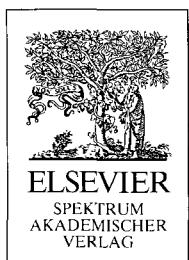


Friedrich Lottspeich Joachim W. Engels (Hrsg.)

Bioanalytik

2. Auflage



Spektrum
AKADEMISCHER VERLAG

Inhalt

Vorwort	V				
Autoren	XXI				
1 Bioanalytik – eine eigenständige Wissenschaft	1	4	Enzymatische Aktivitätstests	47	
1.1 Paradigmenwechsel in der Biochemie: Von der Proteinchemie zur Systembiologie	2	4.1	Grundlagen der Enzymkinetik	47	
1.1.1 Klassische Strategie	2	4.2	Maßeinheiten der Enzymaktivität	48	
1.1.2 Holistische Strategie	2	4.3	Messtechniken	49	
1.2 Methoden begründen Fortschritt	3	4.3.1	Photometrische Aktivitätstests	49	
1.2.1 Proteinanalytik	5	4.3.2	Kontinuierliche und diskontinuierliche Tests	50	
1.2.2 Molekularbiologie	6	4.4	Einflussgrößen auf die Enzymaktivität	51	
1.2.3 Bioinformatik	7	4.4.1	pH-Wert und Puffersystem	51	
1.2.4 Funktionsanalyse	7	4.4.2	Temperatur	52	
		4.4.3	Auswahl des Substrats	52	
		4.4.4	Substratkonzentration	53	
		4.4.5	Enzymkonzentration	55	
		4.4.6	Enzymstabilität	56	
		4.5	Aufbau eines Testsystems	56	
		4.6	Störquellen und Fehlermöglichkeiten	59	
			Weiterführende Literatur	60	
Teil I Proteinanalytik					
2 Proteinreinigung	13	5	Immunologische Techniken	61	
2.1 Eigenschaften von Proteinen	13	5.1	Antikörper	61	
2.2 Proteinlokalisation und Reinigungsstrategie	16	5.1.1	Antikörper und Immunabwehr	61	
2.3 Homogenisierung und Zellaufschluss	17	5.1.2	Antikörper als Reagens	62	
2.4 Die Fällung	20	5.1.3	Eigenschaften von Antikörpern	62	
2.5 Zentrifugation	21	5.1.4	Funktionelle Struktur von IgG	64	
2.5.1 Grundlagen	22	5.1.5	Antigenbindungsstelle (Haftstelle)	65	
2.5.2 Zentrifugationstechniken	24	5.1.6	Handhabung von Antikörpern	65	
2.6 Abtrennung von Salzen oder hydrophilen Verunreinigungen	26	5.2	Antigene	66	
2.7 Konzentrierung	28	5.3	Antigen-Antikörper-Reaktion	68	
2.8 Detergenzien und ihre Entfernung	29	5.3.1	Immunagglutination	69	
2.8.1 Eigenschaften von Detergenzien	29	5.3.2	Immunpräzipitation	70	
2.8.2 Entfernen von Detergenzien	32	5.3.3	Immunbindung	82	
2.9 Probenvorbereitung für die Proteomanalyse	33	5.4	Komplementfixation	93	
Weiterführende Literatur	33	5.5	Methoden der zellulären Immunologie	94	
		5.6	Alteration biologischer Funktionen	96	
		5.7	Herstellung von Antikörpern	97	
		5.7.1	Arten von Antikörpern	97	
3 Proteinbestimmungen	35	5.7.2	Neue Antikörpertechniken (<i>antibody engineering</i>)	98	
3.1 Quantitative Bestimmung durch Färbetests	37		Weiterführende Literatur	101	
3.1.1 Biuret-Assay	38				
3.1.2 Lowry-Assay	38				
3.1.3 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	39				
3.1.4 Bradford-Assay	40	6	Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen	103	
3.2 Spektroskopische Methoden	41	6.1	Chemische Modifikation funktioneller Gruppen von Proteinen	104	
3.2.1 Messungen im UV-Bereich	41	6.2	Modifizierung als Mittel zur Einführung von Reportergruppen	112	
3.2.2 Fluoreszenzmethode	43	6.2.1	Untersuchungen an natürlich vorkommenden Proteinen	112	
3.3 Radioaktive Markierung von Peptiden und Proteinen	44				
3.3.1 Iodierungen	46				
Weiterführende Literatur	46				

6.2.2	Untersuchungen an überexprimierten oder mutierten Proteinen	116	9.5.1	Proteasen	206
6.3	Protein- <i>cross linking</i> zur Analyse von Proteinwechselwirkungen	117	9.5.2	Proteolysebedingungen	210
6.3.1	Bifunktionelle Reagenzien	118	9.6	Chemische Fragmentierung	211
6.3.2	Photoaffinitätsmarkierung	118	9.7	Ausblick	214
	Weiterführende Literatur	127		Weiterführende Literatur	214
7	Spektroskopie	129	10	Chromatographische Trennmethoden	215
7.1	Physikalische Prinzipien und Messtechniken	130	10.1	Prinzip der Chromatographie	215
7.1.1	Physikalische Grundlagen optischer spektroskopischer Messmethoden	130	10.1.1	Grundbegriffe	216
7.1.2	Wechselwirkung Licht-Materie	130	10.1.2	Instrumentierung	216
7.1.3	Absorptionsmessungen	138	10.1.3	Stationäre Phasen	216
7.1.4	Photometer	141	10.1.4	Detektion der chromatographischen Trennung	217
7.1.5	Kinetische spektroskopische Untersuchungen	142	10.2	Chromatographische Theorie	218
7.2	UV/VIS/NIR-Spektroskopie	144	10.3	Reinigungsstrategie für Peptide und Proteine	220
7.2.1	Grundlagen	144	10.4	Ionenaustauschchromatographie	221
7.2.2	Chromoproteine	145	10.5	Hydroxyapatitchromatographie	223
7.3	IR-Spektroskopie	152	10.6	Reversed phase-Chromatographie	224
7.3.1	Grundlagen	152	10.7	Hydrophobe Interaktionschromatographie	227
7.3.2	Molekülschwingungen	153	10.8	Affinitätschromatographie	228
7.3.3	Messtechniken	155	10.9	Ausschlusschromatographie	231
7.3.4	Infrarotspektroskopie von Proteinen	158		Weiterführende Literatur	233
7.4	Raman-Spektroskopie	160	11	Elektrophoretische Verfahren	235
7.4.1	Grundlagen	160	11.1	Geschichtlicher Überblick	235
7.4.2	Raman-Experimente	161	11.2	Theoretische Grundlagen	237
7.4.3	Resonanz-Raman-Spektroskopie	163	11.3	Instrumentierung und Durchführung von Gelelektrophoresen	240
7.5	Fluoreszenzspektroskopie	164	11.3.1	Probenvorbereitung	242
7.5.1	Grundlagen	164	11.3.2	Gelmedien für Elektrophoresen	242
7.5.2	Fluoreszenzspektren als Emissionsspektren und als Aktionsspektren	166	11.3.3	Nachweis und Quantifizierung der getrennten Proteine	244
7.5.3	Fluoreszenzuntersuchungen mit intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren	168	11.3.4	Zonenelektrophorese	245
7.6	Methoden mit polarisiertem Licht	169	11.3.5	Porengradientenengele	247
7.6.1	Lineardichroismus	169	11.3.6	Puffersysteme	248
7.6.2	Optische Rotationsdispersion und Circulardichroismus	172	11.3.7	Disk-Elektrophorese	248
	Weiterführende Literatur	174	11.3.8	Saure Nativelektrophorese	249
8	Lichtmikroskopische Verfahren – Imaging	175	11.3.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	249
8.1	Wegbereiter der Mikroskopie – von einfachen Linsen zu hoch auflösenden Mikroskopen	175	11.3.10	Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese	251
8.2	Moderne Anwendungsbereiche	176	11.3.11	Isoelektrische Fokussierung	251
8.3	Physikalische Grundlagen	177	11.4	Präparative Verfahren	255
8.4	Nachweismethoden	183	11.4.1	Elektroelution aus Gelen	255
8.5	Präparationsmethoden	190	11.4.2	Präparative Zonenelektrophorese	256
8.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	193	11.4.3	Präparative isoelektrische Fokussierung	257
8.7	<i>Live cell imaging</i>	194	11.5	Trägerfreie Elektrophorese	258
	Weiterführende Literatur	199	11.6	Hoch auflösende zweidimensionale Elektrophorese	258
	Internetseiten	200	11.6.1	Probenvorbereitung	260
9	Spaltung von Proteinen	201	11.6.2	Vorfraktionierung	260
9.1	Proteolytische Enzyme	201	11.6.3	Erste Dimension: IEF in IPG-Streifen	261
9.2	Strategie	202	11.6.4	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	261
9.3	Denaturierung	203	11.6.5	Detektion und Identifizierung der Proteine	262
9.4	Spaltung von Disulfidbrücken und Alkylierung	203	11.6.6	Differenzgelelektrophorese	263
9.5	Enzymatische Fragmentierung	205	11.7	Elektroblotting	264
			11.7.1	Blotsysteme	265
			11.7.2	Der Blotvorgang	266
			11.7.3	Die Wahl der geeigneten Blotmembran	267
				Weiterführende Literatur	268

12	Kapillarelektrophorese	269	14.2.2	Peptidmengen und Qualität des chemischen Abbaus	326
12.1	Geschichtlicher Überblick	269	14.2.3	Abbau der Polypeptide mit Carboxypeptidasen	327
12.2	Prinzip der Kapillarelektrophorese	270		Weiterführende Literatur	328
12.3	Gerätetechnik	270			
12.3.1	Injectio[n] der Proben	271			
12.3.2	Detektion	272			
12.4	Theoretische Grundlagen	274	15	Massenspektrometrie	329
12.4.1	Elektroosmotischer Fluss (EOF)	274	15.1	Matrixassistierte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	330
12.4.2	Joulesche Wärmeentwicklung	275	15.1.1	Ionisierungsprinzip	330
12.5	Trennprinzipien in der Kapillarelektrophorese	276	15.1.2	Massenanalyse der Ionen mit dem Flugzeit-massenspektrometer	333
12.6	Kapillarzonelektrophorese (CZE)	276	15.1.3	Detektion der Ionen	337
12.6.1	Elektrodispersion	278	15.1.4	Molekulargewichtsbestimmung mit MALDI	338
12.6.2	Auflösung	279	15.1.5	Sequenzierung von Peptiden mit MALDI	344
12.6.3	Trennungsoptimierung	279	15.2	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	351
12.7	Kapillaraffinitätselektrophorese (CAE)	281	15.2.1	Ionisierungsprinzip	352
12.8	Micellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC)	283	15.2.2	ESI-Quelle und Interface	355
12.8.1	Theoretische Grundlagen	283	15.2.3	Massenanalyse der Ionen mit dem Quadrupol-massenspektrometer	357
12.8.2	Chirale MEKC	286	15.2.4	Massenanalyse mit der Ionenfalle	359
12.9	Kapillargelektrophorese (CGE)	287	15.2.5	Molekulargewichtsbestimmung mit ESI-MS	361
12.10	Isoelektrische Fokussierung (CIEF)	288	15.2.6	Strukturanalyse mit ESI-MS	366
12.10.1	Einschrittfokussierung	290	15.2.7	Sequenzierung von Peptiden mit CID	368
12.10.2	Fokussierung mit Druck-/Spannungs-mobilisierung	290	15.3	Relative quantitative Analyse von Proteinen mit MS	372
12.10.3	Fokussierung mit chemischer Mobilisierung	291		Weiterführende Literatur	
12.11	Isotachophorese (ITP)	291			
12.12	Spezielle Techniken	293	16	Protein-Protein-Wechselwirkungen: das two-hybrid-System und andere Methoden	373
12.12.1	Online-Probenkonzentrierung	293	16.1	Das two-hybrid-System	373
12.12.2	CE-MS-Kopplung	294	16.1.1	Das Konzept des two-hybrid-Systems	373
12.12.3	Fraktionierung	295	16.1.2	Die Elemente des two-hybrid-Systems	375
12.13	Ausblick	296	16.1.3	Konstruktion des Köderproteins	376
	Weiterführende Literatur	297	16.1.4	Welche Köderproteine eignen sich für das two-hybrid-System?	379
13	Aminosäureanalyse	299	16.1.5	Aktivator-Fusionsprotein und cDNA-Bibliotheken	379
13.1	Probenvorbereitung	300	16.1.6	Durchführung des two-hybrid-Screenings	380
13.1.1	Saure Hydrolyse	300	16.1.7	Modifizierte Anwendungen und Weiterentwicklungen der two-hybrid-Technologie	384
13.1.2	Alkalische Hydrolyse	301	16.1.8	Biochemische und funktionale Analyse der Interaktoren	386
13.1.3	Enzymatische Hydrolyse	301	16.2	<i>In vitro</i> -Interaktionsanalyse: GST-pulldown	387
13.2	Freie Aminosäuren	301	16.3	Ko-Immunpräzipitation	388
13.3	Derivatisierung	302	16.4	Far-Western	389
13.3.1	Nachsäulenderivatisierung	302	16.5	Plasmonenspektroskopie (<i>surface plasmon resonance</i>)	390
13.3.2	Vorsäulenderivatisierung	304	16.6	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	392
13.4	Datenauswertung und Beurteilung der Analysen	308	16.6.1	Interaktions- und Strukturanalyse mittels FRET	392
	Weiterführende Literatur	309	16.6.2	Experimentelle Bestimmung der FRET-Effizienz	393
14	Proteinsequenzanalyse	311	16.6.3	Methoden der FRET-Messung	394
14.1	<i>N</i> -terminale Sequenzanalyse:		16.6.4	Verwendete Sonden	396
	Der Edman-Abbau	313	16.7	Analytische Ultrazentrifugation	397
14.1.1	Reaktionen des Edman-Abbaus	313	16.7.1	Instrumentelle Grundlagen	397
14.1.2	Identifizierung der Aminosäuren	315			
14.1.3	Die Qualität des Edman-Abbaus: Die repetitive Ausbeute	317			
14.1.4	Instrumentierung	317			
14.1.5	Probleme der Aminosäuresequenzanalyse	320			
14.1.6	Stand der Technik	324			
14.2	C-terminale Sequenzanalyse	324			
14.2.1	Chemische Abbaumethoden	324			

16.7.2	Grundtypen von Experimenten	398
16.7.3	Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente	399
16.7.4	Sedimentationsgleichgewichtsexperimente	401
16.8	Was tun mit den gefundenen Interaktionen?	403
	Weiterführende Literatur	404

Teil II 3D-Strukturaufklärung

17	Magnetische Resonanzspektroskopie von Biomolekülen	407
17.1	NMR-Spektroskopie von Biomolekülen	407
17.1.1	Theorie der NMR-Spektroskopie	408
17.1.2	Eindimensionale NMR-Spektroskopie	412
17.1.3	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie	417
17.1.4	Dreidimensionale NMR-Spektroskopie	423
17.1.5	Signalzuordnung	428
17.1.6	Bestimmung der Proteinstruktur	433
17.1.7	Proteinstrukturen und mehr – ein Ausblick	440
17.2	EPR-Spektroskopie an biologischen Systemen	441
17.2.1	Grundlagen der EPR-Spektroskopie	442
17.2.2	cw-EPR-Spektroskopie	444
17.2.3	g-Wert	444
17.2.4	Elektronenspin-Kernspin-Kopplung (Hyperfeinkopplung)	444
17.2.5	g- und Hyperfeinanisotropie	445
17.2.6	Elektronenspin-Elektronenspin-Kopplung	448
17.2.7	Gepulste EPR-Experimente	449
17.2.8	Weitere Anwendungsbeispiele für EPR	455
17.2.9	Generelle Bemerkungen zur Aussagekraft von EPR-Spektren	457
17.2.10	Vergleich EPR/NMR	458
	Weiterführende Literatur	459

18	Elektronenmikroskopie	461
18.1	Transmissionselektronenmikroskopie – Instrumentation	462
18.2	Präparationsverfahren	464
18.2.1	Negativkontrastierung	464
18.2.2	Bedämpfung mit Schwermetallen	466
18.2.3	Einbettung in Eis	467
18.3	Abbildung von Molekülen im Elektronenmikroskop	468
18.3.1	Auflösung eines Transmissionselektronenmikroskops	468
18.3.2	Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Objekt	469
18.3.3	Kryoelektronenmikroskopie	473
18.4	Bildanalyse, Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion	475
18.4.1	Digitalisierung	475
18.4.2	Fourier-Transformation	475
18.4.3	Analyse der Kontrastübertragungsfunktion und der Kristallinität des Objekts	478
18.4.4	Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses	480
18.4.5	Korrespondenzanalyse und Klassifizierung	484
18.4.6	Dreidimensionale Elektronenmikroskopie	486
18.5	Elektronentomographie individueller Objekte	490

18.5.1	Kryoelektronentomographie intakter Zellen	490
18.5.2	Identifizierung von Proteinkomplexen in Zelltomogrammen	492
18.5.3	Perspektiven der Kryoelektronenmikroskopie	493
	Weiterführende Literatur	494

19	Rasterkraftmikroskopie	495
19.1	Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops	496
19.2	Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe	497
19.3	Präparationsverfahren	498
19.4	Abilden biologischer Makromoleküle	499
19.5	Kraftspektroskopie einzelner Moleküle	501
	Weiterführende Literatur	502
20	Röntgenstrukturanalyse	503
20.1	Kristallisation	503
20.2	Kristalle und Röntgenbeugung	505
20.3	Das Phasenproblem	508
20.3.1	Isomorpher Ersatz: <i>single isomorphous replacement</i> (SIR) und <i>multiple isomorphous replacement</i> (MIR)	508
20.3.2	Multiple anomale Dispersion (MAD)	510
20.3.3	Molekularer Ersatz (MR)	511
20.4	Modellbau und Strukturverfeinerung	511
	Weiterführende Literatur	514

Teil III Spezielle Stoffgruppen

21	Analytik synthetischer Peptide	517
21.1	Prinzip der Peptidsynthese	517
21.2	Untersuchung der Reinheit synthetischer Peptide	522
21.3	Charakterisierung und Identität synthetischer Peptide	524
21.4	Charakterisierung der Struktur synthetischer Peptide	528
21.5	Analytik von Peptidbibliotheken	529
	Weiterführende Literatur	532
22	Kohlenhydratanalytik	533
22.1	Allgemeine stereochemische Grundlagen	534
22.1.1	Die Reihe der D-Zucker	534
22.1.2	Stereochemie der D-Glucose	535
22.1.3	Wichtige Monosaccharidbausteine	536
22.1.4	Die Reihe der L-Zucker	537
22.1.5	Die glykosidische Bindung	538
22.2	Die Proteinglykosylierung	541
22.2.1	Aufbau der N-Glykane	542
22.2.2	Der Aufbau der O-Glykane	543
22.2.3	Glykoanalytik am intakten Glykoprotein	544
22.3.1	Ist mein Protein glykosyliert?	544
22.3.2	Charakterisierung der Glykosylierung mittels Lectinen	547
22.3.3	Isoelektrische Fokussierung	548
22.3.4	Analyse der neutralen Monosaccharidkomponenten	549
22.3.5	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)	551

		Inhalt	XV
22.4	Freisetzung und Isolierung des <i>N</i> -Glykanpools	552	
22.4.1	Enzymatische Freisetzung mittels PNGase F	552	
22.4.2	Enzymatische Freisetzung mittels Endoglykosidasen	553	
22.4.3	Chemische Freisetzung mittels Hydrazinolyse	553	
22.5	Isolierung einzelner <i>N</i> -Glykane	553	
22.6	Charakterisierung der Glykane im Glykanpool	555	
22.6.1	Mapping nicht derivatisierter <i>N</i> -Glykane	555	
22.6.2	Kartierung derivatisierter <i>N</i> -Glykane	559	
22.6.3	Kartierung mittels Kapillarelektrophorese (CE)	562	
22.7	Glykoanalytik isolierter <i>N</i> -Glykane (Strukturanalyse)	564	
22.7.1	Kompositionsanalyse	564	
22.7.2	Methylierungsanalyse	566	
22.7.3	Sequenzierung in Verbindung mit Gelfiltration	568	
22.7.4	Massenspektrometrie (FAB-MS, MALDI-MS, ESI-MS)	569	
22.7.5	¹ H-NMR-Spektroskopie	571	
22.8	Genom, Proteom, Glykom	578	
22.9	Schlussbetrachtung	579	
	Weiterführende Literatur	580	
23	Lipidanalytik	581	
23.1	Aufbau und Einteilung von Lipiden	581	
23.2	Extraktion von Lipiden aus biologischem Material	583	
23.2.1	Flüssigphasenextraktion	583	
23.2.2	Festphasenextraktion	584	
23.3	Methoden der Lipidanalytik	585	
23.3.1	Chromatographische Methoden	585	
23.3.2	Massenspektrometrie	590	
23.3.3	Immunoassays	591	
23.3.4	Weitere Methoden in der Lipidanalytik	591	
23.3.5	Online-Kopplung verschiedener Analyse-systeme	593	
23.4	Analytik ausgewählter Lipidklassen	595	
23.4.1	Gesamtlipidextrakte	595	
23.4.2	Fettsäuren	595	
23.4.3	Unpolare Neutrallipide	597	
23.4.4	Polare Esterlipide	599	
23.4.5	Lipidhormone und intrazelluläre Signaltransduktoren	602	
23.5	Lipidvitamine	605	
23.6	Lipidomanalytik	608	
23.6	Ausblick	610	
	Weiterführende Literatur	611	
24	Analytik posttranslationaler Modifikationen: Phosphorylierung und Acetylierung von Proteinen	613	
24.1	Funktionelle Bedeutung von Phosphorylierung und Acetylierung	613	
24.1.1	Phosphorylierung	613	
24.1.2	Acetylierung	614	
24.2	Strategie zur Analyse der posttranslationalen Phosphorylierung und Acetylierung von Proteinen und Peptiden	615	
24.3	Analyse posttranslational modifizierter Proteine	617	
24.3.1	Trennung und Anreicherung phosphorylierter und acetylierter Proteine	617	
24.3.2	Detektion phosphorylierter und acetylierter Proteine mittels enzymatischer, radioaktiver, immunchemischer und fluoreszenzbasierender Methoden	618	
24.3.3	Detektion phosphorylierter und acetylierter Proteine mittels Massenspektrometrie	619	
24.4	Analyse posttranslational modifizierter Peptide	620	
24.4.1	Trennung und Anreicherung phosphorylierter und acetylierter Peptide	620	
24.4.2	Detektion phosphorylierter und acetylierter Peptide mittels Massenspektrometrie	622	
24.5	Lokalisation und Identifizierung posttranslational modifizierter Aminosäuren	624	
24.5.1	Lokalisation phosphorylierter und acetylierter Aminosäuren mittels Edman-Sequenzierung	625	
24.5.2	Lokalisation phosphorylierter und acetylierter Aminosäuren mittels massenspektrometrischer Fragmentionen-Analyse	626	
24.6	Quantitative Analyse phosphorylierter und acetylierter Aminosäuren	628	
24.7	Zukunft der Analytik posttranslationaler Modifikationen	629	
	Weiterführende Literatur	630	
			Teil IV Nucleinsäureanalytik
25	Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren	633	
25.1	Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	633	
25.1.1	Phenolextraktion	633	
25.1.2	Gelfiltration	634	
25.1.3	Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren	635	
25.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	636	
25.2	Isolierung genomischer DNA	637	
25.3	Isolierung niedermolekularer DNA	639	
25.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	639	
25.3.2	Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryotischen Zellen	644	
25.4	Isolierung viraler DNA	644	
25.4.1	Isolierung von Phagen-DNA	644	
25.4.2	Isolierung von DNA aus eukaryotischen Viren	645	
25.5	Isolierung einzelsträngiger DNA	646	
25.5.1	Isolierung von M13-DNA	646	
25.5.2	Trennung von einzel- und doppelsträngiger DNA	647	
25.6	Isolierung von RNA	647	
25.6.1	Isolierung von cytoplasmatischer RNA	648	
25.6.2	Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA	649	
25.7	Isolierung von Nucleinsäuren unter Verwendung von magnetischen Partikeln	650	
	Weiterführende Literatur	651	

26	Aufarbeitung von Nucleinsäuren	653	27.5	Amplifikationssysteme	736
26.1	Restriktionsanalyse	653	27.5.1	Targetamplifikation	737
26.1.1	Prinzip der Restriktionsanalyse	653	27.5.2	Targetspezifische Signalamplifikation	738
26.1.2	Historischer Überblick	654	27.5.3	Signalamplifikation	738
26.1.3	Restriktionsenzyme	654		Weiterführende Literatur	740
26.1.4	Der Restriktionsansatz und seine Anwendungen	657	28	Polymerasekettenreaktion	743
26.2	Elektrophorese	663	28.1	Möglichkeiten der PCR	744
26.2.1	Gelelektrophorese von DNA	664	28.2	Grundlagen	746
26.2.2	Gelelektrophorese von RNA	670	28.2.1	Instrumentierung	746
26.2.3	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	672	28.2.2	Amplifikation von DNA	746
26.2.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	675	28.2.3	Amplifikation von RNA (RT-PCR)	749
26.2.5	Kapillargelelektrophorese	678	28.2.4	Optimierung der Reaktion	752
26.3	Färbemethoden	679	28.2.5	Quantitative PCR	753
26.3.1	Fluoreszenzfarbstoffe	679	28.3	Spezielle PCR-Techniken	755
26.3.2	Silberfärbung	681	28.3.1	<i>Nested</i> PCR	755
26.4	Nucleinsäureblotting	681	28.3.2	Asymmetrische PCR	756
26.4.1	Blottingverfahren	681	28.3.3	Einsatz von degenerierten Primern	756
26.4.2	Wahl der Membranen	682	28.3.4	Multiplex-PCR	757
26.4.3	Southern-Blotting	683	28.3.5	<i>Cycle sequencing</i>	757
26.4.4	Northern-Blotting	685	28.3.6	<i>In vitro</i> -Mutagenese	758
26.4.5	Dot- und Slot-Blotting	686	28.3.7	Homogene PCR-Detektionsverfahren	760
26.4.6	Kolonie- und Plaquehybridisierungen	687	28.3.8	Quantitative Amplifikationsverfahren	760
26.5	Fragmentisolierung	688	28.3.9	<i>In situ</i> -PCR	760
26.5.1	Reinigung über Glas-beads	688	28.3.10	Weitere Verfahren	761
26.5.2	Reinigung über Gelfiltrations- oder <i>reversed phase</i> -Säulen	689	28.4	Kontaminationsproblematik	761
26.5.3	Elektroelution	689	28.4.1	Vermeidung von Kontaminationen	762
26.5.4	Andere Methoden	690	28.4.2	Dekontamination	763
26.6	LC-MS von Oligonucleotiden	690	28.5	Anwendungen	764
26.6.1	Prinzip der Synthese von Oligonucleotiden	690	28.5.1	Nachweis von Infektionskrankheiten	764
26.6.2	Untersuchung der Reinheit und Charakterisierung von Oligonucleotiden	693	28.5.2	Nachweis von genetischen Defekten	765
26.6.3	Massenspektrometrische Untersuchung von Oligonucleotiden	694	28.5.3	Humangenomprojekt	768
26.6.4	IP-RP-HPLC-MS-Untersuchung eines Phosphorothioatoligonucleotids	696	28.6	Alternative Verfahren der Amplifikation	769
	Weiterführende Literatur	699	28.6.1	<i>Nucleic acid sequence based amplification</i> (NASBA)	769
27	Hybridisierung und Nachweistechniken	701	28.6.1.1	<i>Transcription mediated amplification</i> (TMA)	771
27.1	Grundlagen der Hybridisierung	702	28.6.2	<i>Strand displacement amplification</i> (SDA)	771
27.1.1	Prinzip und Durchführung der Hybridisierung	703	28.6.3	<i>Ligase chain reaction</i> (LCR)	772
27.1.2	Spezifität der Hybridisierung und Stringenz	704	28.6.4	<i>Qβ</i> -Amplifikation (<i>Qβ amplification</i>)	773
27.1.3	Hybridisierungsformate	705	26.6.5	<i>Branched DNA amplification</i> (bDNA)	774
27.2	Sonden zur Nucleinsäureanalytik	713	28.7	Ausblick	774
27.2.1	DNA-Sonden	714		Weiterführende Literatur	775
27.2.2	RNA-Sonden	715	29	DNA-Sequenzierung	777
27.2.3	PNA-Sonden	716	29.1	Gelgestützte DNA-Sequenzierungsverfahren	781
27.2.4	LNA-Sonden	717	29.1.1	Sequenzierung nach Sanger: das Didesoxyverfahren	781
27.3	Markierungsverfahren	717	29.1.2	Markierungstechniken und Nachweisverfahren	789
27.3.1	Markierungspositionen	719	29.1.3	Chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert	794
27.3.2	Enzymatische Markierungsreaktionen	720	29.2	Gelfreie DNA-Sequenzierungsmethoden	800
27.3.3	Photochemische Markierungsreaktionen	721		Weiterführende Literatur	803
27.3.4	Chemische Markierungsreaktionen	722	30	Gezielte Genmodifikation in der Maus	805
27.4	Nachweissysteme	723	30.1	Strategien zur gezielten Genmodifikation	806
27.4.1	Färbemethoden	723	30.2	Vom DNA-Konstrukt zur Maus	807
27.4.2	Radioaktive Systeme	723	30.2.1	Mikroinjektion von ES-Zellen in Blastocysten, Morulaaggregation von ES-Zellen, ES-Mäuse	807
27.4.3	Nichtradioaktive Systeme	725	30.2.2	Pronucleusinjektion von DNA, virale Infektion	810

30.3	Das Cre/loxP-Rekombinasesystem als Beispiel für einen Genschalter	812	32.6.1	Funktionsvielfalt der RNA	860
30.4	Strategien zur gezielten Genmodifikation unter Verwendung von Genschaltern	813	32.6.2	RNA-Sekundärstrukturparameter und ungewöhnliche Basenpaarungen	861
30.5	Konditionale Mutagenese	815	32.6.3	Dynamik der RNA-Protein-Erkennung	861
	Weiterführende Literatur	819	32.7	Charakteristische RNA-Bindungsmotive	863
31	Analyse der genomischen DNA-Methylierung	821	32.8	Spezielle Methoden zur Analyse von RNA-Protein-Komplexen	865
31.1	Überblick über die Detektionsmethoden der DNA-Methylierung	822	32.8.1	Limitierte enzymatische Hydrolyse	865
31.2	Methylierungsanalyse mit der Bisulfite-Technik	823	32.8.2	Markierungsmethoden	865
31.2.1	Amplifikation und Sequenzierung von bisulfitbehandelter DNA	824	32.8.3	Primer- <i>extension</i> von RNA	866
31.2.2	Restriktionsanalyse nach Bisulfite-PCR	825	32.8.4	Gebräuchliche RNAsen	867
31.2.3	Methylierungsspezifische PCR	826	32.8.5	Chemische Modifikation von RNA-Protein-Komplexen	868
31.3	Methylierungsanalyse mit Hydrazin- und Permanganatmodifikationen	827	32.8.6	Chemische Quervernetzung	870
31.4	Analyse der DNA mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen	828	32.8.7	Einbau photoreaktiver Nucleotide	871
31.5	Methylierungsanalyse durch methylcytosin-bindende Proteine	830	32.9	Genetische Methoden	872
31.6	Methylierungsanalyse durch DNA-Hydrolyse und <i>nearest neighbor</i> -Assays	831	32.9.1	<i>Tri-hybrid</i> -Methode	872
31.7	Ausblick	832	32.9.2	Aptamere und das Selex-Verfahren	873
	Weiterführende Literatur	832	32.9.3	Gezielte Mutationen in Bindedomänen	874
				Weiterführende Literatur	875
32	Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen	833	33	Sequenzanalyse	879
32.1	DNA-Protein-Wechselwirkungen	833	33.1	Sequenzanalyse und Bioinformatik	879
32.1.1	Grundlagen der DNA-Protein-Erkennung: helikale Doppelstränge	833	33.2	Datenbanken	881
32.1.2	DNA-Krümmung	834	33.2.1	Datenabruf	881
32.1.3	DNA-Topologie	836	33.3	Webdienste	885
32.2	DNA-Bindungsmotive	837	33.4	Analyse der Sequenzzusammensetzung	885
32.3	Spezielle Analysemethoden	838	33.5	Muster in Sequenzen	886
32.3.1	Filterbindung	838	33.5.1	Sequenzsignale: funktionale Motive	887
32.3.2	Gelelektrophorese	839	33.5.2	Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren	888
32.3.3	Bestimmung von Dissoziationskonstanten	842	33.5.3	Identifizierung codierender Bereiche in DNA	888
32.3.4	Analyse der Dynamik von DNA-Protein-Komplexen	843	33.5.4	Proteinlokalisierung	889
32.4	DNA- <i>footprint</i> -Analysen	845	33.5.5	Sekundärstruktur	890
32.4.1	Markierung der DNA	847	33.6	Homologie	890
32.4.2	Primer- <i>extension</i> -Analyse für DNA	847	33.6.1	Identität, Ähnlichkeit und Homologie	890
32.4.3	Hydrolyse-Methoden	848	33.6.2	Alignment	892
32.4.4	Chemische Reagenzien für Modifikation von DNA-Protein-Komplexen	850	33.6.3	Optimales Alignment	893
32.4.5	Interferenzbedingungen	853	33.6.4	Alignment für schnelle Datenbanksuchen: BLAST	895
32.4.6	Chemische Nucleasen	854	33.6.5	Profilbasierte Datenbanksuche: PSI-BLAST	897
32.5	Physikalische Analysen	855	33.7	Multiples Alignment und Konsensussequenzen	897
32.5.1	Fluoreszenz-Methoden	855	33.8	Sequenz und Struktur	898
32.5.2	Fluorophore und Markierungsverfahren	856	33.9	Ausblicke	899
32.5.3	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	856		Weiterführende Literatur	900
32.5.4	Molekulare Lichtsonden (<i>molecular beacons</i>)	857	34	Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese	971
32.5.5	<i>Surface plasmon resonance</i> (SPR)	857	34.1	Methoden zur Analyse von RNA-Transkripten	901
32.5.6	<i>Scanning force microscopy</i> (SFM)	859	34.1.1	Überblick	901
32.5.7	<i>Optical tweezer</i>	859	34.1.2	Nuclease S1-Analyse von RNA	902
32.5.8	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i> (FCS)	859	34.1.3	Ribonucleaseprotektionsassay (RPA)	905
32.6	RNA-Protein-Wechselwirkungen	860	34.1.4	Primerverlängerung (Primer- <i>extension</i>)	908
			34.1.5	Northern-Blot, Dot- und Slot-Blot	909

34.1.6	Quantitative Polymerasekettenreaktion (<i>real time</i> -PCR)	911	36.2.6	Gen und vererbbarer Krankheit – die Mutationssuche	952
34.2	Analyse der RNA-Syntheserate <i>in vivo</i> (<i>nuclear run-on</i> -Assay)	912	36.3	Integration der Genkarten	953
34.2.1	Zellaufschluss	912	36.4	Das Humangenomprojekt	954
34.2.2	Die <i>nuclear run-on</i> -Transkription und Detektion der Transkripte	913		Weiterführende Literatur	955
34.3	Die <i>in vitro</i> -Transkription klonierter Gene in Extrakten und Proteinfraktionen	913	37	Differenzielle Genaktivität	957
34.3.1	Komponenten des <i>in vitro</i> -Transkriptionsansatzes	913	37.1	Grundprinzip des <i>differential display</i>	957
34.3.2	Herstellung transkriptionsaktiver Extrakte und Proteinfraktionen	914	37.2	Experimentelle Durchführung des <i>differential display</i>	958
34.3.3	Promotorspezifische Matrizen-DNA und Detektion der <i>in vitro</i> -Transkripte	914	37.2.1	RNA-Isolierung	958
34.4	Die <i>in vivo</i> -Analyse klonierter Promotoren in Säugerzellen	917	37.2.2	Synthese der cDNA	958
34.4.1	Plasmidvektoren für die Analyse von <i>cis</i> -aktiven Elementen in Säugerzellen	917	37.2.3	Amplifikation durch die erste PCR	959
34.4.2	Einschleusen von Fremd-DNA in Säugerzellen	919	37.2.4	Modifikationen der PCR und der Nachweisreaktion	960
34.4.3	Die Charakterisierung der <i>in vivo</i> -Transkripte der klonierten Promotoren	920	37.2.5	Polyacrylamidgelektrophorese	961
	Weiterführende Literatur	922	37.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	961
35	Fluoreszenzmarkierte DNA-Hybridisierung zur Genomanalyse in der molekularen Cytogenetik	923	37.2.7	Northern-Blot-Analyse	962
35.1	Methoden der fluoreszenzmarkierten DNA-Hybridisierung	924	37.2.8	Klonierung der cDNAs	962
35.1.1	Markierungsstrategie	924	37.2.9	Alternative zur Northern-Blot-Analyse: Microarray-Analysen	963
35.1.2	DNA-Sonden für FISH und CGH	924	37.3	Leistungsfähigkeit des <i>differential display</i>	963
35.1.3	Markierung der DNA-Sonden	925	37.3.1	Abgeleitete Methoden	963
35.1.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung	926	37.3.2	Methodenkombinationen mit <i>differential display</i>	963
35.1.5	Fluoreszenzauswertung der Hybridisierungssignale	927	37.3.3	<i>Differential display</i> und Microarray-Analyse	964
35.2	Anwendungen: FISH und CGH	928	37.4	Einsatzmöglichkeiten des <i>differential display</i>	964
35.2.1	Analyse genomischer DNA durch FISH	928		Weiterführende Literatur	965
35.2.2	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	930	38	DNA-Microarray-Technologie	967
	Weiterführende Literatur	933	38.1	RNA-Analysen	968
36	Physikalische und genetische Genkartierung	935	38.1.1	<i>Transcriptional profiling</i>	968
36.1	Genetische Kartierung: Lokalisierung von Loci im Genom	935	38.1.2	RNA-Reifung	969
36.1.1	Rekombination	935	38.1.3	RNA-Struktur und Funktionalität	969
36.1.2	Genetische Marker	937	38.2	DNA-Analysen	969
36.1.3	Kopplungsanalyse – die Erstellung genetischer Karten	939	38.2.1	DNA-Kartierung	969
36.1.4	Die genetische Karte des menschlichen Genoms	941	38.2.2	<i>Comparative genomic hybridisation</i> (CGH)	970
36.1.5	Genetische Kartierung von Krankheitsgenen	942	38.2.3	Protein-DNA-Interaktionen	971
36.2	Physikalische Kartierung	943	38.2.4	Genotypisierung	972
36.2.1	Restriktionskartierung ganzer Genome	943	38.2.5	Epigenetische Studien	973
36.2.2	Kartierung mittels rekombinanter Klone	945	38.2.6	DNA-Sequenzierung	973
36.2.3	Erstellung der physikalischen Karte	947	38.3	Molekülsynthese	974
36.2.4	Isolierung und Identifizierung von Genen	949	38.3.1	DNA-Synthese	974
36.2.5	Transkriptkarten des menschlichen Genoms	951	38.3.2	Herstellung von RNAi	975
			38.3.3	Chipgebundene Proteinexpression	975
			38.4	Neue Ansätze	976
			38.4.1	Eine universelle Chip-Plattform	976
			38.4.2	Strukturanalysen	976
			38.4.3	Jenseits von Nucleinsäuren	977
				Weiterführende Literatur	977
			39	Oligonucleotide als zellbiologische Werkzeuge	979
			39.1	<i>Antisense</i> -Oligonucleotide	980
			39.1.1	Wirkweisen von <i>antisense</i> -Oligonucleotiden	981
			39.1.2	Triplexbildende Oligonucleotide	982
			39.1.3	Modifikationen von Oligonucleotiden zur Steigerung der Nucleasestabilität	982

		Inhalt	XIX	
39.1.4	Einsatz von <i>antisense</i> -Oligonucleotiden in Zellkultur und in Tiermodellen	984	43 Toponomanalyse	1035
39.1.5	<i>Antisense</i> -Oligonucleotide als neue Arzneimittel	985	43.1 Lichtmikroskopische Methoden im Hochdurchsatz	1035
39.2	Ribozyme	986	43.2 Antikörperbasierte Toponomanalyse mit Multi-Epitop-Ligand-Kartierung (MELK)	1036
39.2.1	Entdeckung und Klassifikation von Ribozymen	986	43.2.1 Konzept des Proteintoponom	1037
39.2.2	Anwendungen von Ribozymen	986	43.2.2 <i>Imaging cycler robots</i> : Grundlage einer Toponomlesetechnologie	1038
39.3	RNA-Interferenz	987	43.2.3 Ein Beispiel: Spezifität und Selektivität des Zelloberflächentoponom	1039
39.3.1	Grundlagen der RNA-Interferenz	987	43.2.4 Methoden der Toponomanalyse	1040
39.3.2	RNA-Interferenz durch Expressionsvektoren	988	43.2.5 Zusammenfassung und Ausblick	1047
39.3.3	Anwendungen der RNA-Interferenz	989	43.3 Abbildende Massenspektrometrie	1048
39.4	Aptamere: Hoch affine RNA- und DNA-Oligonucleotide	990	43.3.1 Analytische Mikrosonden	1048
39.4.1	Selektion von Aptameren	990	43.3.2 <i>Images</i> : Massenspektrometrische Rasterbilder	1049
39.3.2	Anwendungen von Aptameren	992	43.3.3 SMALDI-MS: Das Matrixdilemma	1049
39.5	Ausblick	992	43.3.4 SIMS- und ME-SIMS- <i>imaging</i> : Die Erweiterung des Massenbereichs	1050
	Weiterführende Literatur	993	43.3.5 Auflösung versus Empfindlichkeit	1050
40	Proteomanalyse	995	43.3.6 Organe und Gewebe: MALDI- <i>imaging</i> mit niedriger Auflösung	1051
40.1	Definition der Ausgangsbedingungen und der Fragestellung, Projektplanung	998	43.3.7 Biologische Zellen und Zellorganellen: MS- <i>imaging</i> mit hoher Auflösung	1051
40.2	Probenvorbereitung	999	43.3.8 Identifizierung und Charakterisierung	1052
40.3	Die quantitative Analyse des Proteoms	1000	Weiterführende Literatur	1052
40.3.1	Klassische gelbasierte Proteomanalyse	1001		
40.3.2	Zweidimensionale differenzielle Gel-elektrophorese (2D-DIGE)	1005	44 Systembiologie	1055
40.3.3	Nicht gelbasierte Proteomanalyse	1006	44.1 Ziele der Systembiologie	1055
40.4	Bioinformatik	1014	44.1.1 Definition	1055
40.5	Diskussion und Ausblick	1014	44.2 Methodische Ansätze	1056
	Weiterführende Literatur	1016	44.2.1 Modellaufbau	1056
41	Metabolomics und Peptidomics	1017	44.2.2 Induktiver versus deduktiver Lösungsansatz	1056
41.1	Systembiologie und Metabolomics	1018	44.2.3 Mathematische Werkzeuge	1057
41.2	Technologische Plattformen für Metabolomics	1019	44.3 Beispiele für systembiologische Modelle	1058
41.3	Metabolomisches <i>profiling</i>	1021	44.3.1 Studien in der pharmakologischen Forschung	1058
41.4	Peptidomics	1022	44.3.2 Signaltransduktion JAK/STAT	1060
41.5	Metabolomics – <i>knowledge mining</i>	1023	44.3.3 Signaltransduktion EGF-Rezeptor/MAPK	1061
41.6	<i>Data mining</i>	1024	44.4 Hürden und Perspektiven für die Systembiologie	1062
41.7	Anwendungsfelder	1025	44.5 Internationale Forschungsnetzwerke	1062
41.8	Ausblick	1026	Weiterführende Literatur	1063
	Weiterführende Literatur	1026		
42	Interactomics – Systematische Protein-Protein-Wechselwirkungen	1027		
42.1	Protein-Microarrays	1027		
42.1.1	Sensitivität durch Miniaturisierung – <i>ambient analyte assay</i>	1028	Anhang 1: Strahlenschutz im Labor	1067
42.1.2	Von DNA- zu Protein-Microarrays	1030	Anhang 2: Aminosäuren und posttranskriptionale Modifikationen	1093
42.1.3	Anwendungen von Protein-Microarrays	1031	Anhang 3: Symbole und Abkürzungen	1095
	Weiterführende Literatur	1033		
			Index	1101

Anhang

Anhang 1: Strahlenschutz im Labor	1067
Anhang 2: Aminosäuren und posttranskriptionale Modifikationen	1093
Anhang 3: Symbole und Abkürzungen	1095
Index	1101