

Cornel Mülhardt

Der Experimentator: **Molekularbiologie**

2. Auflage

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin

Inhaltsverzeichnis

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	11
2.1 Nucleinsäure ist gleich Nucleinsäure und auch wieder nicht	11
2.2 Vom Fälln und Konzentrieren von Nucleinsäuren	13
2.2.1 Alkohol-Fällung	13
2.2.2 Konzentratoren	16
2.2.3 Speed-vac	17
2.2.4 "Aussalzen"	17
2.3 Die Reinigung von Nucleinsäuren	17
2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	18
2.3.2 Fällung mit PEG	19
2.3.3 Proteinbindende Filtermembranen	19
2.3.4 Anionenaustauschersäulen	19
2.3.5 Glasmilch	21
2.3.6 Cäsiumchlorid-Dichtegradient	21
2.3.7 Dialyse	22
2.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen	23
2.5 Methoden zur DNA-Präparation	26
2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	26
2.5.2 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab	28
2.5.3 Bakterienmedien	31
2.5.4 Präparation von Phagen-DNA	32
2.5.5 Präparation einzelsträngiger DNA mittels Helferphagen	36
2.5.6 Präparation von genomischer DNA	36
3 Das Werkzeug	38
3.1 Restriktionsenzyme	38
3.2 Gele	46
3.2.1 Agarosegele	46
3.2.2 DNA-Fragmente aus Agarosegelen isolieren	51
3.2.3 Polyacrylamidgele (PA-Gele)	54
3.2.4 DNA-Fragmente aus PA-Gelen isolieren	57
3.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	57
3.2.6 Kapillarelektrophorese	58

3.3	Blotten	59
3.3.1	Southern Blot	59
3.3.2	Northern Blot	62
3.3.3	Dot und Slot Blot	64
4	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	67
4.1	Die Standard-PCR	67
4.2	Tips zur Verbesserung der PCR	77
4.2.1	Nested PCR	79
4.2.2	Multiplex PCR	80
4.2.3	Amplifikation langer DNA-Fragmente	80
4.3	PCR-Anwendungen	81
4.3.1	Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	81
4.3.2	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	82
4.3.3	Amplifikation zufälliger Produkte	84
4.3.4	Klassische quantitative PCR	85
4.3.5	Real-time Quantitative PCR	88
4.3.6	Inverse PCR	93
4.3.7	Biotin-RAGE und Supported PCR	94
4.3.8	Mutagenese mit modifizierten Primern	95
4.3.9	ARMS	95
4.3.10	in-situ-PCR	96
4.3.11	Cycle Sequencing	97
4.3.12	cDNA-Synthese	97
4.3.13	Einzelzell-PCR	98
5	RNA	100
5.1	Methoden der RNA-Isolierung	101
5.2	Methoden der mRNA-Isolierung	103
5.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	104
5.4	In-vitro-Transkription (in-vitro-Synthese von RNA)	106
6	Die Klonierung von DNA-Fragmenten	108
6.1	Mit welchen Vektoren klonieren?	116
6.1.1	Plasmide	116
6.1.2	Phagen	119
6.1.3	Cosmide	121
6.1.4	PACs und BACs	121
6.1.5	YACs	122
6.2	Welche Bakterien?	123

6.3	Herstellen kompetenter Zellen und Transformation	124
6.4	Probleme beim Klonieren	129
6.5	Die Lagerung von Klonen	130
7	Wie man DNA aufspürt	132
7.1	Herstellung von Sonden	132
7.1.1	Methoden zur Herstellung markierter Sonden	134
7.2	Hybridisierung	138
7.3	Nachweis der markierten DNA	140
7.3.1	Autoradiographie	140
7.3.2	Nicht-radioaktive Nachweismethoden	142
7.4	Screenen von rekombinanten DNA-Banken	145
8	DNA-Analyse	149
8.1	Sequenzierung	149
8.1.1	Radioaktive Sequenzierung	151
8.1.2	Nicht-radioaktive Sequenzierung und automatische Sequenzierer	153
8.1.3	Kurioses zum Thema Sequenzieren: Octamere	155
8.2	Methoden zur Analyse von DNA auf Mutationen	156
8.2.1	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	156
8.2.2	Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	157
8.2.3	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	158
8.2.4	Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE)	161
8.2.5	Heteroduplexanalyse (HA)	161
8.2.6	ARMS	162
8.2.7	Enzymatische Spaltung von Fehlpaarungen (EMC)	162
8.2.8	Protein Truncation Test (PTT)	164
9	Untersuchung der Funktion von DNA-Sequenzen	166
9.1	Untersuchung der Transkription in Geweben	167
9.1.1	Ribonuclease protection assay (RPA)	167
9.1.2	in-situ-Hybridisierung	168
9.1.3	Chromosomale Lokalisierung eines Gens (FISH)	170
9.1.4	in-situ-PCR	172
9.1.5	Microarrays	172
9.2	Mutagenese	178
9.3	in-vitro-Translation	186

9.4	Expressionssysteme	187
9.4.1	Bakterielle Expressionssysteme	187
9.4.2	Baculovirus-Expressionssysteme	188
9.4.3	Heterologe Expression in Säugerzellen	190
9.4.4	Weitere Expressionssysteme	191
9.4.5	Transfektionsmethoden	192
9.4.6	Kotransfektion mehrerer Gene	200
9.4.7	Transiente und stabile Transfektionen	200
9.4.8	Reportergene	202
9.5	Transgene Mäuse	208
9.5.1	Methoden des Gentransfers	209
9.6	Regulation der Transgenexpression	215
9.6.1	Das Tet-System	215
9.6.2	Das Ecdyson-System	216
9.7	Gentherapie	217
10	Der Computer und Du	219
11	Zu guter Letzt	224
12	Anhang	226
12.1	Nützliche Tabellen	226
12.2	Standardlösungen	227
12.3	Glossar	229
13	Wer, was, wo?	233
13.1	Lieferanten / Adressen	233
13.2	Literatur	237
14	Register	239
14.1	Register	239