.3.1      | Sandwich-ELISA .....                                   | 263 |
| <b>11.2</b> | <b>Prinzipien immun-<br/>biochemischer Verfahren</b> ..... | 254 | 11.3.2      | Kompetitiver ELISA .....                               | 265 |
| 11.2.1      | Immunpräzipitation .....                                   | 254 | <b>11.4</b> | <b>Immunfärbung nach<br/>Western Blot</b> .....        | 266 |
| 11.2.2      | Trägerbasierte Immunfärbung ...                            | 256 | <b>11.5</b> | <b>Immunaффinitäts-<br/>chromatographie</b> .....      | 269 |
| 11.2.3      | Immobilisierung des Antigens ...                           | 257 | <b>11.6</b> | <b>Weitere Antikörper-<br/>basierte Methoden</b> ..... | 270 |
| 11.2.4      | Blocken überschüssiger<br>Bindestellen .....               | 257 | 11.6.1      | Rekombinante Antikörper .....                          | 270 |
| 11.2.5      | Detektion der Bindung .....                                | 257 | 11.6.2      | <i>Phage Display</i> und scFv .....                    | 271 |
| 11.2.6      | Antikörper-Kaskaden .....                                  | 259 | 11.6.3      | Immunhistochemische Verfahren .                        | 273 |
| 11.2.7      | Spezifische und<br>unspezifische Bindungen .....           | 260 | 11.6.4      | Markierung von Zellen .....                            | 274 |

---

## 12 Fortgeschrittene Verfahren

|             |  |     |             |  |     |
|-------------|--|-----|-------------|--|-----|
| <b>12.1</b> | <b>DNA-Sequenzierung</b> .....                           | 278 | <b>12.4</b> | <b>Analyse der Genfunktion</b> .....               | 286 |
| 12.1.1      | Sequenzierung nach Sanger .....                          | 278 | 12.4.1      | Reverse Genetik und<br><i>Gene Targeting</i> ..... | 286 |
| 12.1.2      | Herstellen von Proben für<br>die DNA-Sequenzierung ..... | 280 | 12.4.2      | RNAi .....   | 287 |
| <b>12.2</b> | <b>Next Generation<br/>Sequenzierung</b> .....           | 281 | 12.4.3      | Durchführung von<br>siRNA-Experimenten .....       | 288 |
| <b>12.3</b> | <b>Von den „Omics“<br/>zur Systembiologie</b> .....      | 285 | <b>12.5</b> | <b>Genom Editierung</b> .....                      | 289 |

---

## 13 Bioinformatik

|             |  |     |             |  |     |
|-------------|--|-----|-------------|--|-----|
| <b>13.1</b> | <b>Datenbanken</b> .....                                       | 296 | <b>13.4</b> | <b>Sequenzsuche mit einer<br/>Sequenz (BLAST)</b> .....    | 300 |
| <b>13.2</b> | <b>Dateiformate</b> .....                                      | 298 | <b>13.5</b> | <b>Bioinformatik zur Planung<br/>der Laborarbeit</b> ..... | 305 |
| <b>13.3</b> | <b>Sequenzsuche anhand von<br/>Stichwörtern (Entrez)</b> ..... | 300 |             |  |     |

---

## 14 Anhang

|    |   |     |  |     |
|----|---|-----|--|-----|
| A1 | Sicherheit im Labor.....                    | 308 | Verzeichnis der<br>„Gut zu wissen“-Boxen ..... | 313 |
| A2 | Die 10 goldenen Laborregeln ..              | 309 | Abbildungsverzeichnis.....                     | 314 |
| A3 | Das Laborbuch und<br>die finale Arbeit..... | 311 | Verzeichnis der Maps .....                     | 316 |
|    |   |     | Verzeichnis der Protokolle.....                | 316 |
|    |   |     | Tabellenverzeichnis.....                       | 317 |
|    |   |     | Abkürzungsverzeichnis .....                    | 318 |
|    |   |     | Sachverzeichnis.....                           | 321 |
|    |   |     | Quellenverzeichnis .....                       | 328 |