

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 (*t*-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 Elektrophoresegelen	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 Kulturmethoden 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

