

Inhalt

| | | |
|----------|---|----------|
| 1 | Modellorganismen | 1 |
| 1.1 | <i>Escherichia coli</i> | 1 |
| 1.1.1 | Historisches | 3 |
| 1.1.2 | Lebenszyklus | 6 |
| 1.1.3 | Technische Entwicklungen | 8 |
| 1.1.4 | Biologische Fragestellungen | 15 |
| 1.1.5 | Genetische Ressourcen | 15 |
| 1.2 | <i>Bacillus subtilis</i> | 17 |
| 1.2.1 | Historisches | 18 |
| 1.2.2 | Lebenszyklus | 19 |
| 1.2.3 | Technische Entwicklungen | 20 |
| 1.2.4 | Biologische Fragestellungen | 23 |
| 1.2.5 | Genetische Ressourcen | 24 |
| 1.3 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 25 |
| 1.3.1 | Historisches | 26 |
| 1.3.2 | Lebenszyklus | 28 |
| 1.3.3 | Technische Entwicklungen | 30 |
| 1.3.4 | Biologische Fragestellungen | 41 |
| 1.3.5 | Genetische Ressourcen | 42 |
| 1.4 | <i>Neurospora crassa</i> und <i>Sordaria macrospora</i> | 43 |
| 1.4.1 | Historisches | 44 |
| 1.4.2 | Lebenszyklus | 46 |
| 1.4.3 | Technische Entwicklungen | 49 |
| 1.4.4 | Biologische Fragestellungen | 52 |
| 1.4.5 | Genetische Ressourcen | 53 |
| 1.5 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 55 |
| 1.5.1 | Historisches | 55 |
| 1.5.2 | Lebenszyklus | 57 |
| 1.5.3 | Technische Entwicklungen | 58 |
| 1.5.4 | Biologische Fragestellungen | 64 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 1.5.5 | Genetische Ressourcen | 65 |
| 1.6 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 66 |
| 1.6.1 | Historisches | 66 |
| 1.6.2 | Lebenszyklus | 68 |
| 1.6.3 | Technische Entwicklungen | 70 |
| 1.6.4 | Biologische Fragestellungen | 72 |
| 1.6.5 | Genetische Ressourcen | 75 |
| 1.7 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 75 |
| 1.7.1 | Historisches | 76 |
| 1.7.2 | Lebenszyklus | 78 |
| 1.7.3 | Technische Entwicklungen | 84 |
| 1.7.4 | Biologische Fragestellungen | 86 |
| 1.7.5 | Genetische Ressourcen | 86 |
| 2 | Genetische Kreuzungen | 89 |
| 2.1 | <i>Escherichia coli</i> | 90 |
| 2.1.1 | Konjugation von <i>E. coli</i> | 92 |
| 2.2 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 95 |
| 2.2.1 | Zufallssporenanalyse bei <i>S. cerevisiae</i> | 98 |
| 2.3 | <i>Neurospora crassa</i> und <i>Sordaria macrospora</i> | 102 |
| 2.3.1 | Einfaktorkreuzung mit Farbspormutanten | 105 |
| 2.3.2 | Kopplungsanalyse mit transgenen Stämmen | 108 |
| 2.4 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 111 |
| 2.4.1 | Tetradenanalyse | 113 |
| 2.5 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 116 |
| 2.5.1 | Kreuzung von <i>Arabidopsis</i> | 117 |
| 2.5.2 | Kartierung mit CAPS-Markern | 119 |
| 2.6 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 124 |
| 2.6.1 | Balancer-Chromosomen | 127 |
| 2.6.2 | Fliegenzucht | 128 |
| 2.6.3 | Genetische Kreuzungen mit <i>Drosophila</i> | 132 |
| 3 | DNA-Transformation und Charakterisierung transgener Organismen | 141 |
| 3.1 | <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i> | 142 |
| 3.1.1 | Transformation von <i>E. coli</i> nach der Calciumchlorid-Methode | 145 |
| 3.1.2 | Natürliche Kompetenz von <i>B. subtilis</i> | 148 |
| 3.1.3 | Transformation von <i>B. subtilis</i> durch Elektroporation | 151 |

| | | |
|-------|--|------------|
| 3.1.4 | Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien. | 153 |
| 3.1.5 | Isolation von chromosomaler DNA aus <i>Bacillus subtilis</i> . . . | 157 |
| 3.2 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 158 |
| 3.2.1 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit der Gefriermethode. . | 166 |
| 3.2.2 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> durch Elektroporation . . | 171 |
| 3.2.3 | Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation. | 172 |
| 3.3 | <i>Sordaria macrospora</i> | 176 |
| 3.3.1 | Transformation von <i>S. macrospora</i> | 185 |
| 3.3.2 | Isolierung von Gesamt-DNA aus Pilz-Stämmen zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation. | 188 |
| 3.4 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 193 |
| 3.4.1 | Kerntransformation | 198 |
| 3.4.2 | Chloroplastentransformation. | 199 |
| 3.4.3 | Isolierung von Gesamt-DNA. | 201 |
| 3.5 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 203 |
| 3.5.1 | Herstellung stabil transformierter Linien | 205 |
| 3.5.2 | Isolierung von genomischer DNA | 211 |
| 3.5.3 | Transiente Transformation steril angezogener Keimlinge . . | 212 |
| 3.6 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 215 |
| 3.6.1 | Nachweis eines markierten P-Elements | 216 |
| 3.6.2 | Genetische Kartierung einer P-Element-Insertion | 218 |
| 3.6.3 | Isolierung genomischer DNA aus <i>Drosophila</i> | 219 |
| 4 | PCR-Analytik | 221 |
| 4.1 | Das Prinzip der PCR. | 221 |
| 4.2 | Bedeutung der PCR | 224 |
| 4.3 | Polymerasen für die PCR. | 224 |
| 4.4 | PCR-Varianten | 225 |
| 4.4.1 | <i>Nested</i> PCR, lineare PCR, RAPD-PCR | 225 |
| 4.4.2 | Die RT (reverse Transkription)-PCR | 226 |
| 4.4.3 | Die <i>Real-Time</i> -PCR. | 226 |
| 4.5 | Experimententeil | 228 |
| 4.5.1 | PCR-Analyse von transgenen Pilz-Stämmen | 229 |
| 4.5.2 | PCR zum Integrationsnachweis eines Transgens in <i>Arabidopsis thaliana</i> | 235 |
| 4.5.3 | Inverse PCR zur molekularen Kartierung einer P-Element- Insertion bei <i>Drosophila</i> | 236 |
| 4.5.4 | Nachweis eines Transkriptes mittels RT-PCR. | 241 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5 | RNA-Analytik | 247 |
| 5.1 | Transkriptanalysen | 247 |
| 5.1.1 | RNA-Prozessierung bei <i>C. reinhardtii</i> | 248 |
| 5.1.2 | RNA-Isolierung | 250 |
| 5.1.3 | RNA-Gelelektrophorese und Northern Blot | 254 |
| 5.1.4 | Radioaktive Markierung eines Oligonukleotids und Hybridisierung mit filtergebundener RNA | 258 |
| 5.2 | <i>In-situ</i> -Hybridisierungen an <i>Drosophila</i> -Embryonen | 260 |
| 6 | Analyse von Nukleinsäure-Protein-Interaktionen | 265 |
| 6.1 | <i>In-vivo</i> -Analysen | 265 |
| 6.1.1 | Hefe-HYBRID-Analysen | 266 |
| 6.1.2 | Die Wechselwirkung eines Transkriptionsfaktors mit einem Promotorelement | 272 |
| 6.1.3 | ONE-HYBRID-Analysen durch Selektion von Hefe- Transformanten auf Histidin-Prototrophie | 273 |
| 6.1.4 | ONE-HYBRID-Analysen mit Hilfe von LacZ-Tests ausgewählter Hefe-Transformanten | 274 |
| 6.2 | <i>In-vitro</i> -Analysen | 276 |
| 6.2.1 | Nachweis einer Interaktion durch Gelretentionsanalysen .. | 278 |
| 6.2.2 | Herstellung von Hefe-Proteinextrakt für Bindungsanalysen | 280 |
| 6.2.3 | Herstellung einer radioaktiv markierten Ziel-DNA (<i>bait</i>) | 283 |
| 6.2.5 | Gelretentionsanalyse | 286 |
| 7 | Heterologe Genexpression | 291 |
| 7.1 | <i>Escherichia coli</i> | 292 |
| 7.1.1 | Strategien zur Optimierung der Expression in <i>E. coli</i> | 292 |
| 7.1.2 | Heterologe Synthese eukaryotischer Proteine in <i>E. coli</i> | 300 |
| 7.2 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 311 |
| 7.2.1 | Strategien zur Optimierung der Expression in <i>S. cerevisiae</i> .. | 312 |
| 7.2.2 | Heterologe Genexpression in <i>S. cerevisiae</i> und Isolierung Virus-ähnlicher Partikel | 317 |
| 8 | Reportergene | 323 |
| 8.1 | Häufig verwendete Reportergene | 323 |
| 8.1.1 | β -Galactosidase | 324 |
| 8.1.2 | β -Glucuronidase (GUS) | 324 |
| 8.1.3 | Das grün fluoreszierende Protein (GFP) | 325 |
| 8.2 | Expression des <i>egfp</i> -Gens in Hyphenpilzen | 327 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 8.2.1 | Nachweis der GFP-Fluoreszenz in <i>Sordaria macrospora</i> . . . | 328 |
| 8.3 | Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität in <i>Arabidopsis thaliana</i> | 332 |
| 8.3.1 | Histochemischer GUS-Test | 333 |
| 8.3.2 | Photometrischer GUS-Test | 335 |
| 8.4 | X-Gal-Färbungen zur Detektion von Enhancer-trap-Insertionen in <i>Drosophila</i> | 337 |
| 8.4.1 | Nachweis der β -Galactosidase-Expression im Embryo | 339 |
| 8.4.2 | Nachweis der β -Galactosidase-Expression in Imaginalscheiben | 341 |
| 8.4.3 | Nachweis der β -Galactosidase-Expression durch eine Antikörperfärbung | 342 |
| 8.5 | Ektopische Expression von Genen in <i>Drosophila melanogaster</i> . | 344 |
| 8.5.1 | Experimentalstrategien zur Funktionsanalyse von <i>Drosophila</i> -Genen | 344 |
| 8.5.2 | Überexpression und ektopische Expression eines Transgens | 347 |
| 9 | Bioinformatik | 349 |
| 9.1 | Homologie-Suche in Datenbanken | 351 |
| 9.1.1 | Der BLAST-Algorithmus | 353 |
| 9.1.2 | Die Signifikanz von Alignments | 355 |
| 9.1.3 | Wichtige Parameter für die Datenbanksuche | 356 |
| 9.1.4 | Beispiele zur Datenbanksuche | 358 |
| 9.2 | EST- und Gesamtgenom-Datenbanken | 358 |
| 9.2.1 | ESTs (<i>expressed sequence tags</i>) | 358 |
| 9.2.2 | Beispiele zu ESTs | 359 |
| 9.2.3 | Gesamt-Genom-Sequenzen am Beispiel von <i>Neurospora crassa</i> | 360 |
| 9.2.4 | Beispiele zu Arbeiten mit einer Gesamtgenomdatenbank. . | 361 |
| 9.2.5 | Beispiele zur Intron-Identifikation mit Hilfe von ESTs und Gesamtgenomdatenbanken | 363 |
| 9.3 | Unbekannte Sequenz — Was tun? | 365 |
| 9.4 | Phylogenie-Analysen | 367 |
| 9.4.1 | Grundlagen der Stammbaum-Analyse | 368 |
| 9.4.2 | Vorgehen bei der Erstellung eines Stammbaumes | 370 |
| 9.4.3 | Beispiele zur Phylogenie-Analyse | 371 |
| 10 | Grundtechniken der molekularen Genetik | 375 |
| 10.1 | Phenolisieren von DNA | 375 |

| | | |
|--|---|------------|
| 10.2 | Fällungen von Nukleinsäuren | 376 |
| 10.3 | Extraktion von DNA aus Agarosegelen | 378 |
| 10.3.1 | Phenolextraktion aus Agarosegelen | 378 |
| 10.3.2 | <i>Freeze-and-squeeze</i> -Methode. | 379 |
| 10.4 | Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese | 380 |
| 10.5 | Southern Blot | 382 |
| 10.6 | Markierung von Nukleinsäuren | 383 |
| 10.6.1 | <i>Oligo-primed-labelling</i> -Technik | 384 |
| 10.6.2 | 5'-Markierung von Oligonukleotiden | 385 |
| 10.7 | DNA-DNA-Hybridisierung | 386 |
| Referenzen | | 389 |
| | Literatur | 389 |
| | Internetadressen | 396 |
| | Hersteller und Bezugsquellen | 396 |
| | Stammsammlungen | 397 |
| | Internetportale, Datenbanken und Programme. | 397 |
| Glossar | | 401 |
| Abkürzungen und Symbole | | 411 |
| Sachverzeichnis | | 413 |



<http://www.springer.com/978-3-540-21166-2>

Praktikum der Molekulargenetik

Kück, U. (Hrsg.)

2005, XVI, 432 S., Hardcover

ISBN: 978-3-540-21166-2