

Friedrich Lottspeich / Haralabos Zorbas (Hrsg.)

Bioanalytik

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg • Berlin

Inhalt

Bioanalytik - eine eigenständige Wissenschaft	1	4.4.3	Auswahl des Substrats	56
		4.4.4	Substratkonzentration	57
		4.4.5	Enzymkonzentration	59
		4.4.6	Enzymstabilität	60
		4.5	Aufbau eines Testsystems	60
		4.6	Störquellen und Fehlermöglichkeiten	62
			Weiterführende Literatur	64
Teil I Proteinanalytik		5	Immunologische Techniken	67
2	Proteinreinigung	9	5.1	Antikörper
2.1	Eigenschaften von Proteinen	y	5.1.1	Antikörper und Immunabwehr
2.2	Proteinlokalisierung und Reinigungsstrategie	13	5.1.2	Antikörper als Ruagei«
2.3	Homogenisierung und Zellaufschluss	14	5.1.3	Eigenschaften von Antikörpern
2.4	Die Fällung	17	5.1.4	Funktionellü Struktur von igG
2.5	Zentrifugation	18	5.1.5	Antigenbindungsstelle (Hartstelle)
2.5.1	Grundlagen	20	5.1.6	Handhabung von Antikörpern
2.5.2	Zentrifugationstechniken	21	5.2	Anügene
2.6	Abtrennung von Salzen oder hydrophilen Verunreinigungen	24	5.3	Antigen-Aiitikörper-Rcakiion
2.7	Konzentrierung	27	5.3.1	Immimaggluflnntion
2.8	Deiergen/ien und ihre Entfernung	27	5.3.2	Immunprü/ ipilation
2.8.1	Eigenschaften von Detergenzien	28	5.3.3	Immunbindung
2.8.2	Entfernen von Detergenzien	31	5.3.4	Western-Blotting; Proteintransfer, Immobilisierung und Immundetektion
2.9	Probenvorbereitung für die Protcomanalyse	33	5.4	Herstellung von Antikörpern
	Weiterführende Literatur	33	5.4.1	Arten von Antikörpern
				102
3	Proteinbestimmungen	35	6	Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen
3.1	Quantitative Bestimmung durch Färbetests	37	6.1	Chemische Modifikation funktioneller Gruppen von Proteinen
3.1.1	Biuret-Assay	39	6.2	Modifizierung als Mittel zur Einführung von Reportergruppen
3.1.2	Lowry-Assay	39	6.2.1	Untersuchungen an natürlich vorkommenden Proteinen
3.1.3	Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	40	6.2.2	Untersuchungen an überexprimierten oder mutierten Proteinen
3.1.4	Bradford-Assay	41	6.3	Protein-Cross-Linking zur Analyse von Protein-Wechselwirkungen
3.2	Spektroskopische Methoden	42	6.3.1	Bifunktionelle Reagenzien
3.2.1	Messungen im UV-Bereich	43	6.3.2	Photoaffinitätsmarkierung
3.2.2	Fluoreszenzmethode	45		Weiterführende Literatur
3.3	Radioaktive Markierung von Peptiden und Proteinen	45		130
3.3.1	Iodierungen	47	7	Spektroskopie
	Weiterführende Literatur	48	7.1	Physikalische Prinzipien und Messtechniken
4	Enzymatische Aktivitätstests	49		131
4.1	Grundlagen der Enzymkinetik	50		132
4.2	Maßeinheiten der Enzymaktivität	50		
4.3	Messtechniken	52		
4.3.1	Photometrische Aktivitätstests	52		
4.3.2	Kontinuierliche und diskontinuierliche Tests	53		
4.4	Einflussgrößen auf die Enzymaktivität	54		
4.4.1	pH-Wert und Puffersystem	54		
4.4.2	Temperatur	55		

7.1.1	Physikalische Grundlagen optischer spektroskopischer Messmethoden	132	9.8	Affinitätschromatographie	209
7.1.2	Wechselwirkung Licht-Materie	133	9.9	Ausschlusschromatographie	213
7.1.3	Absorptionsmessungen	141		Weiterführende Literatur	215
7.1.4	Photometer	144	10	Elektrophoretische Verfahren	217
7.1.5	Kinetische spektroskopische Untersuchungen	145	10.1	Geschichtlicher Überblick	218
7.2	UV/VIS/NIR-Spektroskopie	147	10.2	Theoretische Grundlagen	219
7.2.1	Grundlagen	147	10.3	Instrumentierung und Durchführung von Gelelektrophoresen	223
7.2.2	Chromoproteine	148	10.3.1	Probenvorbereitung	224
7.3	IR-Spektroskopie	156	10.3.2	Gelmedien für Elektrophoresen	225
7.3.1	Grundlagen	156	10.3.3	Nachweis und Quantifizierung der getrennten Proteine	227
7.3.2	Molekülschwingungen	157	10.3.4	Zonenelektrophorese	229
7.3.3	Messtechniken	158	10.3.5	Porengradientengele	230
7.3.4	Infrarotspektroskopie von Proteinen	160	10.3.6	Puffersysteme	231
7.4	Raman-Spektroskopie	163	10.3.7	Disk-Elektrophorese	231
7.4.1	Grundlagen	163	10.3.8	Saure Nativelektrophorese	233
7.4.2	Raman-Experimente	164	10.3.9	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	233
7.4.3	Resonanz-Ramanspektroskopie	166	10.3.10	Blaue Nativ-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	234
7.5	Fluoreszenzspektroskopie	167	10.3.11	Isoelektrische Fokussierung	235
7.5.1	Grundlagen	167	10.4	Präparative Verfahren	241
7.5.2	Fluoreszenzspektren als Emissionsspektren und als Aktionsspektren	169	10.4.1	Elektroelution aus Gelen	241
7.5.3	Fluoreszenzuntersuchungen mit intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren	171	10.4.2	Präparative Zonenelektrophorese	241
7.6	Methoden mit polarisiertem Licht	172	10.4.3	Präparative isoelektrische Fokussierung	242
7.6.1	Lineardichroismus	172	10.5	Hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese	243
7.6.2	Optische Rotationsdispersion und Circular dichroismus	176	10.6	Trägerfreie Elektrophorese	246
Weiterführende Literatur		178	10.7	Elektroblotting	247
8	Spaltung von Proteinen	179	10.7.1	Blotsysteme	248
8.1	Proteolytische Enzyme	179	10.7.2	Der Blotvorgang	249
8.2	Strategie	180	10.7.3	Die Wahl der geeigneten Blotmembran	250
8.3	Denaturierung	181	Weiterführende Literatur		252
8.4	Spaltung von Disulfidbrücken und Alkylierung	182	11	Kapillarelektrophorese	253
8.5	Enzymatische Fragmentierung	183	11.1	Geschichtlicher Überblick	253
8.5.1	Proteasen	185	11.2	Prinzip der Kapillarelektrophorese	254
8.5.2	Proteolysebedingungen	189	11.3	Gerätetechnik	254
8.6	Chemische Fragmentierung	190	11.3.1	Injektion der Proben	255
8.7	Ausblick	193	11.3.2	Detektion	256
Weiterführende Literatur		194	11.4	Theoretische Grundlagen	258
9	Chromatographische Trennmethoden	195	11.4.1	Elektroosmotischer Fluss	259
9.1	Prinzip der Chromatographie	195	11.4.2	Joulesche Wärmeentwicklung	260
9.1.1	Grundbegriffe	196	11.5	Trennprinzipien in der CE	260
9.1.2	Instrumentierung	196	11.6	Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	261
9.1.3	Stationäre Phasen	197	11.6.1	Elektrodispersion	263
9.1.4	Detektion der chromatographischen Trennung	197	11.6.2	Auflösung	264
9.2	Chromatographische Theorie	198	11.6.3	Trennungsoptimierung	264
9.3	Reinigungsstrategie für Peptide und Proteine	201	11.7	Kapillaraffinitätslektrophorese (CAE)	267
9.4	Ionenaustausch-Chromatographie	202	11.8	Micellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC)	269
9.5	Hydroxyapatit-Chromatographie	204	11.8.1	Theoretische Grundlagen	269
9.6	Reversed-Phase-Chromatographie	205	11.8.2	Chirale MEKC	271
9.7	Hydrophobe Interaktionschromatographie	208	11.9	Kapillargelelektrophorese (CGE)	273
			11.10	Isoelektrische Fokussierung (CIEF)	274
			11.10.1	Einschrittfokusierung	276

11.10.2	Fokussierung mit Druck-/Spannungsmobilisierung	276	14.2.3	Massenanalyse der Ionen mit dem Quadrupolmassenspektrometer	354
11.10.3	Fokussierung mit chemischer Mobilisierung	277	14.2.4	Massenanalyse mit der Ionenfalle	357
11.11	Isotachophorese (ITP)	278	14.2.5	Molekulargewichtsbestimmung mit ESI-MS	359
11.12	Spezielle Applikationen	279	14.2.6	Strukturanalyse mit ESI-MS	363
11.12.1	Online-Probenkonzentrierung	279	14.2.7	Sequenzierung von Peptiden mit ESI-MS	365
11.12.2	CE-MS-Kopplung	281	Weiterführende Literatur		368
11.12.3	Fraktionierung	281			
11.13	Ausblick	283			
Weiterführende Literatur		284			
12	Aminosäurenanalyse	285	15	NMR-Spektroskopie von Biomolekülen	371
12.1	Probenvorbereitung	286	15.1	Theorie der NMR-Spektroskopie	372
12.1.1	Saure Hydrolyse	286	15.1.1	Kernspin und Energiequantelung	372
12.1.2	Alkalische Hydrolyse	287	15.1.2	Continuous-Wave-Spektroskopie	374
12.1.3	Enzymatische Hydrolyse	287	15.1.3	Gepulste Fourier-Transformations-spektroskopie	374
12.2	Freie Aminosäuren	288	15.1.4	Besetzungszahlen und Gleichgewichtsmagnetisierung	375
12.3	Derivatisierung	288	15.1.5	Die Bloch-Gleichungen	376
12.3.1	Nachsäulenderivatisierung	288	15.1.6	Relaxation	376
12.3.2	Vorsäulenderivatisierung	291	15.2	Eindimensionale NMR-Spektroskopie	377
12.4	Datenauswertung und Beurteilung der Analysen	295	15.2.1	Das ID-Experiment	377
Weiterführende Literatur		296	15.2.2	Spektrale Parameter	378
13	Proteinsequenzanalyse	297	15.3	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie	383
13.1	Af-terminale Sequenzanalyse: Der Edman-Abbau	299	15.3.1	Aufbau eines 2D-Spektrums	383
13.1.1	Reaktionen des Edman-Abbaus	299	15.3.2	Das COSY-Spektrum	386
13.1.2	Identifizierung der Aminosäuren	301	15.3.3	Das TOCSY-Spektrum	386
13.1.3	Die Qualität des Edman-Abbaus: Die repetitive Ausbeute	302	15.3.4	Das NOESY-Spektrum	387
13.1.4	Instrumentierung	302	15.3.5	Homonukleare 2D-NMR-Experimente von Proteinen: Grenzen der Anwendung	388
13.1.5	Probleme der Aminosäuresequenzanalyse	307	15.3.6	Heteronukleare NMR	388
13.1.6	Stand der Technik	311	15.3.7	HSQC	389
13.2	C-terminale Sequenzanalyse	312	15.4	Dreidimensionale NMR-Spektroskopie	389
13.2.1	Chemische Abbaumethoden	313	15.4.1	NOESY-HSQC- und TOCSY-HSQC-Experiment	391
13.2.2	Peptidmengen und Qualität des chemischen Abbaus	318	15.4.2	HCCH-TOCSY- und HCCH-COSY-Experiment	391
13.2.3	Abbau der Polypeptide mit Carboxypeptidasen	318	15.4.3	Tripelresonanzexperimente	391
13.2.4	Carboxy-terminale Leitersequenzierung	320	15.5	Signalzuordnung	394
Weiterführende Literatur		322	15.5.1	Sequentielle Zuordnung homonuklearer Spektren	394
14	Massenspektrometrie	323	15.5.2	Auswertung heteronuklearer 3D-Spektren	396
14.1	Matrix-unterstützte Laserdesorption / Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	324	15.5.3	Selektive Aminosäuremarkierung	397
14.1.1	Ionisierungsprinzip	324	15.5.4	Sequentielle Zuordnung mit Tripelresonanzspektren	397
14.1.2	Massenanalyse der Ionen mit dem Flugzeitmassenspektrometer	327	15.6	Bestimmung der Proteinstruktur	401
14.1.3	Detektion der Ionen	331	15.6.1	Randbedingungen für die Strukturrechnung	401
14.1.4	Molekulargewichtsbestimmung mit MALDI	332	15.6.2	Bestimmung der Sekundärstruktur	402
14.1.5	Sequenzierung von Peptiden mit MALDI	339	15.6.3	Berechnung der Tertiärstruktur	404
14.1.6	Kopplung von MALDI-MS und PAGE	347	15.7	Proteinstrukturen und mehr - ein Ausblick	409
14.2	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	348	15.7.1	Bestimmung der Dynamik	409
14.2.1	Ionisierungsprinzip	349	15.7.2	Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen	409
14.2.2	ESI-Quelle und Interface	352	15.7.3	Proteinfaltung	410
			Weiterführende Literatur		410

Teil II 3D-Strukturaufklärung

16	Elektronenmikroskopie	413	19.1.3	Wichtige Monosaccharidbausteine	488
16.1	Transmissionselektronenmikroskopie - Instrumentation	414	19.1.4	Die Reihe der L-Zucker	489
16.2	Präparationsverfahren	417	19.1.5	Die glykosidische Bindung	490
16.2.1	Negativkontrastierung	417	19.2	Die Proteinglykosylierung	494
16.2.2	Bedampfung mit Schwermetallen	419	19.2.1	Aufbau der JV-Glykane	495
16.2.3	Einbettung in Eis	420	19.2.2	Der Aufbau der O-Glykane	497
16.2.4	Zweidimensionale Kristallisation von Proteinen	421	19.3	Glykoanalytik am intakten Glykoprotein	498
16.3	Elektronenmikroskop	422	19.3.1	Ist mein Protein glykosyliert?	498
16.3.1	Auflösung eines Transmissionselektronen- mikroskops	422	19.3.2	Charakterisierung der Glykosylierung mittels Lectinen	501
16.3.2	Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Objekt	424	19.3.3	Isoelektrische Fokussierung	502
16.4	Bildanalyse, Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion	427	19.3.4	Analyse der neutralen Monosaccharid- komponenten	502
16.4.1	Fourier-Transformation	428	19.3.5	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)	505
16.4.2	Analyse der Kontrastübertragungsfunktion und der Kristallinität des Objekts	430	19.4	Freisetzung und Isolierung des Af-Glykanpools	506
16.4.3	Digitalisierung	433	19.4.1	Enzymatische Freisetzung mittels PNGase F	506
16.4.4	Erhöhung des Signal-zu-Rausch- Verhältnisses	433	19.4.2	Enzymatische Freisetzung mittels Endoglykosidasen	507
16.4.5	Korrespondenzanalyse und Klassifizierung	437	19.4.3	Chemische Freisetzung mittels Hydrazinolyse	507
16.4.6	Dreidimensionale Elektronenmikroskopie	439	19.5	Isolierung einzelner TV-Glykane	508
16.5	Rastersondenmikroskopie	443	19.6	Charakterisierung der Glykane im Glykanpool	509
16.5.1	Rastertunnelmikroskopie	445	19.6.1	Mapping nicht-derivatisierter TV-Glykane	509
16.5.2	Rasterkraftmikroskopie	446	19.6.2	Mapping derivatisierter /V-Glykane	514
Weiterführende Literatur		448	19.6.3	Mapping mittels Kapillarelektrophorese (HPCE)	517
17	Röntgenstrukturanalyse	451	19.7	Glykoanalytik isolierter N-Glykane (Strukturanalyse)	519
17.1	Kristallisation	451	19.7.1	Kompositionsanalyse	519
17.2	Kristalle und Röntgenbeugung	453	19.7.2	Methylierungsanalyse	522
17.3	Das Phasenproblem	457	19.7.3	Sequenzierung in Verbindung mit Gelfiltration	524
17.3.1	Isomorpher Ersatz: SIR und MIR	457	19.7.4	FAB-MS (Fast Atom Bombardment- Massenspektrometrie)	524
17.3.2	Multiple anomale Dispersion (MAD)	459	19.7.5	¹ H-NMR-Spektroskopie	526
17.3.3	Molekularer Ersatz (MR)	460	19.8	Schlussbetrachtung	534
17.4	Modellbau und Strukturverfeinerung	461	Weiterführende Literatur		534
Weiterführende Literatur		463			
Teil III Spezielle Stoffgruppen			20	Lipidanalytik	537
18	Analytik synthetischer Peptide	467	20.1	Aufbau und Einteilung von Lipiden	537
18.1	Prinzip der Peptidsynthese	467	20.2	Extraktion von Lipiden aus biologischem Material	539
18.2	Untersuchung der Reinheit synthetischer Peptide	473	20.2.1	Flüssigphasenextraktion	539
18.3	Charakterisierung und Identität synthetischer Peptide	474	20.2.2	Festphasenextraktion	540
18.4	Charakterisierung der Struktur synthetischer Peptide	479	20.3	Methoden der Lipidanalytik	542
18.5	Analytik von Peptidbibliotheken	480	20.3.1	Chromatographische Methoden	542
Weiterführende Literatur		483	20.3.2	Massenspektrometrie	547
19	Kohlenhydratanalytik	485	20.3.3	Immunoassays	548
19.1	Allgemeine stereochemische Grundlagen	486	20.3.4	Weitere Methoden in der Lipidanalytik	548
19.1.1	Die Reihe der D-Zucker	486	20.3.5	Online-Kopplung verschiedener Analysesysteme	550
19.1.2	Stereochemie der D-Glucose	487	20.4	Analytik ausgewählter Lipidklassen	553
			20.4.1	Gesamtlipidextrakte	553
			20.4.2	Fettsäuren	553
			20.4.3	Unpolare Neutralipide	554

20.4.4	Polare Esterlipide	556	22.4.6	Kolonie- und Plaque-Hybridisierungen	630
20.4.5	Lipidhormone und intrazelluläre Signaltransduktoren	560	22.5	Fragmentisolierung	631
20.5	Lipidvitamine	563	22.5.1	Elektroelution	631
20.6	Ausblick	567	22.5.2	Reinigung über Gelfiltrations- oder Reversed-Phase-Säulen	633
	Weiterführende Literatur	567	22.5.3	Andere Methoden	633
				Weiterführende Literatur	634

Teil IV Nucleinsäure-Analytik

21	Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren	571	23	Hybridisierung und Nachweistechiken	635
21.1	Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	571	23.1	Grundlagen der Hybridisierung	636
21.1.1	Phenolextraktion	571	23.1.1	Prinzip und Durchführung der Hybridisierung	637
21.1.2	Gelfiltration	572	23.1.2	Spezifität der Hybridisierung und Stringenz	638
21.1.3	Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren	573	23.1.3	Hybridisierungsformate	640
21.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	574	23.2	Sonden zur Nucleinsäureanalytik	643
21.2	Isolierung genomischer DNA	576	23.2.1	DNA-Sonden	644
21.3	Isolierung niedermolekularer DNA	578	23.2.2	RNA-Sonden	645
21.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	578	23.2.3	PNA-Sonden	646
21.3.2	Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryontischen Zellen	584	23.3	Markierungsverfahren	647
21.4	Isolierung viraler DNA	585	23.3.1	Markierungspositionen	649
21.4.1	Isolierung von Phagen-DNA	585	23.3.2	Enzymatische Markierungsreaktionen	650
21.4.2	Isolierung von DNA aus eukaryontischen Viren	586	23.3.3	Photochemische Markierungsreaktionen	652
21.5	Isolierung einzelsträngiger DNA	587	23.3.4	Chemische Markierungsreaktionen	652
21.5.1	Isolierung von M13-DNA	587	23.4	Nachweissysteme	653
21.5.2	Trennung von einzel- und doppelsträngiger DNA	588	23.4.1	Färbemethoden	653
21.6	Isolierung von RNA	589	23.4.2	Radioaktive Systeme	654
21.6.1	Isolierung von cytoplasmatischer RNA	590	23.4.3	Nichtradioaktive Systeme	655
21.6.2	Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA	591	23.5	Amplifikationssysteme	666
	Weiterführende Literatur	592	23.5.1	Targetamplifikation	668
			23.5.2	Targetspezifische Signalamplifikation	669
			23.5.3	Signalamplifikation	669
				Weiterführende Literatur	671
22	Aufarbeitung von Nucleinsäuren	593	24	Polymerase-Kettenreaktion	673
22.1	Restriktionsanalyse	593	24.1	Möglichkeiten der PCR	673
22.1.1	Prinzip der Restriktionsanalyse	593	24.2	Grundlagen	675
22.1.2	Historischer Überblick	594	24.2.1	Instrumentierung	675
22.1.3	Restriktionsenzyme	594	24.2.2	Amplifikation von DNA	676
22.1.4	Der Restriktionsansatz und seine Anwendungen	597	24.2.3	Amplifikation von RNA (RT-PCR)	679
22.2	Elektrophorese	603	24.2.4	Optimierung der Reaktion	681
22.2.1	Gelelektrophorese von DNA	605	24.2.5	Quantitative PCR	682
22.2.2	Gelelektrophorese von RNA	612	24.3	Spezielle PCR-Techniken	686
22.2.3	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	614	24.3.1	Nested-PCR	686
22.2.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	617	24.3.2	Asymmetrische PCR	686
22.3	Färbemethoden	621	24.3.3	Einsatz von degenerierten Primern	687
22.3.1	Fluoreszenzfarbstoffe	621	24.3.4	Multiplex-PCR	687
22.3.2	Silberfärbung	623	24.3.5	Cycle-Sequencing	688
22.4	Nucleinsäure-Blotting	624	24.3.6	In-vitro-Mutagenese	688
22.4.1	Blotting-Verfahren	624	24.3.7	Weitere Verfahren	690
22.4.2	Wahl der Membranen	625	24.4	Kontaminationsproblematik	690
22.4.3	Southern-Blotting	626	24.4.1	Vermeidung von Kontaminationen	691
22.4.4	Northern-Blotting	628	24.4.2	Dekontamination	692
22.4.5	Dot- und Slot-Blotting	629	24.5	Anwendungen	693
			24.5.1	Nachweis von Infektionskrankheiten	693
			24.5.2	Nachweis von genetischen Defekten	694
			24.5.3	Humangenomprojekt	698
			24.6	Alternative Verfahren der Amplifikation	699

24.6.1	NASBA (<i>nucleic acid sequence based amplification</i>)	699			
24.6.2	SDA (<i>Strand displacement amplification</i>)	699			
24.6.3	LCR (<i>Ligase-Kettenreaktion</i>)	701			
26.6.4	bDNA (<i>branched DNA amplification</i>)	702			
24.7	Ausblick	703			
	Weiterführende Literatur	703			
25	DNA-Sequenzierung	705			
25.1	Gelgestützte DNA-Sequenzierungsverfahren	709			
	Sequenzierung nach Sanger:				
25.1.1	das Didesoxy-Verfahren	709			
	Markierungstechniken und				
25.1.2	Nachweisverfahren	719			
	Chemische Spaltung nach Maxam				
25.1.3	und Gilbert	724			
	Gelfreie DNA-Sequenzierungsmethoden	731			
25.2		733			
	Weiterführende Literatur				
26	Analyse der genomischen DNA-Methylierung	735			
26.1	Detektionsmethoden der DNA-Basenmethylierung: Definitionen	736			
26.2	Detektionsmethoden	736			
26.2.1	Niedrigste horizontale Auflösung: Detektion und Quantifizierung des Gesamtgehaltes an einem methylierten Nucleosid und seiner Dinucleotid-zusammensetzung	736			
26.2.2	Mittlere horizontale Auflösung: Kartierung einer Teilmenge aller modifizierten Stellen auf Nucleotidsequenz-Ebene	739			
26.2.3	Höchste horizontale Auflösung: Kartierung aller modifizierten Stellen auf Nucleotidsequenz-Ebene	741			
	Weiterführende Literatur	745			
27	Protein-DNA-Wechselwirkungen	747			
27.1	Nachweisverfahren für Protein-DNA-Wechselwirkungen	747			
27.1.1	Filterbindung	748			
27.1.2	EMSA	748			
27.1.3	McKay-Assay	750			
27.1.4	Southwestern und verwandte Techniken	750			
27.2	Analyse der Proteinbindungsstelle auf der DNA	752			
27.2.1	In vitro-Footprints	752			
27.2.2	Weitere in vitro-Methoden zur Analyse von Proteinbindungsstellen auf der DNA	767			
27.2.3	Direkte genomische Sequenzierung und in vivo/in situ-Footprints	767			
27.3	Native elektrophoretische Verfahren zur Analyse von Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur	774			
	Weiterführende Literatur	778			
			Teil V Funktionsanalytik		
			Sequenzdatenanalyse	781	
			28.1 Bioinformatik	782	
			28.1.1 Bioinformatik im Internet	783	
			28.2 Sequenzanalyse	785	
			28.2.1 Sequenzsignale: Funktionale Motive	786	
			28.2.2 Identifizierung codierender Bereiche	787	
			28.2.3 Peptideigenschaften	788	
			28.2.4 Ein neuronales Netz zur Erkennung von Sekretionssignalsequenzen	789	
			28.2.5 Sekundärstrukturanalysen	790	
			28.2.6 Sequenzmotive	794	
			28.3 Phylogenetische Analyse	794	
			28.4 Suche nach homologen Sequenzen	795	
			28.4.1 Identität, Ähnlichkeit und Homologie	796	
			28.4.2 Die Mutationsdatenmatrix (MDM)	796	
			28.4.3 Dotplots	803	
			28.4.4 Optimales Alignment: <i>dynamic programming</i>	803	
			28.4.5 Multiple Alignments	805	
			28.4.6 Alignment für schnelle Datenbanksuchen	807	
			28.4.7 Profilbasierte Datenbanksuchen	808	
			28.5 Wege zur Tertiärstruktur	809	
			28.5.1 Homologiemodellierung	809	
			28.5.2 Threading	809	
			28.5.3 Ab-initio-Strukturvorhersagen	811	
			28.6 Ausblick	812	
			Weiterführende Literatur	813	
			29 Proteomanalyse	815	
			29.1 Methoden der Proteomanalyse	818	
			29.1.1 Definition der Ausgangsbedingungen und Fragestellung	818	
			29.1.2 Probenvorbereitung	819	
			29.1.3 Trennung der Proteine	819	
			29.1.4 Bildverarbeitung und Quantifizierung der Proteine	821	
			29.1.5 Identifizierung und Charakterisierung der Proteine	822	
			29.1.6 Bioinformatik	824	
			29.2 Diskussion und Ausblick	826	
			Weiterführende Literatur	827	
			30 Genomanalyse mit Methoden der molekularen Cytogenetik	829	
			30.1 Die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	830	
			30.1.1 Historischer Überblick und technische Durchführung	830	
			30.1.2 FISH-Sonden	831	
			30.1.3 Nachweis durch Fluoreszenzfarbstoffe	832	
			30.1.4 Experimentelle Durchführung	834	
			30.2 Anwendungen von FISH für die Analyse genomischer DNA	837	
			30.2.1 FISH bei Metaphasechromosomen	837	
			30.2.2 Fiber-FISH	839	

30.2.3	Interphasecytogenetik	840	33.1.2	Nuclease-SI-Analyse von RNA	878
30.2.4	Vergleichende genomische Hybridisierung	840	33.1.3	Ribonuclease-Protektionsassay (RPA)	882
30.2.5	Dreidimensionale Genomstruktur	842	33.1.4	Primerverlängerung (Primer Extension)	885
	Weiterführende Literatur	844	33.1.5	Northern-Blotting, Dot- und Slot-Blotting	886
			33.1.6	Quantitative Polymerasekettenreaktion	888
31	Physikalische und genetische Genkartierung	845	33.2	Analyse der RNA-Syntheserate in vivo (Nuclear-Run-on-Assay)	889
31.1	Genetische Kartierung: Lokalisierung von Loci im Genom	845	33.2.1	Zellaufschluss	889
31.1.1	Rekombination	845	33.2.2	Die Nuclear-Run-on-Transkription und Detektion der Transkripte	890
31.1.2	Genetische Marker	847	33.3	Die in-vitro-Transkription klonierter Gene in Extrakten und Proteinfractionen	890
31.1.3	Kopplungsanalyse - die Erstellung genetischer Karten	849	33.3.1	Komponenten des in-vitro-Transkriptionsansatzes	891
31.1.4	Die genetische Karte des menschlichen Genoms	852	33.3.2	Herstellung transkriptionsaktiver Extrakte und Proteinfractionen	891
31.1.5	Genetische Kartierung von Krankheitsgenen	853	33.3.3	Promotorspezifische Matrizen-DNA und Detektion der in-vitro-Transkripte	892
31.2	Physikalische Kartierung	854	33.4	Die in-vivo-Analyse klonierter Promotoren in Säugerzellen	895
31.2.1	Restriktionskartierung ganzer Genome	854	33.4.1	Plasmidvektoren für die Analyse von ds-aktiven Elementen in Säugerzellen	895
31.2.2	Kartierung mittels rekombinanter Klone	856	33.4.2	Einschleusen von Fremd-DNA in Säugerzellen	897
31.2.3	Erstellung der physikalischen Karte	857	33.4.3	Die Charakterisierung der in-vivo-Transkripte der Monierten Promotoren	898
31.2.4	Isolierung und Identifizierung von Genen	860		Weiterführende Literatur	900
31.2.5	Transkriptkarten des menschlichen Genoms	862			
31.2.6	Gen und vererbare Krankheit - die Mutationssuche	862			
31.3	Integration der Genkarten	863			
31.4	Das Humangenom-Projekt	864			
	Weiterführende Literatur	865			
32	Differentielle Genaktivität	867	34	Protein-Protein-Wechselwirkungen: das Two-Hybrid-System	901
32.1	Grundprinzip des Differential Display	867	34.1	Das Konzept des Two-Hybrid-Systems	902
32.2	Experimentelle Durchführung des Differential Display	868	34.2	Die Elemente des Two-Hybrid-Systems	904
32.2.1	RNA-Isolierung	868	34.3	Konstruktion des Köderproteins für das Two-Hybrid-System und Analyse seiner biologischen Aktivität	905
32.2.2	Synthese der cDNA	868	34.4	Aktivatorfusionsprotein und cDNA-Bibliotheken	908
32.2.3	Amplifikation durch die erste PCR	869	34.5	Durchführung des Two-Hybrid-Screenings	909
32.2.4	Modifikationen der PCR und der Nachweisreaktion	870	34.6	Biochemische und funktionale Analyse der Interaktoren	912
32.2.5	Polyacrylamidgelelektrophorese	870	34.7	Modifizierte Anwendungen und Weiterentwicklungen der Two-Hybrid-Technologie	913
32.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	871		Weiterführende Literatur	914
32.2.7	Northern-Blot-Analyse	871			
32.2.8	Klonierung der cDNAs	872	35	Assoziationen zwischen Makromolekülen: Analytische Ultrazentrifugation	915
32.2.9	Alternative zur Northern-Blot-Analyse: Differential Screening	872	35.1	Instrumentelle Grundlagen	915
32.2.10	Alternativen zur Klonierung	872	35.2	Grundtypen von Experimenten	916
32.3	Leistungsfähigkeit des Differential Display	873	35.3	Sedimentationsgleichgewichts-Experimente	917
32.3.1	Differentielle Hybridisierung	873		Weiterführende Literatur	919
32.3.2	Subtraktionshybridisierung	873			
32.3.3	Stärken des Differential Display	874			
32.3.4	Schwächen des Differential Display	874			
32.4	Einsatzmöglichkeiten des Differential Display	875			
	Weiterführende Literatur	875			
33	Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese	877	36	Gezielte Genmodifikation	921
33.1	Methoden zur Analyse von RNA-Transkripten	877	36.1	In vitro-Mutagenese	922
33.1.1	Überblick	877	36.2	Strategien zur gezielten Gendisruption	924
			36.3	Vom DNA-Konstrukt zur Maus	926

36.3.1	Mikroinjektion von ES-Zellen in Blastocysten und Morulaaggregation von ES-Zellen	926	38	Überexpression	959
36.3.2	Pronucleusinjektion von DNA, virale Infektion	929	38.1	Probleme und Lösungsstrategien	960
36.4	Das Cre/loxP-Rekombinasesystem als Beispiel für einen Genschalter	931	38.1.1	Toxizität	960
36.5	Strategien zur gezielten Genmodifikation unter Verwendung von Genschaltern	932	38.1.2	Proteolyse	960
36.6	Konditionale Mutagenese	935	38.1.3	Translation und Codon-Auswahl	961
Weiterführende Literatur		939	38.1.4	Modifikationen	961
37	Oligonucleotide als zellbiologische Werkzeuge	941	38.1.5	Disulfidverbrückung	962
37.1	Die Geschichte der Oligonucleotide	941	38.1.6	Aggregation und Bildung von Inclusion Bodies (Einschlusskörpern)	962
37.2	Antisense-Oligodesoxyribonucleotide	943	38.2	Möglichkeiten der Überexpression	963
37.2.1	Mögliche Mechanismen der Expressionshemmung	944	38.2.1	Überexpression als Inclusion-Body-Protein	963
37.2.2.	Modifikationen von Oligodesoxyribonucleotiden zur Steigerung der intrazellulären Stabilität	945	38.2.2	Überexpression als Fusionsprotein	963
37.2.3	Kombination von Antisense-Oligodesoxyribonucleotiden mit funktionellen Gruppen	948	38.2.3	Sekretion bei Prokaryonten	967
37.2.4	Antisense-Oligonucleotide als neue Arzneimittel	949	38.2.4	Oberflächenexpression	968
37.2.5	Chimäre Oligodesoxyribonucleotide	950	38.3	Expressions Systeme in <i>E. coli</i>	969
37.3	Triplex-bildende Oligodesoxyribonucleotide	951	38.4	Expression in grampositiven Bakterien	971
37.4	Ribozyme	952	38.5	Expression in Hefe	971
37.5	Aptamere: Hochaffine RNA- und DNA-Oligonucleotide	953	38.5.1	Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	972
37.6	Anwendungen und Ausblick	956	38.5.2	Expression in methylotrophen Hefen	972
Weiterführende Literatur		957	38.5.3	Cytosolische Expression	973
			38.5.4	Sekretion in Hefe	974
			38.6	Genexpression in Insektenzellen	975
			38.7	Expression in Säugerzellkulturen	976
			38.8	Expression in transgenen Tieren	976
			38.9	Expression in pflanzlichen Systemen	977
			Weiterführende Literatur		977
			Anhang		979
			Anhang 1	Strahlenschutz im Labor	981
			Anhang 2	Aminosäuren und posttranslationale Modifikationen	1007
			Anhang 3	Abkürzungen	1011
			Index		1017