

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	Magnetic beads	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	SpeedVac	40
2.4.4	»Aussalzen«	40
2.5	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen	40
2.5.1	OD-Messung mittels Absorptionspektrometrie	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

5	RNA	115
5.1	Wie inaktiviert man RNasen?	116
5.2	Methoden der RNA-Isolierung	117
5.2.1	single step-Methode	117
5.2.2	Lyse mit Nonidet P-40	118
5.2.3	Allgemeines	118
5.2.4	Konzentrationsbestimmung bei RNA	118
5.3	Methoden der mRNA-Isolierung	119
5.3.1	RNA kaufen	120
5.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	120
5.5	in-vitro-Transkription (RNA-Synthese)	121
5.6	Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)	122
5.7	RNA-Interferenz (RNAi)	127
Literatur	131
6	Die Klonierung von DNA-Fragmenten	133
6.1	Die Grundlagen des Klonierens	134
6.1.1	Klonieren von PCR-Produkten	140
6.1.2	Ligation independent cloning (LIC)	142
6.1.3	Klonieren mit Rekombinase-Systemen	143
6.2	Mit welchen Vektoren klonieren?	146
6.2.1	Plasmide	146
6.2.2	Phagen	149
6.2.3	Cosmide	151
6.2.4	PACs und BACs	151
6.2.5	YACs	152
6.3	Welche Bakterien?	153
6.4	Herstellen kompetenter Zellen und Transformation	153
6.4.1	Calciumchlorid-Methode	154
6.4.2	Rubidiumchlorid-Methode	155
6.4.3	TSS-Methode	155
6.4.4	Elektroporation	155
6.4.5	Wie testet man die Kompetenz der Bakterien?	157
6.5	Probleme beim Klonieren	158
6.6	Die Lagerung von Klonen	159
Literatur	160
7	Wie man DNA aufspürt	163
7.1	Herstellung von Sonden	164
7.1.1	Methoden zur Herstellung markierter Sonden	165
7.2	Hybridisierung	169
7.2.1	Der Hybridisierungspuffer	169
7.2.2	Die Hybridisierungsgefäße	169
7.2.3	Die Hybridisierungstemperatur	170
7.2.4	Waschen	170
7.3	Nachweis der markierten DNA	171
7.3.1	Autoradiographie	171

Inhaltsverzeichnis

7.3.2	Nicht-radioaktive Nachweismethoden	172
7.4	Screenen von rekombinanten DNA-Banken	175
7.4.1	Ausplattieren der Bank	175
7.4.2	Filter ziehen	175
7.4.3	Filter hybridisieren	176
7.4.4	Filter exponieren	177
7.4.5	Klon ausfindig machen	177
7.4.6	Bankenscreenen in der Zukunft	178
7.5	<i>Two-Hybrid-System</i>	178
7.6	<i>Phage Display</i>	181
Literatur		182
8	DNA-Analyse	183
8.1	Sequenzierung	184
8.1.1	Radioaktive Sequenzierung	185
8.1.2	Nicht-radioaktive Sequenzierung und automatische Sequenzergeräte	188
8.1.3	Schrotschuss-Sequenzierung	189
8.1.4	Kurioses zum Thema Sequenzieren: Octamere	190
8.1.5	Minisequenzierung	190
8.1.6	Pyrosequenzierung zum Ersten	191
8.1.7	Pyrosequenzierung zum Zweiten	193
8.1.8	Weitere Methoden der Massen-Parallelsequenzierung	194
8.1.9	Die Zukunft der Sequenzierung	199
8.2	Methoden zur Analyse von DNA auf Mutationen	201
8.2.1	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	201
8.2.2	<i>Single-strand conformation polymorphism (SSCP)</i>	201
8.2.3	Denaturierende Gradientengelektrophorese (DGGE)	203
8.2.4	<i>Temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE)</i>	204
8.2.5	Heteroduplexanalyse (HA)	205
8.2.6	<i>Amplification refractory mutation system (ARMS)</i>	206
8.2.7	Enzymatische Spaltung von Fehlpaarungen (<i>enzyme mismatch cleavage, EMC</i>)	206
8.2.8	<i>Protein truncation test (PTT)</i>	207
Literatur		208
9	Untersuchung der Funktion von DNA-Sequenzen	211
9.1	Untersuchung der Transkription in Geweben	212
9.1.1	<i>Ribonuclease protection assay (RPA)</i>	213
9.1.2	<i>Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)</i>	213
9.1.3	<i>in-situ-Hybridisierung</i>	214
9.1.4	Chromosomal Lokalisierung eines Gens (FISH)	216
9.1.5	<i>in-situ-PCR</i>	217
9.1.6	Microarrays	217
9.1.7	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	223
9.2	Mutagenese	225
9.2.1	Techniken der Mutagenese	227
9.3	<i>in-vitro-Translation</i>	233
9.4	Expressionssysteme	235

9.4.1	Bakterielle Expressionssysteme	235
9.4.2	Baculovirus-Expressionssysteme	236
9.4.3	Weitere Expressionssysteme	237
9.4.4	Heterologe Expression in Säugerzellen	238
9.4.5	Transfektionsmethoden	240
9.4.6	Kotransfektion mehrerer Gene	246
9.4.7	Transiente und stabile Transfektionen	247
9.4.8	Reportergene	248
9.5	Transgene Mäuse	254
9.5.1	Methoden des Gentransfers	255
9.6	Regulation der Transgenexpression	259
9.6.1	Das Tet-System	259
9.6.2	Das Ecdyson-System	261
9.7	Gentherapie	261
9.8	Genomik	263
9.8.1	Ausblick	266
Literatur	266
10	Tipps für die Karriereplanung	269
10.1	Publikationen	270
10.2	Karriere	272
10.3	Die tägliche Arbeit	275
11	Zu guter Letzt	279
Serviceteil	283
Anhang	284
Glossar	288
Literatur	292
Sachverzeichnis	294