
Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Aufarbeitung in der Biotechnologie.....	1
1.2	Eigenschaften von Plasmid DNA.....	2
1.3	Plasmid DNA und deren Einsatzgebiete.....	5
1.4	Produktion von Plasmid DNA	9
1.4.1	Upstream Processing	9
1.4.2	Downstream Processing.....	10
1.4.3	Alkalische Lyse.....	11
1.4.4	Referenzverfahren zur Plasmidaufreinigung	13
1.4.5	Weitere Aufreinigungsverfahren	14
1.4.6	Regulatorische Anforderungen.....	16
1.5	Historie und Einsatzgebiete der wässrigen Zweiphasenextraktion.....	18
1.5.1	Kurze theoretische Beschreibung.....	20
1.5.2	Veröffentlichungen zur Plasmidaufreinigung mittels wässriger Zweiphasenextraktion.....	23
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	23
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.2	Nukleinsäuren und Biomasse	26
2.3	Ansatz von Phasensystemen	27
2.3.1	Ansätze ohne Biomasse.....	27
2.3.2	Ansätze mit Biomasse	27
2.3.3	Plasmidpräparation im Mikrogramm-Maßstab.....	28
2.4	Versuch zur Maßstabsvergrößerung	28
2.4.1	Durchführung des Referenzverfahrens.....	28

2.4.2	Durchführung der wässrigen Zweiphasenextraktion.....	28
2.5	Nukleinsäureanalytik	31
2.5.1	HPLC.....	31
2.5.2	Agarosegelelektrophorese.....	33
2.5.3	Sequenzierung	34
2.6	Phasendiagramm	34
2.7	Dynamische Lichtstreuung	35
2.8	Flammenphotometrie.....	35
2.9	Filtrationsexperimente	36
2.10	Diagramme	36
3	AUSGANGSSITUATION	37
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
4.1	Integration der alkalischen Lyse in die wässrige Zweiphasenextraktion	40
4.1.1	Einleitung.....	40
4.1.2	Ergebnisse	41
4.1.3	Diskussion	46
4.1.4	Schlußfolgerung	50
4.2	Strukturelle Einflüsse auf die Verteilung von Plasmid DNA.....	50
4.2.1	Einleitung.....	50
4.2.2	Verteilungsstudien	53
4.2.3	Untersuchungen zur Löslichkeit von Plasmiden	57
4.2.4	Coil-Globule Transition	62
4.2.5	Diskussion	66
4.3	Entsalzung durch Membranadsorption	70
4.3.1	Einleitung.....	70
4.3.2	Ergebnisse	71

4.3.3	Diskussion	79
4.4	Feinreinigung mittels wässriger Zweiphasenextraktion	84
4.4.1	Einleitung.....	84
4.4.2	Ergebnisse	85
4.4.3	Diskussion	91
4.5	Versuch zur Maßstabsvergrößerung	95
4.5.1	Einleitung.....	95
4.5.2	Ergebnisse	96
4.5.3	Diskussion	98
4.6	Plasmidpräparation im Mikrogramm-Maßstab.....	101
4.6.1	Einleitung.....	101
4.6.2	Ergebnisse	102
4.6.3	Diskussion	104
5	AUSBLICK.....	106
6	ZUSAMMENFASSUNG	108
7	SUMMARY	111
8	PUBLIKATIONEN	113
8.1	Poster.....	113
8.2	Vorträge.....	113
8.3	Manuskripte	114
8.4	Patentanmeldungen	114
9	REFERENZEN	115
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
11	SYMBOLVERZEICHNIS	126
12	LEBENS LAUF	127