

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

3.1 Gegenspieler erfolgreicher DNA- und RNA-Isolationen . . .	59	3.4.2 Übersicht über den Einsatz von Kits	70
3.1.1 Nukleasen	59	3.5 Ausgewählte DNA-Aufreinigungsverfahren	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
3.2 Extraktion von Nukleinsäuren	62	3.5.4 Isolation hochmolekularer DNA	75
3.3 Die weitere Aufreinigung der DNA	64	3.6 Die Isolation von RNA	76
3.3.1 Phenolextraktion	64	3.7 Tipps zum Erzielen hoher Ausbeuten bei der Isolation von Nukleinsäuren	78
3.3.2 Ethanolfällung	65	3.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren	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 Tropfendialyse	68		
3.4 Silica Matrices	69		
3.4.1 Von Nukleinsäuren und Silica Matrices	69		

4 Polymerase-Kettenreaktion

4.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	85	4.5.2 Gradienten-PCR und Touch-Down PCR	96
4.2 Die Komponenten der PCR	86	4.5.3 Nested 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
4.3 Geräte für die PCR	93	4.5.8 Quantitative PCR	103
4.4 Die Standard-PCR	94	4.6 Anwendungen der PCR	105
4.5 Ausgewählte PCR-Methoden	94	4.7 Optimierung der PCR-Reaktion	105
4.5.1 Two-Step PCR	94		

5 Klonieren für Einsteiger

5.1	Restriktionsenzyme	109
5.1.1	Restriktionsenzyme des Typs II...	110
5.1.2	Restriktionsenzyme im Labor	113
5.1.3	Methylasen und Typ IIM-Enzyme .	115
5.1.4	Typ IIS-Enzyme	116
5.2	Ligation	116
5.3	(De)Phosphorylierung von DNA	118
5.3.1	Dephosphorylierung	118
5.3.2	Phosphorylierung	119
5.4	Enzyme für spezielle Aufgaben	121
5.5	Die Transformation von <i>E. coli</i>	121

5.6	Der Weg zum klonierten Gen. .	123
5.7	Der ungerichtete Einbau einer amplifizierten DNA in einen Vektor	123
5.7.1	Die Klonierung über eine Restriktionsstelle	124
5.7.2	TA-Klonierung und TOPO-Cloning	125
5.7.3	Klonierung in ein Letal-Plasmid ..	126
5.7.4	Zyklische <i>Blunt End</i> Klonierung. .	126
5.8	Der gerichtete Einbau von DNA in einen Vektor	127
5.9	Wenn es mal nicht klappt	129

6 Vektoren

6.1	Plasmide	132
6.2	Klonierungsplasmide	135
6.2.1	Blau-Weiß-Screening	135
6.2.2	Letalvektoren	138
6.3	Expressionsplasmide	139
6.3.1	Promotoren für Expressionsvektoren	140
6.3.2	Weitere regulative Sequenzen ...	141
6.3.3	Expression in das Periplasma	141
6.3.4	Einschlusskörperchen [<i>Inclusion Bodies</i>]	141
6.3.5	Tag-Sequenzen	142
6.4	Reportergene	142
6.5	Phagen	146
6.6	Phagemide	147
6.7	Shuttle-Vektoren	147

6.8	Künstliche Chromosome: YACs, BACs und PACs	148
6.9	Hefen als Klonierungs- und Expressionssystem	149
6.9.1	Hefe als Modellorganismus	149
6.9.2	Vektoren für Hefe	151
6.9.3	Transformation von Hefe	152
6.10	Pflanzen als Bioreaktoren	152
6.10.1	Die Transformation von Pflanzen .	153
6.10.2	Transiente Transformationsverfahren	155
6.11	Die Transformation von Säugetieren und tierischen Zellkulturen	156
6.11.1	Säugetiere als Modellorganismen .	156
6.11.2	Säuger-Zellkulturen	157
6.11.3	Vektoren für tierische Zellen	158
6.11.4	Transfektion tierischer Zellkulturen	159

7 Elektrophorese und Hybridisierung von Nukleinsäuren

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

8 Fortgeschrittene Klonierung

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

9 Proteinaufreinigung

9.1 Homogenisation	203	9.5 Quantifizierung von Proteinen	217
9.1.1 Proteasen	204	9.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford	217
9.1.2 Phenoloxidasen	206	9.5.2 BCA-Test	219
9.2 Extraktion von Proteinen	207	9.5.3 Welchen Test benutzen?	220
9.2.1 Homogenisationspuffer	207	9.6 Aufreinigungsverfahren für getaggte Proteine aus <i>E. coli</i>	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
9.3 Dialyse und Konzentrierung	211		
9.4 Weitere Aufreinigungsschritte	212		
9.4.1 Chromatographie	213		
9.4.2 Chromatographische Trennprinzipien	215		
9.4.3 <i>Magnetic Beads</i>	216		

10 Gelelektrophorese von Proteinen

10.1 Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	229	10.4 Weitere Elektrophoreseverfahren für Proteine	239
10.2 Die denaturierende SDS-PAGE	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	10.5 Western Blotting	241
10.3 Das Färben der Gele	237	10.6 Massenspektrometrische Verfahren	246

11 Immunbiochemische Methoden

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

12 Fortgeschrittene Verfahren

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

13 Bioinformatik

13.1	Datenbanken	296	13.4	Sequenzsuche mit einer Sequenz (BLAST)	300
13.2	Dateiformate	298	13.5	Bioinformatik zur Planung der Laborarbeit	305
13.3	Sequenzsuche anhand von Stichwörtern (Entrez)	300			

14 Anhang

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