

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	8
2	Einige grundlegenden Methoden	12
2.1	Nucleinsäure ist gleich Nucleinsäure und auch wieder nicht	12
2.2	Vom Fällern und Konzentrieren von Nucleinsäuren	14
2.2.1	Alkohol-Fällung	14
2.2.2	Konzentratoren	17
2.2.3	Speed-vac	18
2.2.4	„Aussalzen“	19
2.3	Die Reinigung von Nucleinsäuren	19
2.3.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	19
2.3.2	Fällung mit PEG	21
2.3.3	Proteinbindende Filtermembranen	21
2.3.4	Anionenaustauschersäulen	21
2.3.5	Glasmilch	23
2.3.6	Cäsiumchlorid-Dichtegradient	23
2.3.7	Dialyse	24
2.4	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen	25
2.5	Methoden zur DNA-Präparation	29
2.5.1	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparationen)	29
2.5.2	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparationen)	31
2.5.3	Bakterienmedien	33
2.5.4	Präparation von Phagen-DNA	35
2.5.5	Präparation einzelsträngiger DNA mittels Helferphagen	38
2.5.6	Präparation von genomischer DNA	39
3	Das Werkzeug	41
3.1	Restriktionsenzyme	41
3.2	Gele	49
3.2.1	Agarosegele	50
3.2.2	DNA-Fragmente aus Agarosegelen isolieren	55
3.2.3	Polyacrylamidgele (PA-Gele)	59
3.2.4	DNA-Fragmente aus PA-Gelen isolieren	61
3.2.5	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	62
3.2.6	Kapillarelektrophorese	63
3.3	Blotten	63

3.3.1	Southern Blot	63
3.3.2	Northern Blot	67
3.3.3	Dot und Slot Blot	69
4	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	71
4.1	Die Standard-PCR	71
4.2	Tips zur Verbesserung der PCR	81
4.2.1	Nested PCR	83
4.2.2	Multiplex PCR	84
4.2.3	Amplifikation langer DNA-Fragmente (> 5kb)	85
4.3	PCR-Anwendungen	86
4.3.1	Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	86
4.3.2	Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	87
4.3.3	Amplifikation zufälliger Produkte	89
4.3.4	Klassische quantitative PCR	90
4.3.5	Real-time quantitative PCR	93
4.3.6	Inverse PCR	99
4.3.7	Biotin-RAGE und Supported PCR	100
4.3.8	Mutagenese mit modifizierten Primern	100
4.3.9	ARMS (amplification refractory mutation system)	101
4.3.10	in-situ-PCR	102
4.3.11	Cycle Sequencing	103
4.3.12	cDNA-Synthese	103
4.3.13	Einzelzell-PCR	103
5	RNA	105
5.1	Methoden der RNA-Isolierung	106
5.2	Methoden der mRNA-Isolierung	108
5.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	109
5.4	In-vitro-Transkription (RNA-Synthese)	111
6	Die Klonierung von DNA-Fragmenten	114
6.1	Die Grundlagen des Klonierens	114
6.1.1	Klonieren von PCR-Produkten	120
6.1.2	Klonieren mit Rekombinase-Systemen	123
6.2	Mit welchen Vektoren klonieren?	126
6.2.1	Plasmide	126
6.2.2	Phagen	129
6.2.3	Cosmide	131
6.2.4	PACs und BACs	131
6.2.5	YACs	132
6.3	Welche Bakterien?	133
6.4	Herstellen kompetenter Zellen und Transformation	134

6.5	Probleme beim Klonieren	139
6.6	Die Lagerung von Klonen	140
7	Wie man DNA aufspürt	142
7.1	Herstellung von Sonden	142
7.1.1	Methoden zur Herstellung markierter Sonden	144
7.2	Hybridisierung	148
7.3	Nachweis der markierten DNA	150
7.3.1	Autoradiographie	150
7.3.2	Nicht-radioaktive Nachweismethoden	152
7.4	Screenen von rekombinanten DNA-Banken	155
7.5	Two-hybrid system	159
8	DNA-Analyse	164
8.1	Sequenzierung	164
8.1.1	Radioaktive Sequenzierung	166
8.1.2	Nicht-radioaktive Sequenzierung und automatische Sequenziergeräte	168
8.1.3	Kurioses zum Thema Sequenzieren: Octamere	170
8.2	Methoden zur Analyse von DNA auf Mutationen	171
8.2.1	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	171
8.2.2	Single strand conformation polymorphism (SSCP)	172
8.2.3	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	174
8.2.4	Temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE)	176
8.2.5	Heteroduplexanalyse (HA)	177
8.2.6	ARMS	177
8.2.7	Enzymatische Spaltung von Fehlpaarungen (enzyme mismatch cleavage, EMC)	177
8.2.8	Protein truncation test (PTT)	179
9	Untersuchung der Funktion von DNA-Sequenzen	181
9.1	Untersuchung der Transkription in Geweben	182
9.1.1	Ribonuclease protection assay (RPA)	182
9.1.2	Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)	183
9.1.3	in-situ-Hybridisierung	183
9.1.4	Chromosomale Lokalisierung eines Gens (FISH)	186
9.1.5	in-situ-PCR	188
9.1.6	Microarrays	188
9.2	Mutagenese	194
9.3	in-vitro-Translation	203
9.4	Expressionssysteme	205
9.4.1	Bakterielle Expressionssysteme	205
9.4.2	Baculovirus-Expressionssysteme	206

9.4.3	Heterologe Expression in Säugerzellen	208
9.4.4	Weitere Expressionssysteme	210
9.4.5	Transfektionsmethoden	211
9.4.6	Kotransfektion mehrerer Gene	219
9.4.7	Transiente und stabile Transfektionen	219
9.4.8	Reportergene	221
9.5	Transgene Mäuse	227
9.5.1	Methoden des Gentransfers	228
9.6	Regulation der Transgenexpression	234
9.6.1	Das Tet-System	234
9.6.2	Das Ecdyson-System	235
9.7	Gentherapie	236
9.8	Genomik	238
10	Der Computer und Du	242
11	Zu guter Letzt	247
12	Anhang	249
12.1	Nützliche Tabellen	249
12.2	Standardlösungen	250
12.3	Glossar	252
13	Wer, was, wo?	256
13.1	Lieferanten / Adressen	256
13.2	Literatur	260