
GEN- TECHNOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN

**Ein Handbuch experimenteller Techniken
und Verfahren**

Herausgegeben von
Rudolf Hagemann

Bearbeitet von
Frank Baldauf, Jörn Belter, Sabine Brantl, Raimund Eck,
Karsten Fritzsch, Monika Hagemann, Holger Junghans, Michael Metzlaff,
Gerhard Saalbach und Kerstin Steiner

Redaktion:
Monika Hagemann



Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · New York · 1990

Inhalt

1.	Kultur von gentechnologisch relevanten Objekten	11
1.1.	Kultivierung von Bakterien	11
1.1.1.	Isolierung von Einzelkolonien	13
1.1.2.	Flüssigkultur	14
1.1.3.	Lagerung	14
1.2.	Vermehrung von Bakteriophagen	14
1.2.1.	Plaquerierung des Bakteriophagen Lambda	16
1.2.2.	Herstellung eines Phagenlysates aus einem einzelnen Plaque	17
1.2.3.	Vermehrung von Lambda-Phagen in Flüssigkultur	17
1.2.4.	Vermehrung von M13-Phagen in Flüssigkultur	18
1.2.5.	Lagerung	18
1.3.	Kultivierung von Hefe	18
	Literatur	20
2.	Isolation von DNA und RNA	21
2.1.	Gesamt-DNA aus pflanzlichen Zellen	22
2.2.	Präparation von Human-DNA	23
2.2.1.	Präparation von DNA aus Blut	24
2.2.2.	Präparation von DNA aus Gewebe und kultivierten Zellen	25
2.3.	Isolation von chromosomaler DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.4.	Isolation von plastidaler DNA aus höheren Pflanzen	28
2.5.	Isolation von mitochondrialer DNA (mtDNA) aus pflanzlichem Gewebe	30
2.6.	Isolation chromosomaler Bakterien-DNA	32
2.7.	Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	34
2.7.1.	Präparationsmethoden im großen Maßstab	34
2.7.2.	Plasmid-Minipräparationsmethoden	39
2.8.	Plasmid-Isolation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
2.8.1.	Isolierung von Hefe-Sphäroplasten	42
2.8.2.	Große Plasmid-Isolation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
2.8.3.	Mini-Präparation von Hefe-Plasmiden zum Transformanten-Screening	45
2.9.	Isolation von Bakteriophagen-DNA (Lambda-DNA)	46
2.9.1.	Infektion	47
2.9.2.	Induktion	48
2.9.3.	Reinigung der Lambda-Phagen	49
2.9.4.	Extraktion der Lambda-DNA	51

2.10.	Isolation von Gesamt-RNA	51
2.10.1.	Isolation von RNA aus <i>Escherichia coli</i>	53
2.10.2.	RNA-Isolation aus pflanzlichen Geweben	54
2.11.	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
2.12.	Isolation von mRNA	58
	Literatur	59
3.	Fragmentierung von DNA	63
3.1.	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen	63
3.1.1.	Vollständige Verdauung von DNA mit Restriktionsenzymen	65
3.1.2.	Partielle Verdauung von DNA mit Restriktionsenzymen	66
3.2.	Erzeugung von Deletionsmutanten durch Einsatz von Exonucleasen in vitro	67
3.2.1.	Nuclease BAL 31	67
3.2.2.	Exonuclease III	70
3.2.3.	Nuclease S 1	72
	Literatur	73
4.	Gelelektrophoretische Auf trennung und Isolation von DNA und RNA	75
4.1.	Auf trennung von DNA in Agarosegelen	75
4.2.	Auf trennung von DNA und RNA in Polyacrylamidgelen	78
4.2.1.	Polyacrylamidgelelektrophorese von DNA	79
4.2.2.	Polyacrylamidgelelektrophorese von RNA	82
4.3.	Isolation von DNA-Fragmenten	86
4.3.1.	Isolation aus PAA-Gelen	87
4.3.2.	Isolation aus Agarosegelen durch Elektrotransfer an DEAE-Zellulose	88
4.3.3.	Isolation aus Agarosegelen durch Elektrotransfer an Dialysemembranen	89
4.3.4.	Isolation aus Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt	90
4.3.5.	Isolation durch Extrusion aus der Gelmatrix	91
4.4.	Trennung von RNA-Molekülen in Agarosegelen	91
	Literatur	92
5.	Verfahren zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA)	95
5.1.	Herstellung doppelsträngiger cDNA unter Einsatz von RNase H	96
5.2.	Herstellung doppelsträngiger cDNA unter Einsatz von S1-Nuclease	98
5.3.	Herstellung doppelsträngiger cDNA unter Einsatz von „Vektor-Primern“	102
5.4.	cDNA-Klonierung 5'-terminaler RNA-Sequenzen	106
5.5.	Möglichkeiten der Klonierung von RNA:DNA-Hybridien	107
5.6.	cDNA-Synthese zur Erzeugung hochmarkierter Hybridisierungssonden	109
5.7.	Polyadenylierung von 3'-poly(A)-RNA	110
5.8.	Reinigung und Fraktionierung von cDNA	111
5.9.	Herstellung von Oligodesoxyribonucleotiden mit randomisierter Sequenz	113
5.10.	Optimierung des 3'-Tailing von cDNA	114
	Literatur	116
6.	Herstellung von rekombinierter DNA	119
6.1.	Ligation von Donor- und Vektor-DNA	119
6.1.1.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	122
6.1.2.	Ligation von DNA-Fragmenten	123

6.2.	Klonierung in Lambda-Vektoren	124
6.2.1.	Präparation der Fremd-DNA	124
6.2.2.	Präparation der Vektor-DNA	124
6.2.3.	Ligation	127
	Literatur	127
7.	Übertragung rekombinanter DNA auf Wirtszellen	129
7.1.	Transformation von Bakterienzellen	129
7.1.1.	Transformation nach MANDEL und HIGA (1970; modifiziert)	129
7.1.2.	Transformation nach HANAHAN (1983; modifiziert)	130
7.2.	Transfektion und in vitro-Verpackung	131
7.2.1.	Transfektion	132
7.2.2.	Präparation der Verpackungsextrakte	133
7.2.3.	In vitro-Verpackung rekombinanter Lambda-DNA	134
7.2.4.	Transfektion mit M13-Phagen	135
7.3.	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	137
	Literatur	138
8.	Verfahren zum Nachweis spezifischer DNA-, RNA- und Protein-Moleküle in Zellen und zur Identifizierung rekombinanter Zellen und Klone	141
8.1.	Mikrobiologische Selektionsmethoden	141
8.1.1.	Inaktivierung von Resistenzmarkern	141
8.1.2.	Selektion unter Verwendung des lac-Operons	144
8.1.3.	Selektion rekombinanter Lambda-Phagen	145
8.2.	Markierung von DNA oder RNA	146
8.2.1.	Nick-Translation	147
8.2.2.	Random-Priming-Markierung	149
8.2.3.	Die 5'-End-Markierung	151
8.2.4.	Die 3'-End-Markierung	155
8.2.5.	In vitro-Transcription	156
8.3.	Hybridisierungs-Verfahren	159
8.3.1.	Southern-Hybridisierung	160
8.3.2.	Northern-Blotting	164
8.3.2.1.	Gelelektrophoretische Trennung von RNA an Agarosegelen	164
8.3.2.2.	Northern-Blotting	168
8.3.2.3.	Hybridisierung	169
8.3.3.	Dot-Blot-Hybridisierung	171
8.3.4.	Koloniehybridisierung	172
8.3.5.	Plaquehybridisierung	174
8.3.6.	Immunoblotanalyse (Western-Blotting)	176
	Literatur	181
9.	Verfahren der DNA-Sequenz-Analyse	185
9.1.	MAXAM-GILBERT-Technik (DNA-Sequenzanalyse durch basenspezifische chemische Spaltung)	185
9.1.1.	DNA-Endmarkierung	186
9.1.2.	DNA-Strangtrennung in Polyacrylamidgelen	186

9.1.3. Die basenspezifische chemische Spaltung	186
9.2. M13-Sequenzierung durch Strangabbruchsynthese nach SANGER	190
9.2.1. Präparation von M13-Einzelstrang-DNA-Template	192
9.2.2. Sequenzierung	193
9.2.3. Gelelektrophorese und Autoradiographie	195
9.3. Plasmid-Sequenzierung	200
9.3.1. Denaturierung der Plasmid-DNA	201
9.3.2. Sequenzierung	201
Literatur	203
10. Methoden zum Nachweis der Genexpression in Bakterien	205
10.1. Nachweis der Expression Plasmid-codierter Gene im Maxizellsystem von <i>Escherichia coli</i>	205
10.2. Untersuchung der Expression Plasmid-codierter Gene im Minizellsystem von <i>Escherichia coli</i>	207
10.3. β -Galactosidase-Assay	210
Literatur	212
11. Anhang	213
11.1. Abkürzungsverzeichnis	213
11.2. Verwendete Bakterienstämme <i>Escherichia coli</i> K 12	214
11.3. Standardpuffer	215
11.4. Elektrophoresepuffer	215
11.5. Restriktionspuffer	215
11.6. Restriktionsstopplösung	216
11.7. Enzymstammlösungen	216
11.8. Präparation organischer Reagenzien	216
11.9. Präparation RNase-freier DNase	217
11.10. Konzentrierung von Nucleinsäuren	218
11.11. Quantifizierung von DNA und RNA	219
11.12. Herstellung von Stammlösungen von NTPs oder dNTPs	219
11.13. DNA-Daten	220
11.14. Kernphysikalische Daten wichtiger Radionuclide	220
11.15. Größe einzelner Restriktionsfragmente aus Lambda- und pBR 322-DNA als Molekulargewichtsmarker	221
11.16. Molekulargewichtsmarker für die Gelelektrophorese von RNA	222
11.17. Antibiotika	222
11.18. Polylinker-Sequenzen mit multiplen Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen ausgewählter Klonierungsvektoren	223
Bücher zu Methoden der Gentechnologie	224
Sachregister	226