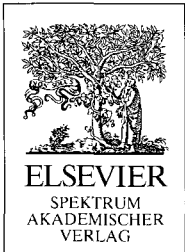


Friedrich Lottspeich Joachim W. Engels (Hrsg.)

Bioanalytik

2. Auflage



Spektrum
AKADEMISCHER VERLAG

Inhalt

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

XII	Inhalt	
6.2.2	Untersuchungen an überexprimierten oder mutierten Proteinen	116
6.3	Protein- <i>cross linking</i> zur Analyse von Proteinwechselwirkungen	117
6.3.1	Bifunktionelle Reagenzien	118
6.3.2	Photoaffinitätsmarkierung	118
	Weiterführende Literatur	127
7	Spektroskopie	129
7.1	Physikalische Prinzipien und Messtechniken	130
7.1.1	Physikalische Grundlagen optischer spektroskopischer Messmethoden	130
7.1.2	Wechselwirkung Licht-Materie	130
7.1.3	Absorptionsmessungen	138
7.1.4	Photometer	141
7.1.5	Kinetische spektroskopische Untersuchungen	142
7.2	UV/VIS/NIR-Spektroskopie	144
7.2.1	Grundlagen	144
7.2.2	Chromoproteine	145
7.3	IR-Spektroskopie	152
7.3.1	Grundlagen	152
7.3.2	Molekülschwingungen	153
7.3.3	Messtechniken	155
7.3.4	Infrarotspektroskopie von Proteinen	158
7.4	Raman-Spektroskopie	160
7.4.1	Grundlagen	160
7.4.2	Raman-Experimente	161
7.4.3	Resonanz-Raman-Spektroskopie	163
7.5	Fluoreszenzspektroskopie	164
7.5.1	Grundlagen	164
7.5.2	Fluoreszenzspektren als Emissionsspektren und als Aktionsspektren	166
7.5.3	Fluoreszenzuntersuchungen mit intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren	168
7.6	Methoden mit polarisiertem Licht	169
7.6.1	Lineardichroismus	169
7.6.2	Optische Rotationsdispersion und Circular dichroismus	172
	Weiterführende Literatur	174
8	Lichtmikroskopische Verfahren – Imaging	175
8.1	Wegbereiter der Mikroskopie – von einfachen Linsen zu hoch auflösenden Mikroskopen	175
8.2	Moderne Anwendungsbereiche	176
8.3	Physikalische Grundlagen	177
8.4	Nachweismethoden	183
8.5	Präparationsmethoden	190
8.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	193
8.7	<i>Live cell imaging</i>	194
	Weiterführende Literatur	199
	Internetseiten	200
9	Spaltung von Proteinen	201
9.1	Proteolytische Enzyme	201
9.2	Strategie	202
9.3	Denaturierung	203
9.4	Spaltung von Disulfidbrücken und Alkylierung	203
9.5	Enzymatische Fragmentierung	205
9.5.1	Proteasen	206
9.5.2	Proteolysebedingungen	210
9.6	Chemische Fragmentierung	211
9.7	Ausblick	214
	Weiterführende Literatur	214
10	Chromatographische Trennmethode	215
10.1	Prinzip der Chromatographie	215
10.1.1	Grundbegriffe	216
10.1.2	Instrumentierung	216
10.1.3	Stationäre Phasen	216
10.1.4	Detektion der chromatographischen Trennung	217
10.2	Chromatographische Theorie	218
10.3	Reinigungsstrategie für Peptide und Proteine	220
10.4	Ionenaustauschchromatographie	221
10.5	Hydroxyapatitchromatographie	223
10.6	<i>Reversed phase</i> -Chromatographie	224
10.7	Hydrophobe Interaktionschromatographie	227
10.8	Affinitätschromatographie	228
10.9	Ausschlusschromatographie	231
	Weiterführende Literatur	233
11	Elektrophoretische Verfahren	235
11.1	Geschichtlicher Überblick	235
11.2	Theoretische Grundlagen	237
11.3	Instrumentierung und Durchführung von Gelelektrophoresen	240
11.3.1	Probenvorbereitung	242
11.3.2	Gelmedien für Elektrophoresen	242
11.3.3	Nachweis und Quantifizierung der getrennten Proteine	244
11.3.4	Zonenelektrophorese	245
11.3.5	Porengradientengele	247
11.3.6	Puffersysteme	248
11.3.7	Disk-Elektrophorese	248
11.3.8	Saure Nativelektrophorese	249
11.3.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	249
11.3.10	Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese	251
11.3.11	Isoelektrische Fokussierung	251
11.4	Präparative Verfahren	255
11.4.1	Elektroelution aus Gelen	255
11.4.2	Präparative Zonenelektrophorese	256
11.4.3	Präparative isoelektrische Fokussierung	257
11.5	Trägerfreie Elektrophorese	258
11.6	Hoch auflösende zweidimensionale Elektrophorese	258
11.6.1	Probenvorbereitung	260
11.6.2	Vorfractionierung	260
11.6.3	Erste Dimension: IEF in IPG-Streifen	261
11.6.4	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	262
11.6.5	Detektion und Identifizierung der Proteine	262
11.6.6	Differenzgelelektrophorese	263
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	15	Massenspektrometrie	329
12.3.1	Injektion der Proben	271	15.1	Matrixassistierte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	330
12.3.2	Detektion	272	15.1.1	Ionisierungsprinzip	330
12.4	Theoretische Grundlagen	274	15.1.2	Massenanalyse der Ionen mit dem Flugzeit-massenspektrometer	333
12.4.1	Elektroosmotischer Fluss (EOF)	274	15.1.3	Detektion der Ionen	337
12.4.2	Joulesche Wärmeentwicklung	275	15.1.4	Molekulargewichtsbestimmung mit MALDI	338
12.5	Trennprinzipien in der Kapillarelektrophorese	276	15.1.5	Sequenzierung von Peptiden mit MALDI	344
12.6	Kapillarzonenlektrophorese (CZE)	276	15.2	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	351
12.6.1	Elektrodispersion	278	15.2.1	Ionisierungsprinzip	352
12.6.2	Auflösung	279	15.2.2	ESI-Quelle und Interface	355
12.6.3	Trennungsoptimierung	279	15.2.3	Massenanalyse der Ionen mit dem Quadrupol-massenspektrometer	357
12.7	Kapillarraffinitätslektrophorese (CAE)	281	15.2.4	Massenanalyse mit der Ionenfalle	359
12.8	Micellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC)	283	15.2.5	Molekulargewichtsbestimmung mit ESI-MS	361
12.8.1	Theoretische Grundlagen	283	15.2.6	Strukturanalyse mit ESI-MS	366
12.8.2	Chirale MEKC	286	15.2.7	Sequenzierung von Peptiden mit CID	368
12.9	Kapillargelelektrophorese (CGE)	287	15.3	Relative quantitative Analyse von Proteinen mit MS	372
12.10	Isoelektrische Fokussierung (CIEF)	288		Weiterführende Literatur	372
12.10.1	Einschrittfokussierung	290	16	Protein-Protein-Wechselwirkungen: das two-hybrid-System und andere Methoden	373
12.10.2	Fokussierung mit Druck-/Spannungsmobilisierung	290	16.1	Das two-hybrid-System	373
12.10.3	Fokussierung mit chemischer Mobilisierung	291	16.1.1	Das Konzept des two-hybrid-Systems	373
12.11	Isotachophorese (ITP)	291	16.1.2	Die Elemente des two-hybrid-Systems	375
12.12	Spezielle Techniken	293	16.1.3	Konstruktion des Köderproteins	376
12.12.1	Online-Probenkonzentrierung	293	16.1.4	Welche Köderproteine eignen sich für das two-hybrid-System?	379
12.12.2	CE-MS-Kopplung	294	16.1.5	Aktivator-Fusionsprotein und cDNA-Bibliotheken	379
12.12.3	Fraktionierung	295	16.1.6	Durchführung des two-hybrid-Screenings	380
12.13	Ausblick	296	16.1.7	Modifizierte Anwendungen und Weiterentwicklungen der two-hybrid-Technologie	384
	Weiterführende Literatur	297	16.1.8	Biochemische und funktionale Analyse der Interaktoren	386
13	Aminosäureanalyse	299	16.2	In vitro-Interaktionsanalyse: GST-pulldown	387
13.1	Probenvorbereitung	300	16.3	Ko-Immunpräzipitation	388
13.1.1	Saure Hydrolyse	300	16.4	Far-Western	389
13.1.2	Alkalische Hydrolyse	301	16.5	Plasmonenspektroskopie (surface plasmon resonance)	390
13.1.3	Enzymatische Hydrolyse	301	16.6	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	392
13.2	Freie Aminosäuren	301	16.6.1	Interaktions- und Strukturanalyse mittels FRET	392
13.3	Derivatisierung	302	16.6.2	Experimentelle Bestimmung der FRET-Effizienz	393
13.3.1	Nachsäulenderivatisierung	302	16.6.3	Methoden der FRET-Messung	394
13.3.2	Vorsäulenderivatisierung	304	16.6.4	Verwendete Sonden	396
13.4	Datenauswertung und Beurteilung der Analysen	308	16.7	Analytische Ultrazentrifugation	397
	Weiterführende Literatur	309	16.7.1	Instrumentelle Grundlagen	397
14	Proteinsequenzanalyse	311			
14.1	N-terminale Sequenzanalyse: Der Edman-Abbau	313			
14.1.1	Reaktionen des Edman-Abbaus	313			
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	Bedampfung 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	Abbilden 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 isomorphons replacement</i> (SIR) und <i>multiple isomorphons 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
22.3	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

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- <i>beads</i>	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 Nachweistechiken	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	28.6.5	<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
30.4	Strategien zur gezielten Genmodifikation unter Verwendung von Genschaltern	813
30.5	Konditionale Mutagenese	815
	Weiterführende Literatur	819

31	Analyse der genomischen DNA-Methylierung	821
31.1	Überblick über die Detektionsmethoden der DNA-Methylierung	822
31.2	Methylierungsanalyse mit der Bisulfittechnik	823
31.2.1	Amplifikation und Sequenzierung von bisulfitbehandelter DNA	824
31.2.2	Restriktionsanalyse nach Bisulfit-PCR	825
31.2.3	Methylierungsspezifische PCR	826
31.3	Methylierungsanalyse mit Hydrazin- und Permanganatmodifikationen	827
31.4	Analyse der DNA mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen	828
31.5	Methylierungsanalyse durch methylcytosin-bindende Proteine	830
31.6	Methylierungsanalyse durch DNA-Hydrolyse und <i>nearest neighbor</i> -Assays	831
31.7	Ausblick	832
	Weiterführende Literatur	832

32	Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen	833
32.1	DNA-Protein-Wechselwirkungen	833
32.1.1	Grundlagen der DNA-Protein-Erkennung: helikale Doppelstränge	833
32.1.2	DNA-Krümmung	834
32.1.3	DNA-Topologie	836
32.2	DNA-Bindungsmotive	837
32.3	Spezielle Analysemethoden	838
32.3.1	Filterbindung	838
32.3.2	Gelelektrophorese	839
32.3.3	Bestimmung von Dissoziationskonstanten	842
32.3.4	Analyse der Dynamik von DNA-Protein-Komplexen	843
32.4	DNA- <i>footprint</i> -Analysen	845
32.4.1	Markierung der DNA	847
32.4.2	Primer- <i>extension</i> -Analyse für DNA	847
32.4.3	Hydrolyse-Methoden	848
32.4.4	Chemische Reagenzien für Modifikation von DNA-Protein-Komplexen	850
32.4.5	Interferenzbedingungen	853
32.4.6	Chemische Nucleasen	854
32.5	Physikalische Analysen	855
32.5.1	Fluoreszenz-Methoden	855
32.5.2	Fluorophore und Markierungsverfahren	856
32.5.3	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	856
32.5.4	Molekulare Lichtsonden (<i>molecular beacons</i>)	857
32.5.5	<i>Surface plasmon resonance</i> (SPR)	857
32.5.6	<i>Scanning force microscopy</i> (SFM)	859
32.5.7	<i>Optical tweezer</i>	859
32.5.8	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i> (FCS)	859
32.6	RNA-Protein-Wechselwirkungen	860

32.6.1	Funktionsvielfalt der RNA	860
32.6.2	RNA-Sekundärstrukturparameter und ungewöhnliche Basenpaarungen	861
32.6.3	Dynamik der RNA-Protein-Erkennung	861
32.7	Charakteristische RNA-Bindungsmotive	863
32.8	Spezielle Methoden zur Analyse von RNA-Protein-Komplexen	865
32.8.1	Limitierte enzymatische Hydrolyse	865
32.8.2	Markierungsmethoden	865
32.8.3	Primer- <i>extension</i> von RNA	866
32.8.4	Gebräuchliche RNasen	867
32.8.5	Chemische Modifikation von RNA-Protein-Komplexen	868
32.8.6	Chemische Quervernetzung	870
32.8.7	Einbau photoreaktiver Nucleotide	871
32.9	Genetische Methoden	872
32.9.1	<i>Tri-hybrid</i> -Methode	872
32.9.2	Aptamere und das Selex-Verfahren	873
32.9.3	Gezielte Mutationen in Bindedomänen	874
	Weiterführende Literatur	875

Teil V Systematische Funktionsanalytik

33	Sequenzanalyse	879
33.1	Sequenzanalyse und Bioinformatik	879
33.2	Datenbanken	881
33.2.1	Datenabruf	881
33.3	Webdienste	885
33.4	Analyse der Sequenzzusammensetzung	885
33.5	Muster in Sequenzen	886
33.5.1	Sequenzsignale: funktionale Motive	887
33.5.2	Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren	888
33.5.3	Identifizierung codierender Bereiche in DNA	888
33.5.4	Proteinlokalisierung	889
33.5.5	Sekundärstruktur	890
33.6	Homologie	890
33.6.1	Identität, Ähnlichkeit und Homologie	890
33.6.2	Alignment	892
33.6.3	Optimales Alignment	893
33.6.4	Alignment für schnelle Datenbanksuchen: BLAST	895
33.6.5	Profilbasierte Datenbanksuche: PSI-BLAST	897
33.7	Multiples Alignment und Konsensussequenzen	897
33.8	Sequenz und Struktur	898
33.9	Ausblicke	899
	Weiterführende Literatur	900

34	Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese	971
34.1	Methoden zur Analyse von RNA-Transkripten	901
34.1.1	Überblick	901
34.1.2	Nuclease S1-Analyse von RNA	902
34.1.3	Ribonucleaseprotektionsassay (RPA)	905
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 vererbare 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 Proteinfractionen	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 Proteinfractionen	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	Polyacrylamidgelelektrophorese	961
Weiterführende Literatur		922	37.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	961
			37.2.7	Northern-Blot-Analyse	962
35	Fluoreszenzmarkierte DNA-Hybridisierung zur Genomanalyse in der molekularen Cytogenetik	923	37.2.8	Klonierung der cDNAs	962
35.1	Methoden der fluoreszenzmarkierten DNA-Hybridisierung	924	37.2.9	Alternative zur Northern-Blot-Analyse: Microarray-Analysen	963
35.1.1	Markierungsstrategie	924	37.3	Leistungsfähigkeit des <i>differential display</i>	963
35.1.2	DNA-Sonden für FISH und CGH	924	37.3.1	Abgeleitete Methoden	963
35.1.3	Markierung der DNA-Sonden	925	37.3.2	Methodenkombinationen mit <i>differential display</i>	963
35.1.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung	926	37.3.3	<i>Differential display</i> und Microarray-Analyse	964
35.1.5	Fluoreszenzauswertung der Hybridisierungssignale	927	37.4	Einsatzmöglichkeiten des <i>differential display</i>	964
35.2	Anwendungen: FISH und CGH	928	Weiterführende Literatur		965
35.2.1	Analyse genomischer DNA durch FISH	928			
35.2.2	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	930	38	DNA-Microarray-Technologie	967
Weiterführende Literatur		933	38.1	RNA-Analysen	968
			38.1.1	<i>Transcriptional profiling</i>	968
36	Physikalische und genetische Genkartierung	935	38.1.2	RNA-Reifung	969
36.1	Genetische Kartierung: Lokalisierung von Loci im Genom	935	38.1.3	RNA-Struktur und Funktionalität	969
36.1.1	Rekombination	935	38.2	DNA-Analysen	969
36.1.2	Genetische Marker	937	38.2.1	DNA-Kartierung	969
36.1.3	Kopplungsanalyse – die Erstellung genetischer Karten	939	38.2.2	<i>Comparative genomic hybridisation</i> (CGH)	970
36.1.4	Die genetische Karte des menschlichen Genoms	941	38.2.3	Protein-DNA-Interaktionen	971
36.1.5	Genetische Kartierung von Krankheitsgenen	942	38.2.4	Genotypisierung	972
36.2	Physikalische Kartierung	943	38.2.5	Epigenetische Studien	973
36.2.1	Restriktionskartierung ganzer Genome	943	38.2.6	DNA-Sequenzierung	973
36.2.2	Kartierung mittels rekombinanter Klone	945	38.3	Molekülsynthese	974
36.2.3	Erstellung der physikalischen Karte	947	38.3.1	DNA-Synthese	974
36.2.4	Isolierung und Identifizierung von Genen	949	38.3.2	Herstellung von RNAi	975
36.2.5	Transkriptkarten des menschlichen Genoms	951	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

39.1.4	Einsatz von <i>antisense</i> -Oligonucleotiden in Zellkultur und in Tiermodellen	984
39.1.5	<i>Antisense</i> -Oligonucleotide als neue Arzneimittel	985
39.2	Ribozyme	986
39.2.1	Entdeckung und Klassifikation von Ribozymen	986
39.2.2	Anwendungen von Ribozymen	986
39.3	RNA-Interferenz	987
39.3.1	Grundlagen der RNA-Interferenz	987
39.3.2	RNA-Interferenz durch Expressionsvektoren	988
39.3.3	Anwendungen der RNA-Interferenz	989
39.4	Aptamere: Hoch affine RNA- und DNA-Oligonucleotide	990
39.4.1	Selektion von Aptameren	990
39.3.2	Anwendungen von Aptameren	992
39.5	Ausblick	992
	Weiterführende Literatur	993
40	Proteomanalyse	995
40.1	Definition der Ausgangsbedingungen und der Fragestellung, Projektplanung	998
40.2	Probenvorbereitung	999
40.3	Die quantitative Analyse des Proteoms	1000
40.3.1	Klassische gelbasierte Proteomanalyse	1001
40.3.2	Zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)	1005
40.3.3	Nicht gelbasierte Proteomanalyse	1006
40.4	Bioinformatik	1014
40.5	Diskussion und Ausblick	1014
	Weiterführende Literatur	1016
41	Metabolomics und Peptidomics	1017
41.1	Systembiologie und Metabolomics	1018
41.2	Technologische Plattformen für Metabolomics	1019
41.3	Metabolomisches <i>profiling</i>	1021
41.4	Peptidomics	1022
41.5	Metabolomics – <i>knowledge mining</i>	1023
41.6	<i>Data mining</i>	1024
41.7	Anwendungsfelder	1025
41.8	Ausblick	1026
	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
42.1.2	Von DNA- zu Protein-Microarrays	1030
42.1.3	Anwendungen von Protein-Microarrays	1031
	Weiterführende Literatur	1033

43	Toponomanalyse	1035
43.1	Lichtmikroskopische Methoden im Hochdurchsatz	1035
43.2	Antikörperbasierte Toponomanalyse mit Multi-Epitop-Ligand-Kartierung (MELK)	1036
43.2.1	Konzept des Proteintoponoms	1037
43.2.2	<i>Imaging cycler robots</i> : Grundlage einer Toponomlesetechnologie	1038
43.2.3	Ein Beispiel: Spezifität und Selektivität des Zelloberflächentoponoms	1039
43.2.4	Methoden der Toponomanalyse	1040
43.2.5	Zusammenfassung und Ausblick	1047
43.3	Abbildende Massenspektrometrie	1048
43.3.1	Analytische Mikrosonden	1048
43.3.2	<i>Images</i> : Massenspektrometrische Rasterbilder	1049
43.3.3	SMALDI-MS: Das Matrixdilemma	1049
43.3.4	SIMS- und ME-SIMS- <i>imaging</i> : Die Erweiterung des Massenbereichs	1050
43.3.5	Auflösung versus Empfindlichkeit	1050
43.3.6	Organe und Gewebe: MALDI- <i>imaging</i> mit niedriger Auflösung	1051
43.3.7	Biologische Zellen und Zellorganellen: MS- <i>imaging</i> mit hoher Auflösung	1051
43.3.8	Identifizierung und Charakterisierung	1052
	Weiterführende Literatur	1052
44	Systembiologie	1055
44.1	Ziele der Systembiologie	1055
44.1.1	Definition	1055
44.2	Methodische Ansätze	1056
44.2.1	Modellaufbau	1056
44.2.2	Induktiver versus deduktiver Lösungsansatz	1056
44.2.3	Mathematische Werkzeuge	1057
44.3	Beispiele für systembiologische Modelle	1058
44.3.1	Studien in der pharmakologischen Forschung	1058
44.3.2	Signaltransduktion JAK/STAT	1060
44.3.3	Signaltransduktion EGF-Rezeptor/MAPK	1061
44.4	Hürden und Perspektiven für die Systembiologie	1062
44.5	Internationale Forschungsnetzwerke	1062
	Weiterführende Literatur	1063

Anhang

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