

Friedrich Lottspeich / Haralabos Zorbas (Hrsg.)

# Bioanalytik

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin

Anschrift der Herausgeber:

Dr. Friedrich Lottspeich  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Proteinanalytik  
Am Klopferspitz 18a  
82152 Martinsried

Priv.-Doz. Dr. Haralabos Zorbas  
Ludwig-Maximilians-Universität  
Institut für Biochemie  
Feodor-Lynen-Str. 25  
81377 München



Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme  
**Bioanalytik** / Friedrich Lottspeich ; Haralabos Zorbas (Hrsg.). -  
Heidelberg ; Berlin : Spektrum, Akad. Verl., 1998  
ISBN 3-8274-0041-4

© 1998 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in fremde Sprachen, sind vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages fotokopiert oder in irgendeiner anderen Form reproduziert oder in eine von Maschinen verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden.

Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen, Gebrauchsnamen usw. in diesem Buch berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß diese von jedermann frei benützt werden dürfen.

Es konnten nicht sämtliche Rechteinhaber von Abbildungen ermittelt werden. Sollte dem Verlag gegenüber der Nachweis der Rechtsinhaberschaft geführt werden, wird das branchenübliche Honorar nachträglich gezahlt.

Lektorat: Karin von der Saal, Jutta Liebau (Ass.)  
Redaktion: Friedhelm Glauner, Dr. Katrin Wolf  
Produktion: Elke Littmann  
Chemische Formeln: Dr. Wolfgang Zettlmeier, Laaber-Waldetzenberg  
Graphik: Christiane von Solodkoff, Neckargemünd  
Umschlaggestaltung: Kurt Bitsch, Birkenau  
Satz: Hagedorn Kommunikation, Viernheim  
Druck und Verarbeitung: Franz Spiegel Buch GmbH, Ulm

# Inhaltsübersicht

1 Bioanalytik – eine eigenständige Wissenschaft	1
---	---

## Teil I Proteinanalytik

2 Proteinreinigung	9
3 Proteinbestimmungen	35
4 Enzymatische Aktivitätstests	49
5 Immunologische Techniken	67
6 Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen	103
7 Spektroskopie	131
8 Spaltung von Proteinen	179
9 Chromatographische Trennmethode	195
10 Elektrophoretische Verfahren	217
11 Kapillarelektrophorese	253
12 Aminosäureanalyse	285
13 Proteinsequenzanalyse	297
14 Massenspektrometrie	323

## Teil II 3D-Strukturaufklärung

15 NMR-Spektroskopie von Biomolekülen	371
16 Elektronenmikroskopie	413
17 Röntgenstrukturanalyse	451

## Teil III Spezielle Stoffgruppen

18 Analytik synthetischer Peptide	467
19 Kohlenhydratanalytik	485
20 Lipidanalytik	537

## Teil IV Nucleinsäure-Analytik

21 Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren	571
22 Aufarbeitung von Nucleinsäuren	593
23 Hybridisierung und Nachweistechiken	635
24 Polymerase-Kettenreaktion	673
25 DNA-Sequenzierung	705
26 Analyse der genomischen DNA-Methylierung	735
27 Protein-DNA-Wechselwirkungen	747

## Teil V Funktionsanalytik

28 Sequenzdatenanalyse	781
29 Proteomanalyse	815
30 Genomanalyse mit Methoden der molekularen Cytogenetik	829
31 Physikalische und genetische Genkartierung	845
33 Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese	877
34 Protein-Protein-Wechselwirkungen: das Two-Hybrid-System	901
35 Assoziationen zwischen Makromolekülen: Analytische Ultrazentrifugation	915
36 Gezielte Genmodifikation	921
37 Oligonucleotide als zellbiologische Werkzeuge	941
38 Überexpression	959

<b>Anhang</b>	979
---------------	-----

Index	1017
-------	------

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Bioanalytik – eine eigenständige Wissenschaft</b>	<b>1</b>	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
<b>Teil I Proteinanalytik</b>					
<b>2</b>	<b>Proteinreinigung</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>Immunologische Techniken</b>	<b>67</b>
2.1	Eigenschaften von Proteinen	9	5.1	Antikörper	69
2.2	Proteinlokalisierung und Reinigungsstrategie	13	5.1.1	Antikörper und Immunabwehr	69
2.3	Homogenisierung und Zellaufschluss	14	5.1.2	Antikörper als Reagenz	69
2.4	Die Fällung	17	5.1.3	Eigenschaften von Antikörpern	70
2.5	Zentrifugation	18	5.1.4	Funktionelle Struktur von IgG	71
2.5.1	Grundlagen	20	5.1.5	Antigenbindungsstelle (Haftstelle)	72
2.5.2	Zentrifugationstechniken	21	5.1.6	Handhabung von Antikörpern	73
2.6	Abtrennung von Salzen oder hydrophilen Verunreinigungen	24	5.2	Antigene	73
2.7	Konzentrierung	27	5.3	Antigen-Antikörper-Reaktion	75
2.8	Detergenzien und ihre Entfernung	27	5.3.1	Immunagglutination	76
2.8.1	Eigenschaften von Detergenzien	28	5.3.2	Immunpräzipitation	77
2.8.2	Entfernen von Detergenzien	31	5.3.3	Immunbindung	89
2.9	Probenvorbereitung für die Proteomanalyse	33	5.3.4	Western-Blotting: Proteintransfer, Immobilisierung und Immundetektion	94
	Weiterführende Literatur	33	5.4	Herstellung von Antikörpern	100
<b>3</b>	<b>Proteinbestimmungen</b>	<b>35</b>	5.4.1	Arten von Antikörpern	101
3.1	Quantitative Bestimmung durch Färbetests	37		Weiterführende Literatur	102
3.1.1	Biuret-Assay	39	<b>6</b>	<b>Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen</b>	<b>103</b>
3.1.2	Lowry-Assay	39	6.1	Chemische Modifikation funktioneller Gruppen von Proteinen	104
3.1.3	Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	40	6.2	Modifizierung als Mittel zur Einführung von Reportergruppen	113
3.1.4	Bradford-Assay	41	6.2.1	Untersuchungen an natürlich vorkommenden Proteinen	113
3.2	Spektroskopische Methoden	42	6.2.2	Untersuchungen an überexprimierten oder mutierten Proteinen	117
3.2.1	Messungen im UV-Bereich	43	6.3	Protein-Cross-Linking zur Analyse von Protein-Wechselwirkungen	118
3.2.2	Fluoreszenzmethode	45	6.3.1	Bifunktionelle Reagenzien	119
3.3	Radioaktive Markierung von Peptiden und Proteinen	45	6.3.2	Photoaffinitätsmarkierung	121
3.3.1	Iodierungen	47		Weiterführende Literatur	130
	Weiterführende Literatur	48	<b>7</b>	<b>Spektroskopie</b>	<b>131</b>
<b>4</b>	<b>Enzymatische Aktivitätstests</b>	<b>49</b>	7.1	Physikalische Prinzipien und Messtechniken	132
4.1	Grundlagen der Enzymkinetik	50			
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	<b>10</b>	<b>Elektrophoretische Verfahren</b>	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
<b>8</b>	<b>Spaltung von Proteinen</b>	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	<b>11</b>	<b>Kapillarelektrophorese</b>	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
<b>9</b>	<b>Chromatographische Trennmethode</b>	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	Kapillaraffinitätselektrophorese (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	Einschrittfokussierung	276



<b>16</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b>	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 N-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	Abbildung von Molekülen im 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 N-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 N-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 N-Glykane	509
16.5.2	Rasterkraftmikroskopie	446	19.6.2	Mapping derivatisierter N-Glykane	514
Weiterführende Literatur		448	19.6.3	Mapping mittels Kapillarelektrophorese (HPCE)	517
<b>17</b>	<b>Röntgenstrukturanalyse</b>	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	<sup>1</sup> 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	<b>20</b>	<b>Lipidanalytik</b>	537
<b>Teil III Spezielle Stoffgruppen</b>			20.1	Aufbau und Einteilung von Lipiden	537
<b>18</b>	<b>Analytik synthetischer Peptide</b>	467	20.2	Extraktion von Lipiden aus biologischem Material	539
18.1	Prinzip der Peptidsynthese	467	20.2.1	Flüssigphasenextraktion	539
18.2	Untersuchung der Reinheit synthetischer Peptide	473	20.2.2	Festphasenextraktion	540
18.3	Charakterisierung und Identität synthetischer Peptide	474	20.3	Methoden der Lipidanalytik	542
18.4	Charakterisierung der Struktur synthetischer Peptide	479	20.3.1	Chromatographische Methoden	542
18.5	Analytik von Peptidbibliotheken	480	20.3.2	Massenspektrometrie	547
Weiterführende Literatur		483	20.3.3	Immunoassays	548
<b>19</b>	<b>Kohlenhydratanalytik</b>	485	20.3.4	Weitere Methoden in der Lipidanalytik	548
19.1	Allgemeine stereochemische Grundlagen	486	20.3.5	Online-Kopplung verschiedener Analysesysteme	550
19.1.1	Die Reihe der D-Zucker	486	20.4	Analytik ausgewählter Lipidklassen	553
19.1.2	Stereochemie der D-Glucose	487	20.4.1	Gesamtlipidextrakte	553
			20.4.2	Fettsäuren	553
			20.4.3	Unpolare Neutrallipide	554

20.4.4 Polare Esterlipide 556  
 20.4.5 Lipidhormone und intrazelluläre Signaltransduktoren 560  
 20.5 Lipidvitamine 563  
 20.6 Ausblick 567  
 Weiterführende Literatur 567

22.4.6 Kolonie- und Plaque-Hybridisierungen 630  
 22.5 Fragmentisolierung 631  
 22.5.1 Elektroelution 631  
 22.5.2 Reinigung über Gelfiltrations- oder Reversed-Phase-Säulen 633  
 22.5.3 Andere Methoden 633  
 Weiterführende Literatur 634

**Teil IV Nucleinsäure-Analytik**

**21 Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren 571**  
 21.1 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren 571  
 21.1.1 Phenolextraktion 571  
 21.1.2 Gelfiltration 572  
 21.1.3 Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren 573  
 21.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren 574  
 21.2 Isolierung genomischer DNA 576  
 21.3 Isolierung niedermolekularer DNA 578  
 21.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien 578  
 21.3.2 Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryontischen Zellen 584  
 21.4 Isolierung viraler DNA 585  
 21.4.1 Isolierung von Phagen-DNA 585  
 21.4.2 Isolierung von DNA aus eukaryontischen Viren 586  
 21.5 Isolierung einzelsträngiger DNA 587  
 21.5.1 Isolierung von M13-DNA 587  
 21.5.2 Trennung von einzel- und doppelsträngiger DNA 588  
 21.6 Isolierung von RNA 589  
 21.6.1 Isolierung von cytoplasmatischer RNA 590  
 21.6.2 Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA 591  
 Weiterführende Literatur 592

**22 Aufarbeitung von Nucleinsäuren 593**  
 22.1 Restriktionsanalyse 593  
 22.1.1 Prinzip der Restriktionsanalyse 593  
 22.1.2 Historischer Überblick 594  
 22.1.3 Restriktionsenzyme 594  
 22.1.4 Der Restriktionsansatz und seine Anwendungen 597  
 22.2 Elektrophorese 603  
 22.2.1 Gelelektrophorese von DNA 605  
 22.2.2 Gelelektrophorese von RNA 612  
 22.2.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) 614  
 22.2.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese 617  
 22.3 Färbemethoden 621  
 22.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe 621  
 22.3.2 Silberfärbung 623  
 22.4 Nucleinsäure-Blotting 624  
 22.4.1 Blotting-Verfahren 624  
 22.4.2 Wahl der Membranen 625  
 22.4.3 Southern-Blotting 626  
 22.4.4 Northern-Blotting 628  
 22.4.5 Dot- und Slot-Blotting 629

**23 Hybridisierung und Nachweistechiken 635**  
 23.1 Grundlagen der Hybridisierung 636  
 23.1.1 Prinzip und Durchführung der Hybridisierung 637  
 23.1.2 Spezifität der Hybridisierung und Stringenz 638  
 23.1.3 Hybridisierungsformate 640  
 23.2 Sonden zur Nucleinsäureanalytik 643  
 23.2.1 DNA-Sonden 644  
 23.2.2 RNA-Sonden 645  
 23.2.3 PNA-Sonden 646  
 23.3 Markierungsverfahren 647  
 23.3.1 Markierungspositionen 649  
 23.3.2 Enzymatische Markierungsreaktionen 650  
 23.3.3 Photochemische Markierungsreaktionen 652  
 23.3.4 Chemische Markierungsreaktionen 652  
 23.4 Nachweissysteme 653  
 23.4.1 Färbemethoden 653  
 23.4.2 Radioaktive Systeme 654  
 23.4.3 Nichtradioaktive Systeme 655  
 23.5 Amplifikationssysteme 666  
 23.5.1 Targetamplifikation 668  
 23.5.2 Targetspezifische Signalamplifikation 669  
 23.5.3 Signalamplifikation 669  
 Weiterführende Literatur 671

**24 Polymerase-Kettenreaktion 673**  
 24.1 Möglichkeiten der PCR 673  
 24.2 Grundlagen 675  
 24.2.1 Instrumentierung 675  
 24.2.2 Amplifikation von DNA 676  
 24.2.3 Amplifikation von RNA (RT-PCR) 679  
 24.2.4 Optimierung der Reaktion 681  
 24.2.5 Quantitative PCR 682  
 24.3 Spezielle PCR-Techniken 686  
 24.3.1 Nested-PCR 686  
 24.3.2 Asymmetrische PCR 686  
 24.3.3 Einsatz von degenerierten Primern 687  
 24.3.4 Multiplex-PCR 687  
 24.3.5 Cycle-Sequencing 688  
 24.3.6 In-vitro-Mutagenese 688  
 24.3.7 Weitere Verfahren 690  
 24.4 Kontaminationsproblematik 690  
 24.4.1 Vermeidung von Kontaminationen 691  
 24.4.2 Dekontamination 692  
 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		
<b>25</b>	<b>DNA-Sequenzierung</b>	705		
25.1	Gelgestützte DNA-Sequenzierungsverfahren	709		
25.1.1	Sequenzierung nach Sanger: das Didesoxy-Verfahren	709		
25.1.2	Markierungstechniken und Nachweisverfahren	719		
25.1.3	Chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert	724		
25.2	Gelfreie DNA-Sequenzierungsmethoden	731		
	Weiterführende Literatur	733		
<b>26</b>	<b>Analyse der genomischen DNA-Methylierung</b>	735		
26.1	Detektionsmethoden der DNA-Basemethylierung: 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 Nucleotid- sequenz-Ebene	741		
	Weiterführende Literatur	745		
<b>27</b>	<b>Protein-DNA-Wechselwirkungen</b>	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		
			<b>Teil V Funktionsanalytik</b>	
			<b>28</b>	<b>Sequenzdatenanalyse</b>
			28.1	Bioinformatik
			28.1.1	Bioinformatik im Internet
			28.2	Sequenzanalyse
			28.2.1	Sequenzsignale: Funktionale Motive
			28.2.2	Identifizierung codierender Bereiche
			28.2.3	Peptideigenschaften
			28.2.4	Ein neuronales Netz zur Erkennung von Sekretionssignalsequenzen
			28.2.5	Sekundärstrukturanalysen
			28.2.6	Sequenzmotive
			28.3	Phylogenetische Analyse
			28.4	Suche nach homologen Sequenzen
			28.4.1	Identität, Ähnlichkeit und Homologie
			28.4.2	Die Mutationsdatenmatrix (MDM)
			28.4.3	Dotplots
			28.4.4	Optimales Alignment: <i>dynamic programming</i>
			28.4.5	Multiple Alignments
			28.4.6	Alignment für schnelle Datenbanksuchen
			28.4.7	Profilbasierte Datenbanksuchen
			28.5	Wege zur Tertiärstruktur
			28.5.1	Homologiemodellierung
			28.5.2	Threading
			28.5.3	Ab-initio-Strukturvorhersagen
			28.6	Ausblick
				Weiterführende Literatur
			<b>29</b>	<b>Proteomanalyse</b>
			29.1	Methoden der Proteomanalyse
			29.1.1	Definition der Ausgangsbedingungen und Fragestellung
			29.1.2	Probenvorbereitung
			29.1.3	Trennung der Proteine
			29.1.4	Bildverarbeitung und Quantifizierung der Proteine
			29.1.5	Identifizierung und Charakterisierung der Proteine
			29.1.6	Bioinformatik
			29.2	Diskussion und Ausblick
				Weiterführende Literatur
			<b>30</b>	<b>Genomanalyse mit Methoden der molekularen Cytogenetik</b>
			30.1	Die Technik der Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierung
			30.1.1	Historischer Überblick und technische Durchführung
			30.1.2	FISH-Sonden
			30.1.3	Nachweis durch Fluoreszenzfarbstoffe
			30.1.4	Experimentelle Durchführung
			30.2	Anwendungen von FISH für die Analyse genomischer DNA
			30.2.1	FISH bei Metaphasechromosomen
			30.2.2	Fiber-FISH

30.2.3	Interphasecytogenetik	840	33.1.2	Nuclease-S1-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
<b>31</b>	<b>Physikalische und genetische Genkartierung</b>	<b>845</b>	33.1.6	Quantitative Polymerasekettenreaktion	888
31.1	Genetische Kartierung:		33.2	Analyse der RNA-Syntheserate in vivo (Nuclear-Run-on-Assay)	889
	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 cis-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 klonierten Promotoren	898
31.2.4	Isolierung und Identifizierung von Genen	860		Weiterführende Literatur	900
31.2.5	Transkriptkarten des menschlichen Genoms	862	<b>34</b>	<b>Protein-Protein-Wechselwirkungen: das Two-Hybrid-System</b>	<b>901</b>
31.2.6	Gen und vererbare Krankheit – die Mutationssuche	862	34.1	Das Konzept des Two-Hybrid-Systems	902
31.3	Integration der Genkarten	863	34.2	Die Elemente des Two-Hybrid-Systems	904
31.4	Das Humangenom-Projekt	864	34.3	Konstruktion des Köderproteins für das Two-Hybrid-System und Analyse seiner biologischen Aktivität	905
	Weiterführende Literatur	865	34.4	Aktivatorfusionsprotein und cDNA-Bibliotheken	908
<b>32</b>	<b>Differentielle Genaktivität</b>	<b>867</b>	34.5	Durchführung des Two-Hybrid-Screenings	909
32.1	Grundprinzip des Differential Display	867	34.6	Biochemische und funktionale Analyse der Interaktoren	912
32.2	Experimentelle Durchführung des Differential Display	868	34.7	Modifizierte Anwendungen und Weiterentwicklungen der Two-Hybrid-Technologie	913
32.2.1	RNA-Isolierung	868		Weiterführende Literatur	914
32.2.2	Synthese der cDNA	868	<b>35</b>	<b>Assoziationen zwischen Makromolekülen: Analytische Ultrazentrifugation</b>	<b>915</b>
32.2.3	Amplifikation durch die erste PCR	869	35.1	Instrumentelle Grundlagen	915
32.2.4	Modifikationen der PCR und der Nachweisreaktion	870	35.2	Grundtypen von Experimenten	916
32.2.5	Polyacrylamidgelelektrophorese	870	35.3	Sedimentationsgleichgewichts-Experimente	917
32.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	871		Weiterführende Literatur	919
32.2.7	Northern-Blot-Analyse	871	<b>36</b>	<b>Gezielte Genmodifikation</b>	<b>921</b>
32.2.8	Klonierung der cDNAs	872	36.1	In vitro-Mutagenese	922
32.2.9	Alternative zur Northern-Blot-Analyse: Differential Screening	872	36.2	Strategien zur gezielten Gendisruption	924
32.2.10	Alternativen zur Klonierung	872	36.3	Vom DNA-Konstrukt zur Maus	926
32.3	Leistungsfähigkeit des Differential Display	873			
32.3.1	Differentielle Hybridisierung	873			
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			
<b>33</b>	<b>Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese</b>	<b>877</b>			
33.1	Methoden zur Analyse von RNA-Transkripten	877			
33.1.1	Überblick	877			

36.3.1	Mikroinjektion von ES-Zellen in Blastocysten und Morulaaggregation von ES-Zellen	926	38	<b>Überexpression</b>	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
			38.1.5	Disulfidverbrückung	962
<b>37</b>	<b>Oligonucleotide als zellbiologische Werkzeuge</b>	941	38.1.6	Aggregation und Bildung von Inclusion Bodies (Einschlusskörpern)	962
37.1	Die Geschichte der Oligonucleotide	941	38.2	Möglichkeiten der Überexpression	963
37.2	Antisense-Oligodesoxyribonucleotide	943	38.2.1	Überexpression als Inclusion-Body-Protein	963
37.2.1	Mögliche Mechanismen der Expressionshemmung	944	38.2.2	Überexpression als Fusionsprotein	963
37.2.2.	Modifikationen von Oligodesoxyribonucleotiden zur Steigerung der intrazellulären Stabilität	945	38.2.3	Sekretion bei Prokaryonten	967
37.2.3	Kombination von Antisense-Oligodesoxyribonucleotiden mit funktionellen Gruppen	948	38.2.4	Oberflächenexpression	968
37.2.4	Antisense-Oligonucleotide als neue Arzneimittel	949	38.3	Expressionssysteme in <i>E. coli</i>	969
37.2.5	Chimäre Oligodesoxyribonucleotide	950	38.4	Expression in grampositiven Bakterien	971
37.3	Triplex-bildende Oligodesoxyribonucleotide	951	38.5	Expression in Hefe	971
37.4	Ribozyme	952	38.5.1	Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	972
37.5	Aptamere: Hochaffine RNA- und DNA-Oligonucleotide	953	38.5.2	Expression in methylotrophen Hefen	972
37.6	Anwendungen und Ausblick	956	38.5.3	Cytosolische Expression	972
	Weiterführende Literatur	957	38.5.4	Sekretion in Hefe	973
			38.6	Genexpression in Insektenzellen	974
			38.7	Expression in Säugerzellkulturen	975
			38.8	Expression in transgenen Tieren	976
			38.9	Expression in pflanzlichen Systemen	976
				Weiterführende Literatur	977
			<b>Anhang</b>		979
			<b>Anhang 1</b>	Strahlenschutz im Labor	981
			<b>Anhang 2</b>	Aminosäuren und posttranslationale Modifikationen	1007
			<b>Anhang 3</b>	Abkürzungen	1011
			<b>Index</b>		1017