

Inhaltsverzeichnis

Vorwort 7

1 Das Leben und seine Bestandteile 11

- 1.1 Der Aufbau von DNA und RNA 13
- 1.2 Der genetische Code 16
- 1.3 Die Gene 17
- 1.4 Die Proteine 22
- 1.5 Die Zelle 27

2 Grundlagen der Arbeit im Labor 29

- 2.1 Wasser 30
- 2.2 Messung des pH-Wertes 31
- 2.3 Puffer 32
- 2.4 Waagen 33
- 2.5 Mikropipetten 34
- 2.6 Gefäße im Labor 36
- 2.7 Zentrifugen 36
- 2.8 Mischen und Konzentrieren 40
- 2.9 Konzentrieren 41
- 2.10 Pufferwechsel 42
- 2.11 Proben-Lagerung 42
- 2.12 Steriles Arbeiten 43
- 2.13 Die kleinen Freunde – Pflege und Aufzucht von *Escherichia coli* 45
- 2.14 Der Aufschluss von Geweben 50

3 Aufreinigung von Nukleinsäuren 53

- 3.1 Gegenspieler erfolgreicher DNA- und RNA-Isolationen 55
- 3.2 Extraktion von Nukleinsäuren 58
- 3.3 Die weitere Aufreinigung der DNA 59
- 3.4 Einige ausgewählte DNA-Aufreinigungsmethoden 66
- 3.5 Die Isolation von RNA 71
- 3.6 Übersicht über den Einsatz von Kits 74
- 3.7 Tipps zum Erzielen hoher Ausbeuten bei der Isolation von Nukleinsäuren 74
- 3.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren 75

4 Polymerase Kettenreaktion 79

- 4.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion 81
- 4.2 Die Komponenten der PCR 81
- 4.3 Geräte für die PCR 90
- 4.4 Die Standard-PCR 91
- 4.5 Ausgewählte PCR-Methoden 91
- 4.6 Anwendungen der PCR 100
- 4.7 Optimierung der PCR-Reaktion 101

5 Klonieren für Einsteiger 103

- 5.1 Restriktionsenzyme 105
- 5.2 Ligation 113
- 5.3 Dephosphorylierung 115
- 5.4 Die Transformation von *E. coli* 117
- 5.5 Der Weg zum klonierten Gen 119
- 5.6 Der ungerichtete Einbau einer amplifizierten DNA in einen Vektor 119
- 5.7 Der gerichtete Einbau von DNA in einen Vektor 122
- 5.8 Ligase-unabhängige Klonierungssysteme 124
- 5.9 Wenn es mal nicht klappt ... 125

6 Vektoren 127

- 6.1 Plasmide 129
- 6.2 Klonierungsplasmide 132
- 6.3 Rekombinase-basierte Klonierung 136
- 6.4 Expressionsplasmide 139
- 6.5 Reportergene 143
- 6.6 Phagen 146
- 6.7 Phagemide 147
- 6.8 Shuttle-Vektoren 147
- 6.9 Künstliche Chromosomen: BACs, PACs und YACs 148
- 6.10 Hefen als Klonierungs- und Expressionssystem 149

- 6.11 Die Transformation von Pflanzen 151
- 6.12 Die Transformation von Säugetieren und tierischen Zellkulturen 153

7 Elektrophorese von Nukleinsäuren 157

- 7.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA 159
- 7.2 Die Detektion der DNA im Gel 164
- 7.3 Präparative Agarosegele 165
- 7.4 Auftrennen von RNA im Agarosegel 167
- 7.5 Fehlersuche bei der Agarose-Gelelektrophorese 168

8 Proteinaufreinigung 171

- 8.1 Homogenisation 175
- 8.2 Extraktion von Proteinen 177
- 8.3 Dialyse und Konzentrierung 181
- 8.4 Weitere Aufreinigungsschritte 183
- 8.5 Quantifizierung von Proteinen 186
- 8.6 Aufreinigungsverfahren für getaggte Proteine aus *E. coli* 189

9 Gelelektrophorese von Proteinen 195

- 9.1 Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 197
- 9.2 Die denaturierende SDS-PAGE 197
- 9.3 Das Färben der Gele 206
- 9.4 Weitere Elektrophoreseverfahren für Proteine 208
- 9.5 Western Blotting 211
- 9.6 Wenn es mal nicht klappt ... 214

10 Immunbiochemische Methoden 217

- 10.1 Antikörper 219
- 10.2 Prinzipien immunbiochemischer Verfahren 223
- 10.3 Spezifische und unspezifische Bindungen 229
- 10.4 Immunbiochemische Verfahren 230
- 10.5 ELISA 230
- 10.6 Immunfärbung nach Western Blot 235
- 10.7 Immunoaffinitätschromatographie 237
- 10.8 Weitere Antikörper-basierte Methoden 239
- 10.9 Wenn es mal nicht klappt ... 240

11 Molekularbiologie für Fortgeschrittene 243

- 11.1 DNA-Sequenzierung 245
- 11.2 Bioinformatische Sequenzanalyse 248
- 11.3 Der Einsatz der Bioinformatik für die Klonierung von DNA 250
- 11.4 Vollständige Sequenzen durch 3' RACE-PCR und 5' RACE-PCR 251
- 11.5 Stammsammlungen 253
- 11.6 Identifizierung von Nukleinsäuren durch Hybridisierung 253
- 11.7 DNA-Chips oder Microarrays 255
- 11.8 Veränderung von Nukleinsäuren 256
- 11.9 Synthetische Gene 260

Anhang

- A1 Sicherheit im Labor 262
- A2 Die 10 goldenen Laborregeln 263
- A3 Das Laborbuch und die finale Arbeit 264

Verzeichnis der Maps, Protokolle, E-Docs, Tabellen und Abbildungen 266
 Abkürzungsverzeichnis 268
 Quellenverzeichnis 268
 Register 269