

# 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

VIII		Inhalt
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	Hitze-fällung	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	Blotting-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 posttranslationale 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	<i>Cross-linking</i> 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- <i>blotting</i> .....	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	Spektrophotometrische 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	<i>Radioimmunoassay</i> . . . . .	219
6.2.4	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> . . . . .	220
6.2.5	<i>Western blot</i> und <i>dot blot</i> . . . . .	224
6.2.6	Immunfluoreszenz und Immunogold-Elektronenmikroskopie . . . . .	224
6.2.7	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> . . . . .	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	Circulardichroismus . . . . .	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</i> (PDB) .....	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 Titrationsen .....	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