
HBC.
HOCHSCHULE
BIBERACH
UNIVERSITY
OF APPLIED SCIENCES



universität
uulm

School of
Advanced
Professional
Studies

STUDIENBRIEF

Methoden der Molekularbiologie: Anwendungsbeispiele

Modul 3.2a

Im Studiengang Biopharmazeutisch-Medizintechnische Wissenschaften (Master of Science)

Prof. Dr. Anita Marchfelder

Institut für Molekularbiologie und Biotechnologie der Prokaryoten

Fakultät für Naturwissenschaften, Fachbereich Biologie

Universität Ulm

Modulinhalte

Modulnummer	3.2a
Modultitel	Methoden der Molekularbiologie: Anwendungsbeispiele
Modulkürzel	MMol
Studiengang	Biopharmazeutisch-Medizintechnische Wissenschaften (M.Sc.)
Ort der Veranstaltung	Universität Ulm
Modulverantwortlichkeit	Prof. Dr. Anita Marchfelder
Lehrende	Prof. Dr. Anita Marchfelder
Voraussetzungen	--
Verwertbarkeit	Die Inhalte des Moduls sind für den Masterstudiengang Biopharmazeutisch-Medizintechnische Wissenschaften verwendbar. Das Modul vermittelt Fachwissen im Bereich Methoden der Molekularbiologie und Anwendungsbeispiele.
Semester (empfohlen)	1
Max. Teilnehmerzahl	16
Art der Veranstaltung	<input type="checkbox"/> Präsenzveranstaltung(en) <input type="checkbox"/> Präsenzveranstaltung(en) mit E-Learning-Elementen <input checked="" type="checkbox"/> Präsenzveranstaltung(en) im Labor mit E-Learning-Elementen <input type="checkbox"/> reine E-Learning-Veranstaltung(en)
Veranstaltungssprache	<input checked="" type="checkbox"/> Deutsch, <input type="checkbox"/> Englisch, <input type="checkbox"/> Weitere, nämlich:
ECTS-Credits	3 Credits
Prüfungsform und -umfang	<input checked="" type="checkbox"/> Klausur, <input type="checkbox"/> Referat, <input type="checkbox"/> Kolloquium, <input type="checkbox"/> Posterpräsentation, <input type="checkbox"/> Podiumsdiskussion, <input type="checkbox"/> Mündliche Einzel-/ Gruppenprüfungen, <input type="checkbox"/> Essay, <input type="checkbox"/> Forumsbeitrag, <input type="checkbox"/> Übungen, <input checked="" type="checkbox"/> Wissenschaftspraktische Tätigkeit, <input type="checkbox"/> Bachelor- und Masterarbeit <input type="checkbox"/> Haus-/ Seminararbeit, <input type="checkbox"/> Einzel-/Gruppenpräsentation, <input type="checkbox"/> Portfolio, <input checked="" type="checkbox"/> Protokoll, <input type="checkbox"/> Projektarbeit, <input type="checkbox"/> Lerntagebuch/ Lernjournale <u>Umfang der Prüfung:</u> 60 Min Klausur
Lernziele	Fachkompetenz Studierende, die dieses Modul erfolgreich absolviert haben besitzen einen theoretischen Überblick über alle gängigen Methoden, die in der Molekularbiologie bzw. beim molekularbiologischen Arbeiten zur Anwendung kommen und können diese Methoden sowohl benennen als auch erklären. Sie sind in der Lage, die Funktionsweise dieser Methoden mit

	<p>neuen und unbekannt Substraten nachzuvollziehen und damit ihr Wissen unter zu Hilfenahme von Prozesskenntnissen in neue Situationen zu übertragen. Außerdem kennen Sie Anwendungsbeispiele für die vorgestellten molekularbiologischen Methoden. Darüber hinaus haben sie ein Verständnis für molekulargenetische Analysen, können diese anwenden und beurteilen. Die Studierenden sind in der Lage, aufbauend auf ihrem theoretischen, methodischen Verständnis zu entscheiden, welche Methoden bei welcher wissenschaftlichen Fragestellung und für welche Analysefrage angewendet werden müssen. Darauf aufbauend können sie Lösungen generieren und theoretisch begründen.</p> <p>Methodenkompetenz</p> <p>Die Studierenden verfügen nach dem Modul über die Fähigkeit molekularbiologische Techniken und Analysen grundlegend durchzuführen. Die können dabei einen eigenen Methoden- und Analyseplan aufstellen und diese den Rahmenbedingungen anpassen. Sie sind in der Lage, die Ergebnisse von solchen Analysen schriftlich und verbal zu kommunizieren und zu präsentieren. Des Weiteren können sie molekularbiologische Techniken und Analysen dokumentieren und sind in der Lage, im Sinne einer Versuchsplanung Vor- und Nachbereitungen zu planen und durchzuführen. Die Studierenden gewinnen weiterhin ein Verständnis im Umgang mit diesen Methoden und Analyseverfahren, einerseits hinsichtlich der Empfindsamkeit, andererseits hinsichtlich der Gefahreinschätzung im Umgang mit molekularbiologischem Material.</p> <p>Selbst- und Sozialkompetenz</p> <p>Durch die Struktur des Moduls sind die Studierenden anschließend in der Lage, einen Vortrag selbständig vorzubereiten und darzubieten. Sie haben ihr Fachwissen im Bereich der Molekularbiologie auf Originalarbeiten aus der aktuellen Forschung erweitert, auch im Hinblick auf das spätere Präsentieren eigener Forschungsergebnisse. Damit sind sie vertraut im Umgang mit Primärliteratur, bauen ihre Recherchefähigkeiten auf und reflektieren den Inhalt von Literatur auch kritisch. Die Studierenden haben Erfahrungen bezüglich der aktiven Teilnahme an Diskussionen gesammelt und können sich aktiv in Fachgespräche einbringen.</p>
Lehrinhalte	<p>Grundlegende Methoden der Molekularbiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR und verschiedene DNA-Polymerasen - Analyse von DNA-Fragmenten - Klonieren - „Omics“-Methoden <p>Analyse von RNA</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>In situ</i>-Hybridisierung - Northern Blot-Hybridisierungsverfahren - Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

	<ul style="list-style-type: none">- Circularised RT-PCR (crRT-PCR)- Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)- Gel-Retardations-Experimente (EMSA)- Transkriptomanalysen <p>Generierung und Charakterisierung von rekombinanten Proteinen</p> <ul style="list-style-type: none">- Expressionssysteme- Induktion der Genexpression- Isolation und Reinigung rekombinanter Proteine- Charakterisierung rekombinanter Proteine- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)- Anwendungsbeispiel: Charakterisierung des C2-Toxins von <i>Clostridium botulinum</i> <p>Proteomanalysen</p> <ul style="list-style-type: none">- Proteom- Methoden zur Proteomanalyse <p>Protein-Protein-Interaktionen</p> <ul style="list-style-type: none">- Das Two-Hybrid-System und abgeleitete Protein-Interaktions-Testsysteme- Tandem-Affinitätsreinigung- <i>In vitro</i>-Interaktionsanalyse: GST-Pulldown- Ko-Immunpräzipitation- Far-Western- Oberflächen-Plasmonenresonanzspektroskopie- Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)- Analytische Ultrazentrifugation <p>Sequenzierverfahren</p> <ul style="list-style-type: none">- DNA-Sequenzierung- RNA-Sequenzierung- Protein-Sequenzierung <p>Mutagenese und Genommodifikation</p> <ul style="list-style-type: none">- Konventionelle Mutagenese- Genome Editing (Zinkfinger, TALEN, CRISPR-Cas) <p>Bildgebende Verfahren</p> <ul style="list-style-type: none">- Autoradiographie- Lumineszenz- Fluoreszenz- Biolumineszenz <p>Molekularbiologische Übungen im Labor</p>
--	--

	<ul style="list-style-type: none">- Produktion der <i>Taq</i>-DNA-Polymerase mit rekombinanten <i>E. coli</i>-Zellen- Produktion der <i>Taq</i>-DNA-Polymerase- Anreicherung und Reinigung des Proteins- Überprüfung der Anreicherung- Funktionsnachweis der <i>Taq</i>-DNA-Polymerase
Literatur	<ul style="list-style-type: none">- Mülhard (2013). <i>Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics</i>, 7. Aufl., Springer Spektrum Verlag- Rehm, Letzel (2016). <i>Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics</i>, 7. Aufl., Springer Spektrum Verlag- Nordheim, Knippers (2015). <i>Molekulare Genetik</i>, 10. Aufl., Thieme Verlag- Alberts, Johnson, Lewis, Morgan, Raff, Roberts, Walter (2017). <i>Molekularbiologie der Zelle</i>, 6. Aufl., Garland Publishing (entspricht der englischen Version von 2014, Wiley-Verlag)- Lottspeich, Engels (2012). <i>Bioanalytik</i>, 3. Aufl., Springer Spektrum Verlag- Voet, Voet, Pratt (2010). <i>Lehrbuch der Biochemie</i>, 2. Aufl., Wiley-VCH Verlag- Lewin B.: <i>Essential Genes</i>, 3. Aufl. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ 07458, USA, 2013- Renneberg R.: <i>Biotechnologie für Einsteiger</i>, 4. Aufl., Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2012

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Grundlegende Methoden der Molekularbiologie

- 1.1 PCR und die verschiedenen DNA Polymerasen dafür
- 1.2 Analyse von DNA-Fragmenten
- 1.3 Klonierung
- 1.4 „Omics“-Techniken

Kapitel 2: Analyse von Ribonukleinsäuren

- 2.1 *In situ*-Hybridisierung
- 2.2 Northern Blot-Hybridisierungsverfahren
- 2.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)
- 2.4 Transkriptomanalysen (Transkriptomik)
- 2.5 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)
- 2.6 Circularised RT-PCR (crRT-PCR)
- 2.7 Gel-Retardations-Experimente (EMSA)

Kapitel 3: Generierung und Charakterisierung von rekombinanten Proteinen

- 3.1 Expressionssysteme
- 3.2 Expressionsvektoren
- 3.3 Induktion der Genexpression
- 3.4 Isolation und Reinigung rekombinanter Proteine
- 3.5 Charakterisierung rekombinanter Proteine
- 3.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
- 3.7 Anwendungsbeispiel: Charakterisierung des C2-Toxins von *Clostridium botulinum*

Kapitel 4: Proteomanalysen

- 4.1 Das Proteom
- 4.2 Methoden der Proteomanalyse

Kapitel 5: Protein-Protein-Interaktionen

- 5.1 Das Two-Hybrid-System und abgeleitete Protein-Interaktions-Testsysteme
- 5.2 Tandem-Affinitätsreinigung
- 5.3 *In vitro*-Interaktionsanalyse: GST-Pulldown

5.4 Ko-Immunpräzipitation

5.5 Far-Western

5.6 Oberflächen-Plasmonenresonanzspektroskopie

5.7 Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)

5.8 Analytische Ultrazentrifugation

Kapitel 6: Sequenzierverfahren

6.1 DNA-Sequenzierung

6.2 RNA-Sequenzierung

6.3 Protein-Sequenzierung

Kapitel 7: Mutagenese und Genommodifikation

7.1 Konventionelle Mutagenese

7.2 Genome Editing (ZNF, TALEN, CRISPR-Cas)

Kapitel 8: Bildgebende Verfahren

8.1 Autoradiographie

8.2 Optische Bildgebung

8.3 Lumineszenz

8.4 Fluoreszenz

8.5 Biolumineszenz

Grundlegende Methoden der Molekularbiologie

Autor*innen: **Dr. Karina Haas und Prof. Dr. Bernhard Eikmanns**
überarbeitet von: **Prof. Dr. Anita Marchfelder**

Die in diesem Kapitel dargestellten Grundlagen umfassen Methoden rund um DNA, wie z. B. die Amplifikation und Analyse von DNA-Fragmenten, verschiedene Klonierverfahren, die Erstellung von DNA-Genbanken und die DNA-Analyse mittels der Microarray-Technik. Außerdem wird in diesem Kapitel kurz und tabellarisch auf die sogenannten „Omics-Techniken“ eingegangen. Teilweise werden die hier besprochenen Methoden auch in anderen Modulen des Studiengangs behandelt. Verweise darauf finden Sie an den entsprechenden Stellen, in der Regel am Ende des jeweiligen Abschnittes. Wir möchten darauf hinweisen, dass dieses Kapitel kein Lehrbuch ersetzt und tatsächlich nur die grundlegenden Methoden der Molekularbiologie, wie sie aus dem Bachelorstudiengang bekannt sein sollten, kurz anschnidet.

Für die Vor- und Nachbereitung, Vertiefung und Erweiterung der Inhalte dieses Kapitels sei verwiesen auf die entsprechenden Teile in den Lehrbüchern:

- Mülhard (2013). **Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics**, 7. Aufl., Springer Spektrum Verlag
- Rehm, Letzel (2016). **Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics**, 7. Aufl., Springer Spektrum Verlag
- Nordheim, Knippers (2015). **Molekulare Genetik**, 10. Aufl., Thieme Verlag
- Alberts, Johnson, Lewis, Morgan, Raff, Roberts, Walter (2017). **Molekularbiologie der Zelle**, 6. Aufl., Garland Publishing (entspricht der englischen Version von 2014, Wiley-Verlag)
- Lottspeich, Engels (2012). **Bioanalytik**, 3. Aufl., Springer Spektrum Verlag
- Voet, Voet, Pratt (2010). **Lehrbuch der Biochemie**. 2. Aufl. Wiley-VCH Verlag

sowie auf die im Text zitierten Übersichtsartikel/Reviews (Referenzliste am Ende des Kapitels). Die genannten Lehrbücher sind in der Bibliothek der Universität Ulm vorhanden und ausleihbar.

1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Entdeckung der thermostabilen DNA-Polymerase aus thermophilen Organismen wie z. B. aus *Thermus aquaticus* (**Taq-DNA-Polymerase**) hat eine Methode zur Vervielfältigung von DNA ermöglicht, die aus der Molekularbiologie nicht mehr wegzudenken ist. Die **Polymerase-Kettenreaktion** (auf Englisch **polymerase chain reaction, PCR**) läuft in dreiphasigen, sich wiederholenden Zyklen ab (Abb. 1.1). Zunächst wird die zu vervielfältigende DNA-Vorlage (*template*) durch Erhitzen auf 95 °C in Einzelstränge denaturiert (**Denaturierung**). Durch Abkühlen auf eine Temperatur, die etwas unter der Schmelztemperatur der sogenannten Primer liegt (üblicherweise zwischen 45 °C und 65 °C), können sich diese Oligonukleotide an die komplementäre Stelle anlagern (**Annealing**). Die freie 3'-OH-Gruppe dient der DNA-Polymerase als Ansatzstelle für neue Nukleotide und grenzt den zu amplifizierenden Bereich ein. Über Primer können dem Amplifikat auch noch einige zusätzliche Nukleotide hinzugefügt werden, die in der Ursprungssequenz nicht vorhanden sind, z. B. um zusätzliche Restriktionsschnittstellen einzuführen. Durch Erhitzen auf 70 °C–72 °C, was dem Temperaturoptimum der thermostabilen PCR-DNA-Polymerase entspricht, werden neue komplementäre DNA-Stränge synthetisiert (**Elongation**).

Polymerase-Kettenreaktion

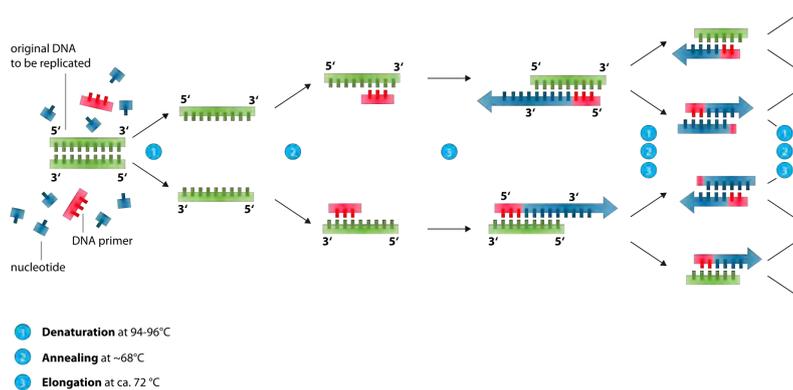


Abbildung 1.1. Typischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion. Die DNA wird in den drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation amplifiziert. (Quellen: siehe Abbildungsverzeichnis)

Die oben erwähnte *Taq*-DNA-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, was in einer relativ hohen Fehlerrate von 10^{-5} resultiert und wodurch auch unspezifische 3'-Poly-Desoxyadenosin-Überhänge entstehen. Dies kann für die Klonierung in Vektoren mit T-Überhängen genutzt werden (vgl. Kapitel 1.3.1). Die thermostabile **Pfu-DNA-Polymerase** aus *Pyrococcus furiosus* besitzt dagegen eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und damit die sogenannte **proofreading-Funktion**. Die Fehlerrate liegt hier bei 10^{-6} und es werden DNA-Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) erzeugt.

Analyse von Desoxyribonukleinsäuren

1

Zu den beiden beschriebenen DNA-Polymerasen existieren mittlerweile zahlreiche weitere Alternativen von verschiedenen Firmen, die aufgrund gentechnischer Modifikation verbesserte Eigenschaften besitzen. Bei gleicher oder ähnlich niedriger Fehlerrate werden höhere Elongationsraten (bis zu 6 Kilobasen (kB)/min) und höhere Prozessivitäten (über 300 Nukleotide (Nt)/DNA-Polymerase-Molekül) erreicht. Es können Fragmente mit bis zu 20 kB Länge und mehr amplifiziert werden und auch GC-reiche DNA-Templates stellen kein großes Problem mehr dar.

Auf die Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion wird auch im Modul „Biochemical Sensors“ (Kapitel 8.3.2) eingegangen.

Webvideo:
PCR-Methode
einfach erklärt

1.2 Analyse von Desoxyribonukleinsäuren

Nachfolgende Abschnitte umfassen Methoden zur Analyse von **Desoxyribonukleinsäuren (DNA)** bzw. DNA-Fragmenten, beginnend bei der Elektrophorese als Trennmethode für DNA-Fragmente bis hin zu spezifischen Nachweismethoden wie dem Southern Blot oder Microarrays.

1.2.1 Elektrophorese

Eine **Elektrophorese** bezeichnet das Wandern von geladenen (biologischen) Molekülen in einem elektrischen Feld. Wird dieses elektrische Feld an eine Gelmatrix angelegt, wandern die Moleküle abhängig von ihrer Größe und Ladung unterschiedlich schnell und können dadurch getrennt werden. Für Nukleinsäuren werden meist **Agarosegele**, aber auch **Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele)** verwendet. Bei Agarosegelen wird die Agarose (0,5–2 %) im Elektrophoresepuffer (Tris-Acetat-EDTA, TAE, oder Tris-Borat-EDTA, TBE) aufgekocht und in eine Vorrichtung gegossen, bei der mit einem Kamm Taschen in die Gelmatrix eingebracht werden. Je nach Dicke und Länge des Gels und je nach verwendetem Puffer erfolgt die Trennung der Proben bei 50–300 Volt. Nach der Trennung können die Nukleinsäuren mit interkalierenden Farbstoffen wie Ethidium-Bromid (EtBr, giftig und mutagen) oder Alternativen wie „SYBR Green“ gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Mit Agarosegelen lassen sich Nukleinsäuren (Desoxyribonukleinsäuren = DNA und Ribonukleinsäure = RNA) von 50 Basenpaaren (Bp) bis 20 kB Länge trennen. Eine bessere Trennung und höhere Auflösung speziell von kleinen Fragmenten (im Extremfall bis auf eine Base) lässt sich mit PAA-Gelen (3,5–20 %) erreichen. Die Nukleinsäuren werden entweder mit EtBr oder mit komplexierten Silber-Ionen (Silberfärbung) sichtbar gemacht. Nachteile von PAA-Gelen sind die umständlichere Handhabung und aufwändigere Elution der Nukleinsäuren aus dem Gel.

Elektrophorese

Die Elektrophorese für die Separation von DNA und RNA wird auch (kurz) im Modul „Bioanalytical Methods“ (Kapitel 1.1–1.4) und im Modul „Biochemical Sensors“ (Kapitel 8.3.3) besprochen.

Webvideo:
Gel-Elektrophorese
einfach erklärt

1.2.2 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

Mit einer **denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)** lassen sich DNA-Fragmente aufgrund von Sequenzunterschieden auftrennen. Dazu werden die Bedingungen durch einen Gradienten von denaturierenden Agenzien wie Formamid (20–80 %) oder Harnstoff (0–80 %) im Gel so angepasst, dass sich die Laufeigenschaften der Fragmente im Gel verändern. Die DNA-Fragmente werden dabei mit fortlaufender Migration im Gel denaturiert (Abb. 1.2). Allerdings findet diese Trennung der einzelnen Stränge nicht sofort komplett statt, sondern es bilden sich je nach Basenpaarabfolge und GC-Gehalt **Schmelzdomänen (melting domains)**, die ihrerseits unterschiedliche Schmelztemperaturen haben. Daraus ergibt sich ein unterschiedliches Laufverhalten im Gel. Zusätzlich kann dieser Effekt bei PCR-Produkten noch verstärkt werden, indem durch Primer bei der Amplifikation eine so genannte **GC-Klammer (GC clamp)** an das 5'-Ende angefügt wird. In diesem Bereich ist die Schmelztemperatur deutlich höher, wodurch an dieser Stelle beide Stränge noch zusammengehalten werden, während in anderen Bereichen die Denaturierung schon eingesetzt hat.

Denaturierende Gradientengelelektrophorese

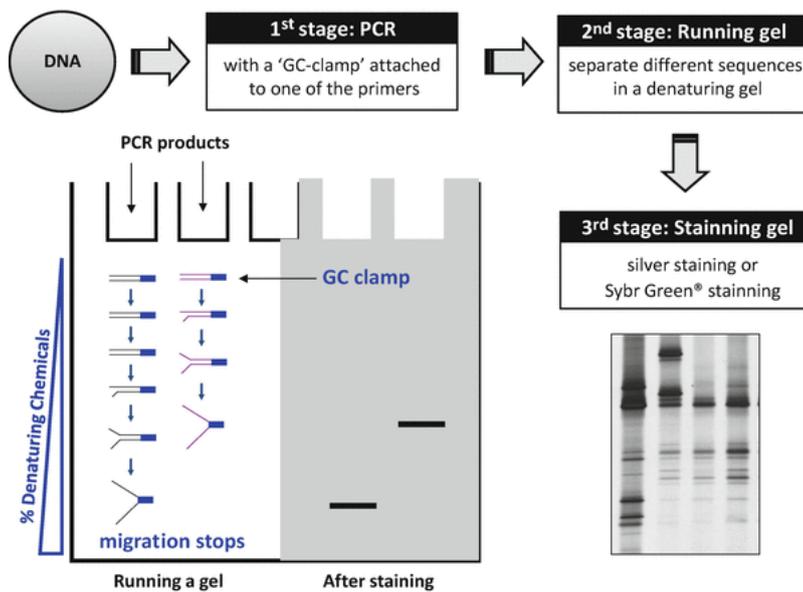


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung einer denaturierenden Gradientengelelektrophorese. DNA wird mittels PCR amplifiziert und dem PCR-Produkt dabei über einen der Primer eine GC-Klammer angehängt. Die Separierung der DNA im denaturierenden Gradientengel erfolgt je nach Auftrennen der Schmelzdomänen. Schließlich wird die DNA durch Silberfärbung oder SYBR Green sichtbar gemacht. (Quellen: siehe Abbildungsverzeichnis)

Anwendung findet die DGGE beispielsweise in der mikrobiellen Ökologie bei der Untersuchung von DNA oder PCR-Produkten von gemischten Populationen, um deren Zusammensetzung zu identifizieren. Dabei werden Fragmente der 16S rRNA-Gene, welche teilweise konserviert sind und in anderen Bereichen wiederum je nach Spezies hochvariable Sequenzen aufweisen, oftmals mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer binden dabei in konservierten Bereichen, die einen variablen Bereich eingrenzen; das Amplifikat sollte dann Spezies-spezifisch variabel und unterscheidbar sein. Durch die DGGE wird somit quasi ein Barcode der Bakterienpopulation erhalten, dessen einzelne Banden sich ausschneiden, zur weiteren Untersuchung klonieren und sequenzieren lassen. Sofern die Komplexität der Proben nicht zu hoch ist, können auf diese Art und Weise selbst sehr kleine Sequenzunterschiede detektiert werden.

1.2.3 Southern Blot-Hybridisierungsverfahren

Zur Untersuchung von Mutationen, die auf Deletionen oder Insertionen zurückzuführen sind, kann die DNA mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen (vgl. Kapitel 1.3.1) restringiert („verdaut“) werden. Daraus resultieren im Vergleich zu einem Ansatz mit Referenz-DNA Fragmente unterschiedlicher Länge, die einen so genannten **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)** darstellen. Diese Fragmente können mittels Gelelektrophorese abhängig von ihrer Länge getrennt werden (Abb. 1.3). Um genau dieses DNA-Fragment, das den RFLP von Interesse enthält, detektieren zu können, muss die DNA auf eine Membran übertragen und immobilisiert werden (Abb. 1.4). Diese Methode wurde nach ihrem Erfinder, Sir Edwin Southern, als Southern Blot bezeichnet.

Southern Blot-Hybridisierungsverfahren

Für einen optimalen DNA-Transfer von einem Gel auf eine Membran wird die DNA zuvor im Gel mittels NaOH oder Ammoniumacetat denaturiert und anschließend neutralisiert. Beim Transfer von Nukleinsäuren aus einem Agarosegel kann z. B. ein **Kapillarblot** oder auch ein **Vakuumblot** (s. Abb. 1.4) verwendet werden. Der Kapillarblot wird in einer mit Transferpuffer befüllten Wanne aufgebaut und über eine Filterpapierbrücke den Kontakt zum Agarosegel hergestellt. Die Membran wird luftblasenfrei auf das Gel gelegt, auf die Membran wird wiederum ein großer Stapel Papiertücher geschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer-Puffer ($10 \times \text{SSC}$) enthält große Mengen an NaCl und Citrat und wird durch Kapillarkräfte in den Papiertuch-Stapel gesogen, wobei die Nukleinsäuren auf die Membran übertragen werden. Der Transfer von Nukleinsäuren aus einem Polyacrylamidgel kann nur per **Elektroblot** erfolgen. Hier wandern die aufgrund von Phosphat negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode (Plus-Pol), in deren Richtung sich die Membran befindet. Heutzutage werden für die Analyse von Nukleinsäuren meist ungeladene oder positiv geladene Nylonmembranen verwendet, weil sie sich mehrmals nacheinander mit verschiedenen Sonden hybridisieren lassen und nicht so leicht brüchig werden wie Membranen aus Nitrocellulose. Die **Immobilisierung der zu untersuchenden DNA** erfolgt bei Nylonmembranen mittels **UV-Crosslink**, d. h. die Nukleinsäuren werden durch Bestrahlung mit hochenergetischem UV-Licht mit der Membran kovalent verbunden.

Kapillarblot und Vakuumblot

Elektroblot

Immobilisierung der DNA

Analyse von Desoxyribonukleinsäuren

1

Nach dem eigentlichen Blot können DNA-Fragmente durch **Hybridisierung mit Digoxigenin- (DIG-) oder radioaktiven Isotopen-markierten DNA-Sonden** detektiert werden (Abb. 1.3). Um Hintergrundsignale zu verringern, sollten vor der Sondenhybridisierung unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Blocken mit fremder (unspezifischer) DNA, z. B. Lachssperma-DNA, abgesättigt werden. Im nächsten Schritt hybridisieren die spezifischen DNA-Sonden-Moleküle (Oligonukleotide oder PCR-Fragmente) an das DNA-Fragment von Interesse. Durch Waschen werden unspezifisch gebundene Sonden entfernt. Sind die Sonden radioaktiv markiert (Oligonukleotid-Sonden: Übertragung einer radioaktiven Phosphatgruppe von γ - ^{32}P -ATP; PCR-Sonden: Einbau radioaktiver Nucleotide wie α - ^{32}P -dCTP), kann direkt ein Autoradiographie-Film aufgelegt werden, der an den entsprechenden Stellen von der Sonde geschwärzt wird. Bei DIG-markierten Sonden (Oligonukleotid-Sonden: 5'- oder 3'-Markierung; PCR-Sonden: inkorporiertes DIG-dUTP) wird das Digoxigenin-Molekül durch einen Antikörper detektiert, der an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Diese kann Dinatrium-3-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan]-4-yl)phenylphosphat (CSPD) oder verwandte chemilumineszente Substrate (z. B. CPD-Star) dephosphorylieren, wobei Licht emittiert wird, das einen Fotofilm an der entsprechenden Stelle der gebundenen Sonde schwärzt.

Hybridisierung

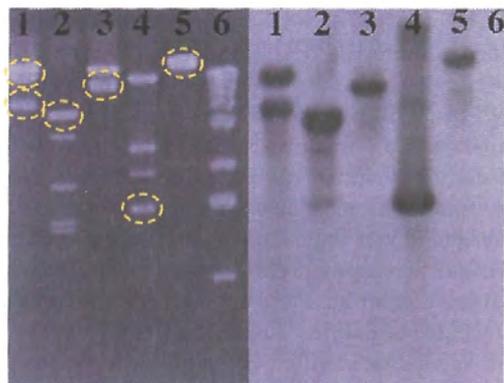


Abbildung 1.3. Southern Blot. Gereinigte DNA-Fragmente eines verdauten Plasmids wurden im Agarosegel nach ihrer Größe getrennt, wobei die Fragmente von Interesse gelb umkreist sind (links). Diese wurden mittels Southern Blot auf eine Membran übertragen und konnten mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden (rechts). (Quellen: siehe Abbildungsverzeichnis)

Die Methode des Southern Blots wird häufig zum Nachweis von genomischen Deletionen angewendet. Hierbei wird genomische DNA von potenziellen Deletionsmutanten und genomische DNA des Wildtyps/Ausgangsstamms als Referenz mit einem Restriktionsenzym verdaut. Dabei sollte das Restriktionsenzym so gewählt werden, dass sich laut Genkarten ein RFLP zwischen den einzelnen Stämmen ergibt, der

Webvideo:
Southern Blot

Beratung und Kontakt

Ansprechpartner

School of Advanced Professional Studies
saps@uni-ulm.de
www.uni-ulm.de/saps

Tel +49 731/50-32401
Fax +49 731/50-32409

Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Tina Seufert



Studiengangskoordinator

Studiengang Biopharmazeutisch-Medizintechnische Wissenschaften: Lena Harsch (bm-wiss@hochschule-bc.de)

Postanschrift

Universität Ulm
School of Advanced Professional Studies
Oberberghof 7
89081 Ulm

Der Zertifikatskurs „Methoden der Molekularbiologie: Anwendungsbeispiele“ wurde entwickelt im Projekt CrossOver, das aus Mitteln des Ministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg und vom Ministerium für Soziales und Integration Baden-Württemberg aus Mitteln des Europäischen Sozialfonds gefördert wird (Förderkennzeichen: 696606; Projektende: 31.12.2020).

