

Desmond S. T. Nicholl

Gentechnische Methoden

2. Auflage

Aus dem Englischen übersetzt
von Renate FitzRoy und Kurt Beginnen

Inhalt

Vorwort	XI
1. Einführung	1
1.1 Was ist Gentechnik?	1
1.2 Die Grundlagen	3
1.3 Die ersten Schritte	4
1.4 Der Aufbau des Buches	6
Teil I: Grundlagen der Gentechnik	
2r~ ~ Einführung in die Molekularbiologie	11
2.1 Der Fluss der genetischen Information - •	11
2.2 Die Struktur von DNA und RNA	.13
2.3 Die Organisation der Gene .	16
2.3.1 Die Genstruktur von Prokaryoten	18
2.3.2 Die Genstruktur von Eukaryoten	19
2.4 Die Genexpression	21
2.5 Gene und Genome	23
2.5.1 Größe und Komplexität von Genomen	24
2.5.2 Die Organisation von Genomen ,	25
3. Die Arbeit mit Nueleinsäuren	29
3.1 Die Isolierung von DNA oder RNA	29
3.2 Transport und Mengenbestimmung von Nueleinsäuren	31
3.3 Radioaktive Markierung von Nueleinsäuren	32
3.3.1 Die Endmarkierung	33
3.3.2 Die Nicktranslation	33
3.3.3 Markierung durch Primerverlängerung	34
3.4 Hybridisierung von Nueleinsäuren	35
3.5 Die Gelelektrophorese	36
3.6 DNA-Sequenzierung	39

VI Inhalt

3.6.1	Maxam-Gilbert-Sequenzierung (chemische Sequenzierung)	39
3.6.2	Sanger-Coulson-Sequenzierung (enzymatische oder Didesoxy-Sequenzierung)	40
3.6.3	Elektrophorese und Lesen von Sequenzen	43
4.	Das gentechnische Handwerkszeug	45
4.1	Restriktionsenzyme	45
4.1.1	Typ-II-Restriktionsendonucleasen	46
4.1.2	Der Gebrauch von Restriktionsendonucleasen	47
4.1.3	Restriktionskartierung	49
4.2	DNA-modifizierende Enzyme	51
4.2.1	Nucleasen	51
4.2.2	Polymerasen	52
4.2.3	Enzyme, die DNA-Enden verändern	53
4.3	Die DNA-Ligase	54

Teil II: Methoden der Gentechnik

5.	Wirtszellen und Vektoren	59
5.1	Die Wirtszellen _..--	60
5.1.1	Prokaryotische Wirtszellen	60
5.1.2	Eukaryotische Wirtszellen	61
5.2	Plasmidvektoren für <i>E. coli</i>	63
5.2.1	Was sind Plasmide?	63
5.2.2	Standardklonierungsvektoren	64
5.2.3	Ungewöhnlichere Plasmidvektoren	66
5.3	Bakteriophagenvektoren für den Einsatz in <i>E. coli</i>	69
5.3.1	Was sind Bakteriophagen?	69
5.3.2	Vektoren, die sich vom Bakteriophagen X ableiten	73
5.3.3	Vektoren, die sich von M13 ableiten	78
5.4	Weitere Vektoren	79
5.4.1	Vektorkombinationen aus Plasmid und Phage	79
5.4.2	Vektoren für eukaryotische Zellen	80
5.4.3	Künstliche Chromosomen	83
5.5	Das Einschleusen von DNA in Zellen	84
5.5.1	Transformation und Transfektion	84
5.5.2	<i>In vitro</i> -Verpackung von Phagen-DNA	86
5.5.3	Andere Arten des DNA-Transfers	87

6.	Klonierungsstrategien	91
6.1	Welche Strategie ist am besten?	91
6.2	Klonierung mit mRNA als Ausgangsmaterial	94
6.2.1	cDNA-Synthese	95
6.2.2	cDNA-Klonierung in Plasmidvektoren	98
6.2.3	cDNA-Klonierung in Bakteriophagenvektoren	102
6.3	Klonierung genomischer DNA	103
6.3.1	Genombanken	104
6.3.2	Präparation von DNA-Fragmenten für die Klonierung	106
6.3.3	Ligation, Verpackung und Vermehrung von Genbanken	108
6.4	Fortgeschrittene Klonierungsstrategien	111
6.4.1	Synthese und Klonierung von cDNA	111
6.4.2	Expression klonierter DNA-Moleküle	114
6.4.3	Klonierung großer DNA-Fragmente in YAC-Vektoren	116
7.	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	119
7.1	Die (kurze) Geschichte der PCR	121
7.2	Die PCR-Methodik	122
7.2.1	Wesentliche Charakteristika der PCR	123
7.2.2	Die Herstellung von PCR-Primern	125
7.2.3	DNA-Polymerasen für den PCR-Gebrauch	127
7.3	Ausgefallene PCR-Techniken	128
7.3.1	PCR mit mRNA-Matrizen	128
7.3.2	<i>Nested</i> PCR	129
7.3.3	InversePCR	130
7.3.4	RAPD und weitere Akronyme	132
7.4	Die Weiterverarbeitung von PCR-Produkten	134
7.5	Anwendungen der PCR	135
8.	Selektion, Screening und Analyse von Rekombinanten	137
8.1	Genetische Selektions- und Screeningverfahren	138
8.1.1	Der Einsatz von Farbstoffen	138
8.1.2	Insertionsinaktivierung	139
8.1.3	Komplementation definierter Mutationen	142
8.1.4	Andere genetische Selektionsmechanismen	143
8.2	Screening über eine Nucleinsäurehybridisierung	143
8.2.1	Nucleinsäuresonden	144
8.2.2	Screening von Klonbanken	145
8.3	Suche nach exprimierten Genen mit immunologischen Methoden	-- 147
8.4	Untersuchung klonierter Gene	149

VIII Inhalt

8.4.1	Charakterisierung über eine <i>in viro</i> -Translation dermRNA •	149
8.4.2	Restriktionskartierung	151 •
8.4.3	Blotting-Techniken • -	151
8.4.4	DNA-Sequenzierung	154

Teil III: Angewandte Gentechnik

9.	Die Analyse von Genen und Genomen	159
9.1	Untersuchungen zur Genstruktur und -funktion	159
9.1.1	Sequenzanalysen	160
9.1.2	Das Auffinden wichtiger Genelemente	161
9.1.3	Untersuchungen zur Genexpression	163
9.2	Vom Gen zum Genom	166
9.2.1	Die Analyse von Genomen	166
9.2.2	Die Kartierung von Genomen	168
9.3	Genomsequenzierung	172
9.3.1	Sequenzierungstechniken	172
9.3.2	Genomprojekte	173
9.4	Das Humangenomprojekt _____	176
9.4.1	Wessen Genom wird analysiert, und wie viele Gene enthält es?	176
9.4.2	Genetische und physikalische Kartierung des menschlichen Genoms	178
9.4.3	Ableitung und Zusammensetzung der Sequenz	181
9.4.4	Wie geht es weiter?	182
10.	Gentechnik und Biotechnologie	187
10.1	Die Herstellung von Proteinen	188
10.1.1	Native Proteine und Fusionsproteine	188
10.1.2	Hefeexpressionssysteme	191
10.1.3	Das Baculovirus-Expressionssystem	191
10.1.4	Zelllinien von Säugetieren	192
10.2	Proteindesign	193
10.3	Beispiele für biotechnologische Anwendungen der rDNA-Technologie	195
10.3.1	Die Herstellung von Enzymen *- .	195
10.3.2	DerBST-Fall	197
10.3.3	Therapeutika für den Menschen	200

11. Medizinische und gerichtsmedizinische Anwendungen der Gentechnik	207
11.1 Diagnostik und Charakterisierung von Krankheiten	207
11.1.1 Infektionsdiagnostik	208
11.1.2 Vererbungsmuster	209
11.1.3 Genetisch bedingte Krankheiten	212
11.2 Behandlung mithilfe von rDNA-Technologie - Gentherapie -	221
11.2.1 Die Einbringung von Transgenen in Patienten	223
11.2.2 Gentherapie bei Adenosin-desaminase-Mangel	225
11.2.3 Gentherapie bei Cystischer Fibröse	226
11.3 DNA-Profile	227
11.3.1 Die Geschichte des „genetischen Fingerabdrucks“.	228
11.3.2 DNA-Profile im Gerichtssaal	230
11.3.3 Die Genetik enthüllt Rätsel aus der Vergangenheit	233
12. Transgene Pflanzen und Tiere	237
12.1 Transgene Pflanzen	237
12.1.1 Gründe für die Produktion transgener Pflanzen	238
12.1.2 Ti-Plasmide als Vektoren für Pflanzenzellen	239
12.1.3 Die Herstellung transgener Pflanzen	242
12.1.4 Die Technologie im Einsatz	244
12.2 Transgene Tiere	250
12.2.1 Gründe für die Herstellung transgener Tiere	251
12.2.2 Die Herstellung transgener Tiere	251
12.2.3 Anwendungsmöglichkeiten der Transgentechnologie bei Tieren	254
13. Vom Klonieren zum Klonen	261
13.1 Frühe Gedankenspiele und (Experimente)	261
13.1.1 Erste Schritte zum Klonen -	262
13.1.2 Die Totipotenz des Zellkerns	264
13.2 Von Fröschen, Kröten und Rüben	265
13.3 Ein Schaf wird berühmt - der Durchbruch ist gelungen	268
13.4 Über Dolly hinaus	271
14. Schöne neue Welt oder genetischer Albtraum?	275
14.1 Kann Wissenschaft ethisch und moralisch neutral sein?	275
14.2 Zur Ethikdiskussion	276
14.3 Springt Frankenstein's Monster aus der Büchse der Pandora?	279