

Inhaltsverzeichnis

Vorwort v

Glossar xv

Abkürzungen xxiii

1	Herstellung von Lösungen in der biowissenschaftlichen Forschung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Konzentration	2
1.2.1	Molarität	2
1.3	Verwendung einer Waage zum Einwiegen von Reagenzien	3
1.3.1	Verwendung einer elektronischen Waage	3
1.3.2	Verwendung einer Präzisionswaage	5
1.3.3	Verwendung einer Analysenwaage	5
1.4	Praktische Überlegungen bei der Herstellung einer einmolaren Lösung (1,0 M)	6
1.4.1	Herstellung von Lösungen mit einer Konzentration von weniger als 1,0 M und einem Volumen von weniger als einem Liter	7
1.4.2	Herstellen von molaren Flüssigkeitslösungen	9
1.4.3	Herstellen von prozentualen Lösungen	11
1.4.3.1	Einwiegen in Volumen-Lösungen (w/v)	12
1.5	Verdünnungen und die Verwendung von Pipetten	12
1.5.1	Verwendung von zylindrischen Glas- oder Kunststoffpipetten mit Skala	14
1.5.2	Verwendung von Handmikropipetten	15
1.5.3	Verdünnung aus einer Stammlösung	17
1.6	Wasser, Säuren und Basen	18
1.6.1	Wasser als Lösungsmittel	19
1.6.2	Ionisierung von Wasser	20
1.6.3	Säuren und Basen	21
1.6.3.1	Starke und schwache Säuren	22
1.7	Puffer	22
1.7.1	Herstellung eines Puffers und Verwendung eines pH-Messgeräts	23

1.8	Gleichgewichts-/Dissoziationskonstante (K_a) für eine Säure oder Base	25
1.8.1	Henderson-Hasselbalch-Gleichung	26
1.9	Zusammenfassung	27
1.9.1	Hinweise	27
2	Mikroskopie	29
2.1	Einführung	29
2.2	Mikroskope – Allgemeine Grundsätze	31
2.3	Prinzipien der Bilderzeugung	32
2.3.1	Maßeinheiten	32
2.4	Lichtmikroskopie	34
2.4.1	Hellfeldmikroskopie	34
2.4.1.1	Probenpräparation	35
2.4.1.2	Gram-Färbung für Bakterien	37
2.4.1.3	Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Paraffin-Wachsschnitten	38
2.4.2	Phasenkontrastmikroskopie	39
2.4.3	Differentialinterferenzkontrast	39
2.4.4	Fluoreszenzmikroskopie	40
2.4.5	Verwendung eines Lichtmikroskops	43
2.4.5.1	Allgemeine Merkmale von Mikroskopen	43
2.4.5.2	Fokussieren einer Probe	44
2.4.6	Datenanalyse und -Präsentation	46
2.4.6.1	Zeichnen und Beschriften eines Mikroskopbilds	46
2.4.6.2	Größenmessungen mit einem Lichtmikroskop	47
2.4.6.3	Quantifizierung bestimmter Merkmale in mikroskopischen Proben	48
2.4.6.4	Anwendung der Mikroskopie bei der Zellzählung	49
2.5	Elektronenmikroskopie	51
2.6	Zusammenfassung	54
3	Spektralphotometrie	57
3.1	Einführung	57
3.2	Elektromagnetisches Spektrum	57
3.3	Absorption von Licht	60
3.3.1	Fluoreszenz	60
3.3.2	Lumineszenz	61
3.4	UV/VIS-Spektralphotometrie	62
3.5	Gesetzmäßigkeiten der Lichtabsorption	63
3.5.1	Lichtabschwächung (optische Dichte)	64
3.6	Lambert-Beersches Gesetz	64
3.6.1	Beschränkungen des Lambert-Beerschen Gesetzes	66
3.7	Spektralphotometer	67
3.7.1	Einführung	67

3.7.2	Lichtquelle	69
3.7.3	Optik zur Erzeugung der Lichtwellenlängen	69
3.7.4	Spaltbreite	69
3.7.5	Küvette	70
3.7.6	Detektor	72
3.7.7	Verwendung von Mikroplatten-Lesegeräten	72
3.7.7.1	Hochdurchsatz-Screening (HTS)	74
3.8	Anwendungen der Spektralphotometrie in den Biowissenschaften	76
3.8.1	Direkte Messungen von biologischen Molekülen	76
3.8.2	Chromophor-Assays	77
3.8.3	Enzymatisch katalysierte Reaktion	79
3.9	Zusammenfassung	86
3.9.1	Hinweise	86
4	Datenanalyse und Präsentation	87
4.1	Einführung	87
4.2	Statistische Datenanalyse: Wichtige Definitionen	89
4.2.1	Populationen und Stichproben	89
4.2.2	Variablen und Beobachtungen	89
4.2.3	Deskriptive Statistik	90
4.2.4	Messungen zur Streuung (Dispersion)	91
4.3	Verteilungen	93
4.3.1	Normalverteilung	93
4.3.2	Asymmetrische (nicht normale) Verteilung	97
4.3.3	Diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilungen	97
4.4	Statistischer Datenvergleich	98
4.4.1	Vergleich von zwei Gruppen von Werten	99
4.4.1.1	Ungepaarte und gepaarte parametrische Tests (<i>t</i> -Tests)	99
4.4.2	Ungepaarte und gepaarte nicht parametrische Tests	102
4.4.3	Vergleiche von mehreren Datensätzen	103
4.4.4	Chi-Quadrat-Test für dichotome Variablen	104
4.4.5	Analyse der Beziehungen zwischen zwei Variablen: Lineare Korrelation und Regression	104
4.5	Darstellung, Struktur und Organisation von Daten in Laborberichten	108
4.5.1	Präsentation der Daten	109
4.5.2	Inhalt	112
4.5.2.1	Einführung	112
4.5.2.2	Ziele	112
4.5.2.3	Ergebnisse	112
4.5.2.4	Diskussion	112
4.5.2.5	Literaturangaben	113
4.5.3	Artikel in Journalen	113

4.5.4	Artikel in Büchern	114
4.5.5	Software zur Verwaltung von Literaturangaben	114
4.6	Zusammenfassung	114
5	Extraktion und Klärung von biologischen Stoffen	117
5.1	Einführung	117
5.2	Extraktion	117
5.2.1	Proteine	117
5.2.2	Desoxyribonukleinsäure	118
5.2.3	Lipide	119
5.2.4	Organellen	119
5.3	Extraktionsmethoden für tierisches und pflanzliches Gewebe	120
5.3.1	Mörser und Stößel	120
5.3.2	Homogenisatoren und Gewebemühlen	120
5.3.3	Mixer	121
5.4	Extraktionsmethoden für Bakterien	121
5.5	Klärung	123
5.5.1	Einführung in die Zentrifugation	123
5.5.2	Zentrifugen	126
5.5.3	Zentrifugenrotoren	127
5.5.4	Zentrifugenröhrchen	129
5.6	Zentrifugationstechniken	130
5.6.1	Differentialzentrifugation	130
5.6.2	Dichtegradientenzentrifugation	132
5.6.3	Gleichgewichts-Dichtegradientenzentrifugation	132
5.7	Gute Praktiken bei der Zentrifugation	133
5.8	Zusammenfassung	134
5.8.1	Hinweise	135
6	Elektrophorese von Proteinen und Nukleinsäuren	137
6.1	Allgemeine Einführung	137
6.2	Separation von Proteingemischen durch Gel-Elektrophorese	138
6.2.1	Herstellung von Elektrophoresegelelen	138
6.2.2	Probenvorbereitung und Beladung	142
6.2.3	Ablauf der Elektrophorese	144
6.2.4	Praktische Hinweise und Tipps für die SDS-PAGE	148
6.2.4.1	Probenvorbereitung	148
6.2.4.2	Gelvorbereitung	149
6.2.4.3	Auftragen der Probe	149
6.2.4.4	Achtsamkeit während der Elektrophorese	150
6.2.4.5	Entfernung des Gels und Handhabung	150
6.2.4.6	Datenanalyse	151
6.2.4.7	Auswertung	151

6.3	Weitere Elektrophoresetechniken für Proteine	152
6.3.1	Nicht denaturierende (native) Gelelektrophorese	152
6.3.1.1	Andere Anwendungen von nicht denaturierender PAGE: In-situ-Detektion von Enzymaktivität	154
6.3.2	Celluloseacetatfolien-Elektrophorese	156
6.3.3	Western Blotting	156
6.3.4	Isoelektrische Fokussierung (IEF) und zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)	156
6.4	Trennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese	158
6.4.1	Probenvorbereitung	159
6.4.2	Vorbereitung und Anwendung von Agarosegelen	159
6.4.3	Färben von Gelen zum Nachweis von Nukleinsäuren	160
6.5	Anwendungen der Nukleinsäure-Gelelektrophorese	161
6.5.1	DNA-Fingerabdruck und PCR	161
6.5.2	RNA-Analyse	161
6.5.3	Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE)	162
6.5.4	Identifizierung spezifischer Sequenzen mithilfe von Hybridisierungstechniken	163
6.5.5	DNA-Sequenzierung	164
6.6	Zusammenfassung	165
7	Chromatographie	167
7.1	Einführung	167
7.2	Theorie der Chromatographie	167
7.2.1	Verteilungskoeffizient (K_D) in der Chromatographie	169
7.3	Bei der Chromatographie zu berücksichtigende Faktoren	172
7.4	Methoden zur Probenelution in der Chromatographie	174
7.5	Auswahl von Methoden, die zum Pufferaustausch und zur Probenkonzentrierung vor der Chromatographie verwendet werden können	176
7.5.1	Dialyse	176
7.5.2	Größenausschlusschromatographie (auch Gel-Permeations-Chromatographie, GPC)	178
7.5.3	Ultrafiltration	178
7.5.4	Zentrifugalverdampfer	180
7.5.5	Lyophilisierung (Gefriertrocknung)	181
7.6	Vakuumpumpen	182
7.7	Verschiedene Chromatographie-Arten und Eigenschaften, die zur Trennung von Molekülen genutzt werden	182
7.7.1	Adsorptionschromatographie	182
7.7.2	Verteilungschromatographie	183
7.7.3	Ionenaustauschchromatographie	183
7.7.4	Größenausschlusschromatographie (SEC) (auch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC))	184

7.7.5	Affinitätschromatographie	184
7.8	Dünnschichtchromatographie (TLC)	185
7.9	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	186
7.9.1	Normalphasenchromatographie (NP), Umkehrphasenchromatographie (RP), Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) und Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC)	189
7.10	Gaschromatographie (GC)	191
7.11	Ionenaustauschchromatographie (IEX)	192
7.11.1	Antikörperaufreinigung	194
7.12	Größenausschlusschromatographie (SEC) (auch Gel-Permeations-Chromatographie, GPC)	196
7.13	Affinitätschromatographie	198
7.14	Zusammenfassung	199
7.14.1	Hinweise	199
8	Zellkulturtechniken	201
8.1	Einführung	201
8.2	Wachstum und Pflege von Zellkulturen	206
8.2.1	Feste Nährmedien	207
8.2.1.1	Verdünnungsausstrich	207
8.2.1.2	Verdünnung mit Ausbreitungsplatte	210
8.2.1.3	Verdünnung mit Gussplatte	212
8.2.2	Weitere Anwendungen von Kulturmethode in festen Nährmedien	212
8.2.2.1	Bakteriophagen-Nachweis	212
8.2.2.2	Pflanzliche Gewebekultur	214
8.2.3	Flüssige Nährmedien	216
8.2.3.1	Zellsuspensionskulturen	216
8.2.3.2	Alternativen zur Batch-Kultur	217
8.2.4	Flüssigkultur von eukaryotischen Zellen	219
8.2.4.1	Suspensionskultur	219
8.2.4.2	Monolayer-Kultur von Säugetierzellen	220
8.2.5	Zellaussaat für Experimente	221
8.2.6	Kryokonservierung von Zellen	222
8.3	Zusammenfassung	224
8.3.1	Hinweis	224
9	Antikörper-basierte Assays (Immunassays)	225
9.1	Struktur und Verwendung von Antikörpern	225
9.2	Reinigung, Markierung und Nachweis von Antikörpern	227
9.3	Immunassay-Methoden	231
9.3.1	Kompetitive Assays	231
9.3.1.1	Wichtige Schritte bei kompetitiven Immunassays	232
9.3.2	Nicht kompetitive Immunassays	238

9.3.2.1	Indirekter ELISA-Test (eine Stelle)	238
9.3.2.2	Sandwich-ELISA (zwei Bindungsstellen)	242
9.3.2.3	Immunblot	243
9.3.2.4	Dot Blot	244
9.3.2.5	Western Blot	245
9.3.2.6	Immunzytochemische und immunhistochemische Färbung	246
9.4	Kontrollen	250
9.5	Zusammenfassung	250

Vorschläge für weiterführende Literatur 251

Stichwortverzeichnis 255