

Inhalt

Vorwort	V
1 Biochemische Literatur	1
1.1 Zugang zur allgemeinen biochemischen Literatur	1
1.1.1 Lehrbücher der Biochemie	2
1.1.2 Aktuelle Zusammenfassungen biochemischer Literatur	2
1.1.3 Biochemische Primärliteratur in wissenschaftlichen Zeitschriften	4
1.2 Zugang zur Methoden-orientierten biochemischen Literatur	5
1.2.1 Monographien und Serien	5
1.2.2 Methoden-orientierte biochemische Zeitschriften	6
1.3 Nachschlagewerke und Handbücher	6
1.3.1 Nachschlagewerke	6
1.3.2 Handbücher und Tabellenwerke	7
1.4 Literatursuche	8
1.4.1 Retrospektive Literatursuche	8
1.4.2 Aktuelle Literatursuche	8
1.4.3 Das Internet als Informationsquelle	9
1.5 Protokollführung bei biochemischen Arbeiten	9
1.5.1 Das Protokollbuch	9
1.5.2 Die Gestaltung des Protokolls	9
1.6 Literatur	10
2 Allgemeine Laborpraxis	11
2.1 Das biochemische Laboratorium	11
2.1.1 Geräte, die für jedes Laboratorium vorzusehen sind	11
2.1.2 Geräte, die zwischen mehreren Laboratorien geteilt werden können	12
2.1.3 Kleinteile	12
2.1.4 Gefäße (in verschiedenen Größen, aus Glas, Keramik, Metall und Kunststoff)	13
2.1.5 Einwegmaterial	13
2.1.6 Sicherheitsausstattung	14
2.1.7 Standardchemikalien	14
2.2 Allgemeine Arbeiten im biochemischen Laboratorium	14
2.2.1 Sicherheitsbestimmungen	14
2.2.2 Reinigung von Glas- und Kunststoffgefäßen	15
2.2.3 Abwiegen von Feststoffen	17
2.2.4 Pipettieren und Abmessen von Flüssigkeitsvolumina	18
2.2.5 Herstellung und Lagerung von Lösungen; Wasserqualität und Reinheitsgrad von Chemikalien	20
2.2.6 Temperieren	21

	Inhalt	
VIII		
2.2.7	Schütteln, Rütteln und Rühren	22
2.2.8	Fördern durch Pumpen	24
2.2.9	Puffer	25
2.2.10	Pufferzusätze (Konservierungsstoffe, Komplexbildner, SH-Reagenzien, Detergenzien)	29
2.2.11	pH-Messung	29
2.2.12	Leitfähigkeitsmessung	30
2.3	Arbeiten mit Radioaktivität	31
2.3.1	Radioaktive Isotope und radioaktiver Zerfall	31
2.3.2	Messung der Radioaktivität	33
2.3.2.1	Geiger-Müller-Zählung	33
2.3.2.2	Szintillationszählung	34
2.3.2.3	Autoradiographie	38
2.3.2.4	<i>Imaging</i> Verfahren	38
2.3.3	Alternativen zur Verwendung von Radioaktivität	39
2.4	Literatur	43
3	Probenvorbereitung	45
3.1	Aufschluß von Zellen und Geweben	45
3.1.1	Allgemeine Prinzipien bei der Isolierung von Proteinen und Nukleinsäuren	45
3.1.2	Mechanische Aufschlußverfahren	48
3.1.3	Nicht-mechanische Aufschlußverfahren	49
3.2	Solubilisierung	50
3.3	Fällungsmethoden für Proteine und Nukleinsäuren	52
3.3.1	Fällungsmethoden für Proteine	52
3.3.1.1	TCA-Fällung	53
3.3.1.2	Ammoniumsulfatfällung	53
3.3.1.3	PEG-Fällung	54
3.3.1.4	Fällung durch organische Lösungsmittel	55
3.3.1.5	Hitzefällung	55
3.3.2	Fällungsmethoden für Nukleinsäuren	56
3.3.2.1	TCA-Fällung	56
3.3.2.2	Alkoholfällung	56
3.3.2.3	PEG-Fällung	56
3.4	Dialyse, Ultrafiltration und Lyophilisation	57
3.4.1	Dialyse	57
3.4.2	Ultrafiltration	59
3.4.3	Lyophilisation	62
3.5	Literatur	62
4	Trennungen	65
4.1	Chromatographie	65
4.1.1	Allgemeine Prinzipien und Definitionen	65
4.1.2	Säulenchromatographie	66
4.1.2.1	Niederdruckchromatographie im allgemeinen	66

Inhalt	IX
4.1.2.2 Gelfiltration	72
4.1.2.3 Ionenaustauschchromatographie	78
4.1.2.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie	86
4.1.2.5 Aussalzchromatographie	88
4.1.2.6 Affinitätschromatographie	89
4.1.2.7 Verteilungs- und Adsorptionschromatographie	92
4.1.2.8 HPLC	92
4.1.3 Papier- und Dünnschichtchromatographie	97
4.1.4 Gaschromatographie	100
4.2 Elektrophorese	101
4.2.1 Allgemeine Prinzipien und Definitionen	101
4.2.2 Celluloseacetatfolienelektrophorese	104
4.2.3 Gelelektrophorese	105
4.2.3.1 Polyacrylamidgelelektrophorese	105
4.2.3.2 Agarosegelelektrophorese	115
4.2.4 Isoelektrische Fokussierung	119
4.2.5 2D-Elektrophorese	122
4.2.6 <i>Blotting</i>-Verfahren	123
4.2.7 Auswertung von Elektropherogrammen	125
4.2.8 Kapillarelektrophorese	126
4.2.8.1 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	130
4.2.8.2 Kapillargelelektrophorese (CGE)	130
4.2.8.3 Micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MECC)	131
4.3 Zentrifugation (Hydrodynamik)	131
4.3.1 Quantifizierung	132
4.3.2 Zentrifugen und Rotortypen	134
4.3.2.1 Rotortypen	134
4.3.2.2 Sicherheit und Rotorpflege	136
4.3.2.3 Zentrifugentypen	137
4.3.3 Analytische Zentrifugation	138
4.3.3.1 Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten	138
4.3.3.2 Gleichgewichtszentrifugation	140
4.3.4 Präparative Zentrifugation	142
4.3.4.1 Pelletierungen	142
4.3.4.2 Dichtegradienten	143
4.4 Literatur	145
5 Analytik	149
5.1 Proteinanalytik	149
5.1.1 Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen	149
5.1.1.1 Elektrophorese	150
5.1.1.2 Gelfiltration	150
5.1.1.3 Ultrazentrifugation	150
5.1.1.4 Massenspektrometrie	150
5.1.2 Mengen- bzw. Konzentrationsbestimmungen	150
5.1.2.1 Biuret-, Lowry- und BCA-assay	151

5.1.2.2	Bradford-assay	152
5.1.2.3	Spektrophotometrische Methoden	153
5.1.2.4	Edelhoch-Methode	154
5.1.2.5	Derivativ-Spektroskopie	155
5.1.3	Aminosäureanalyse	155
5.1.4	Endgruppenbestimmung	156
5.1.5	Edman-Abbau	157
5.1.6	Peptidkartierung	159
5.1.6.1	Spaltung mit spezifischen Endopeptidasen	159
5.1.6.2	Chemische Fragmentierung	161
5.1.6.3	Spaltung von Disulfidbrücken	161
5.1.7	Co- und posttranskriptionale Modifikationen	163
5.1.7.1	Phosphorylierung	163
5.1.7.2	Glykosylierung	164
5.1.8	Chemische Modifikation von Proteinen	166
5.1.8.1	Radioaktive Markierung von Proteinen	166
5.1.8.2	Umsetzung von Proteinen mit gruppenspezifischen Reagenzien	167
5.1.8.3	Affinitätsmarkierung	169
5.1.8.4	Cross-linking von Proteinen	171
5.1.9	Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturanalyse	172
5.1.9.1	Primärstruktur	173
5.1.9.2	Sekundärstruktur	175
5.1.9.3	Tertiärstruktur	175
5.1.9.4	Quartärstruktur	176
5.1.10	Messung der Stabilität von Proteinen	176
5.1.11	Peptid- und <i>in-vitro</i> -Proteinsynthese	179
5.1.11.1	Peptidsynthese	179
5.1.11.2	<i>In-vitro</i> -Translation	180
5.2	Nukleinsäureanalytik	182
5.2.1	Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	182
5.2.2	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	182
5.2.3	Basenzusammensetzung	183
5.2.4	Restriktionskartierung	183
5.2.5	Nachweis spezifischer DNA- bzw. RNA-Sequenzen durch Southern- bzw. Northern-blotting	184
5.2.6	Nachweis spezifischer DNA- bzw. RNA-Sequenzen durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	185
5.2.7	Sequenzierung von Nukleinsäuren	190
5.2.8	Messung der Stabilität von doppelsträngigen Nukleinsäuren	193
5.2.9	Oligonukleotidsynthese	195
5.2.10	Markierung und chemische Modifikation von Nukleinsäuren für die praktische Arbeit mit Nukleinsäuren	198
5.3	Enzymatische Analytik	198
5.3.1	Bestimmung der Konzentration von Metaboliten durch direkte Messungen	199
5.3.2	Bestimmung der Konzentration von Metaboliten durch gekoppelte Messungen	200
5.3.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten	201

Inhalt	XI
5.3.3.1 Spektralphotometrische Methoden	201
5.3.3.2 Spektrofluorimetrische Methoden	202
5.4 Literatur	203
 6 Immunologische Methoden	209
6.1 Antikörper	209
6.1.1 Antikörperstruktur	210
6.1.2 Antikörperproduktion	211
6.1.3 Antikörperreinigung	214
6.2 Antigen-Antikörperreaktionen	215
6.2.1 Antigen-Antikörperreaktionen in Lösung	215
6.2.2 Antigen-Antikörperreaktionen in Gelen	215
6.2.2.1 Immunodiffusionstechniken	215
6.2.2.2 Immunelektrophoresetechniken	216
6.2.3 Radioimmunoassay	219
6.2.4 Enzyme linked immunosorbent assay	220
6.2.5 Western blot und dot blot	224
6.2.6 Immunfluoreszenz und Immunogold-Elektronenmikroskopie	224
6.2.7 Fluorescence activated cell sorter	226
6.3 Literatur	226
 7 Physikalisch-chemische Methoden	229
7.1 Spektroskopie	229
7.1.1 Lichtabsorption	230
7.1.1.1 Grundlagen	230
7.1.1.2 Spektralphotometer	232
7.1.2 Fluoreszenz	236
7.1.2.1 Fluoreszenzspektroskopie und Konzentrationsbestimmungen	238
7.1.2.2 Fluoreszenzpolarisation	241
7.1.2.3 Fluoreszenzmikroskopie	243
7.1.2.4 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung intermolekularer Wechselwirkungen	243
7.1.3 Schwingungsspektroskopie	243
7.1.3.1 Infrarotspektroskopie	244
7.1.3.2 Raman-Spektroskopie	245
7.1.4 Anisotrope Spektroskopie	245
7.1.4.1 Circular dichroismus	245
7.1.4.2 Anwendungen	246
7.1.5 Kernresonanzspektroskopie	248
7.1.6 Massenspektroskopie	253
7.2 Streuung	254
7.2.1 Lichtstreuung in Lösung	255
7.2.1.1 Statische Lichtstreuung	255
7.2.1.2 Dynamische Lichtstreuung	257
7.2.1.3 Lichtstremessungen	257
7.2.2 Streuung mit anderen Wellen	259

7.2.2.1	Röntgenkleinwinkelstreuung	259
7.2.2.2	Neutronenstreuung	260
7.3	Wechselwirkungen	260
7.3.1	Gleichgewichtsdialyse	261
7.3.2	Filtrationstechniken zur Bestimmung von Bindungsparametern	262
7.3.3	Chromatographie-, Elektrophorese- und Zentrifugationstechniken zur Bestimmung von Bindungsparametern	263
7.3.4	Biomolekulare Interaktionsanalyse	264
7.3.5	Protektions- bzw. Interferenzexperimente zur Bestimmung von Bindungsparametern	265
7.3.6	Kinetische Messungen	265
7.4	Strukturbestimmungen	268
7.4.1	Röntgenstrukturanalyse	268
7.4.1.1	Kristalle und Kristallzüchtung	268
7.4.1.2	Strukturanalyse	269
7.4.2	Strukturdaten	272
7.4.2.1	<i>Protein Data Bank (PDB)</i>	272
7.4.2.2	<i>Computer Graphics</i>	272
7.5	Literatur	273
8	Mathematische Methoden	275
8.1	Statistik	275
8.1.1	Mittelwerte	276
8.1.2	Verteilungen	277
8.1.2.1	Binomialverteilung	279
8.1.2.2	Poisson-Verteilung	279
8.1.2.3	Normalverteilung nach Gauß	280
8.1.2.4	Beispiele	281
8.2	Auswertung experimenteller Ergebnisse	282
8.2.1	Auswertung von Titrationen	282
8.2.2	Enzymkinetiken	284
8.2.3	Simulationen	288
8.3	Sequenzanalysen	289
8.3.1	Datenbanken	290
8.3.2	Datenstrukturen	291
8.3.3	Vergleichsalgorithmen	291
8.3.3.1	Ähnlichkeitsmatrizen	292
8.3.3.2	FASTA	293
8.3.3.3	Needleman-Wunsch-Algorithmus	294
8.4	Literatur	296
	Anhang I: SI-Einheiten	297
	Anhang II: Umrechnungen in SI-Einheiten	298
	Sachregister	299