

Inhaltsverzeichnis

Geleitwort *XV*

Vorwort *XVII*

Vorwort zur ersten Auflage *XIX*

Abkürzungen *XXI*

Teil I Grundlagen *1*

- 1** **Elektrophorese** *7*
- 1.1 Allgemeines *7*
- 1.1.1 Elektrophoresen in freier Lösung *7*
- 1.1.2 Elektrophoresen in stabilisierenden Medien *11*
- 1.1.3 Gelelektrophorese *12*
- 1.1.4 Stromversorger *20*
- 1.1.5 Trennkammern *20*
- 1.2 Elektrophoresen in nicht restriktiven Gelen *25*
- 1.2.1 Agarosegelelektrophorese *25*
- 1.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese von niedermolekularen
Substanzen *27*
- 1.3 Elektrophorese in restriktiven Gelen *28*
- 1.3.1 Der Ferguson-Plot *28*
- 1.3.2 Agarosegelelektrophorese *29*
- 1.3.3 Polyacrylamidgelelektrophorese von Nukleinsäuren *31*
- 1.3.4 Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen *34*
- Literatur *48*

- 2** **Isotachophorese** *53*
- 2.1 Wanderung mit gleicher Geschwindigkeit *55*
- 2.2 Trennung der Substanzen in der Form einer Kette *ion train* *55*
- 2.3 Zonenschärfungseffekt *55*

2.4	Konzentrationsregulierungseffekt	56
	Literatur	57
3	Isoelektrische Fokussierung	59
3.1	Prinzip	59
3.2	Gele für die IEF	61
3.2.1	Polyacrylamidgele	61
3.2.2	Agarosegele	63
3.3	Temperatur	64
3.4	Kontrolle des pH-Gradienten	64
3.5	Arten von pH-Gradienten	65
3.5.1	Freie Trägerampholyten	65
3.5.2	Immobilisierte pH-Gradienten	69
3.6	Präparative Isoelektrische Fokussierung	72
3.7	Titrationsskurvenanalyse	73
	Literatur	75
4	Hochauflösende Zweidimensional-Elektrophorese	79
4.1	IEF in IPG-Streifen	79
4.1.1	Streifengeometrie	80
4.1.2	pH-Gradienten	80
4.1.3	Einfluss von Salzen	80
4.1.4	Basische pH-Gradienten	81
4.1.5	Rehydratisieren von IPG-Streifen	82
4.1.6	Probenaufgabe	85
4.1.7	IEF-Bedingungen	87
4.1.8	Instrumentierung	88
4.2	SDS-PAGE	90
4.2.1	Äquilibrieren der IPG-Streifen	90
4.2.2	Technische Konzepte für die zweite Dimension (SDS-PAGE)	91
4.2.3	Geltypen	93
4.2.4	Gelherstellung	94
4.2.5	Durchführung der SDS-Elektrophorese	97
4.3	Proteomik	99
	Literatur	99
5	Proteinprobenvorbereitung	103
5.1	Proteinquantifizierungsmethoden	103
5.2	Vorbereitung von nativen Proben	104
5.3	Proben für die SDS-Elektrophorese	105
5.3.1	SDS-Behandlung	105
5.3.2	Aufreinigung und Proteinanreicherung	109
5.4	Proben für die hochauflösende 2-D-PAGE	110
5.4.1	Waschen von Zellen	111
5.4.2	Zellaufschluss	111

- 5.4.3 Probennahme und -aufbewahrung 112
- 5.4.4 Inaktivierung von Proteasen 114
- 5.4.5 Inaktivierung von Phosphatasen 114
- 5.4.6 Alkalische Bedingungen 114
- 5.4.7 Entfernung von störenden Substanzen 115
- 5.4.8 Vorfraktionierung 116
- 5.4.9 Spezialfall: Pflanzenproteine 117
- Literatur 118

- 6 Proteindetektion 121**
- 6.1 Fixierung 121
- 6.1.1 IEF-Gele 121
- 6.1.2 Agarosegele 122
- 6.1.3 SDS-Polyacrylamidgele 122
- 6.2 Färbungen nach der Elektrophorese 122
- 6.2.1 Organische Farbstoffe 122
- 6.2.2 Silberfärbung 123
- 6.2.3 Negativfärbung 125
- 6.2.4 Fluoreszenzfärbung 126
- 6.2.5 Spezifische Detektion 127
- 6.2.6 Visualisierung ohne Färbung 128
- 6.3 Proteinmarkierung 129
- 6.3.1 Proteinmarkierung mit Fluorophoren 129
- 6.3.2 Radioaktive Markierung von lebenden Zellen 130
- 6.4 Differenzgelelektrophorese (DIGE) 130
- 6.4.1 Minimal-Lysinmarkierung 131
- 6.4.2 Sättigung-Cysteinmarkierung 133
- 6.4.3 Der interne Standard 134
- 6.4.4 Planung eines Experiments 134
- 6.4.5 Die wichtigsten Vorteile von 2-D-DIGE 134
- 6.4.6 Vergleichende Fluoreszenzgelelektrophorese 135
- 6.5 Bildaufzeichnung, Bildanalyse, Spotpicken 136
- 6.5.1 Gehaltsbestimmungen 136
- 6.5.2 Bildaufzeichnungssysteme 138
- 6.5.3 Bildanalyse 141
- 6.5.4 Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen 144
- Literatur 146

- 7 Blotting 151**
- 7.1 Transfermethoden 151
- 7.1.1 Diffusions-Blotting 151
- 7.1.2 Kapillar-Blotting 152
- 7.1.3 Press-Blotting 153
- 7.1.4 Vakuum-Blotting 153
- 7.1.5 Elektrophoretisches Blotting 154

7.2	Blotmembranen	157
7.3	Puffer für elektrophoretische Transfers	158
7.3.1	Proteine	158
7.3.2	Nukleinsäuren	160
7.4	Allgemeine Anfärbung	160
7.5	Blockieren	161
7.6	Spezialdetektion	161
7.6.1	Hybridisierung	161
7.6.2	Enzym-Blotting	162
7.6.3	Immun-Blotting	162
7.6.4	Lektin-Blotting	165
7.6.5	Stripping, Mehrfachanalyse	166
7.6.6	Doppel-Blotting	166
7.7	Proteinsequenzierung	166
7.8	Transferprobleme	166
7.9	Elektroelution von Proteinen aus Gelen	167
	Literatur	169

Teil II Praktische Methodenanleitungen – Ausrüstung und Methoden 173

Methode 1 PAGE von Farbstoffen 183

M1.1	Probenvorbereitung	183
M1.2	Stammlösungen	183
M1.3	Vorbereitung der Gießkassette	184
M1.3.1	Dichtung	184
M1.3.2	Slotformer	184
M1.3.3	Zusammenbau der Gießkassette	185
M1.4	Gießen der ultradünnen Gele	187
M1.5	Elektrophoretische Trennung	187
M1.5.1	Entnahme des Gels aus der Kassette	187

Methode 2 Agarose- und Immunelektrophoresen 191

M2.1	Probenvorbereitung	191
M2.2	Stammlösungen	192
M2.3	Herstellung der Gele	192
M2.3.1	Agarosegelelektrophorese	192
M2.3.2	Immunelektrophoresegele	194
M2.4	Elektrophoresen	198
M2.4.1	Grabar-Williams-Technik	199
M2.4.2	Laurell-Technik	199
M2.5	Proteinnachweis	200
M2.5.1	Coomassie-Färbung (Agaroseelektrophorese)	200
M2.5.2	Immunfixation der Agaroseelektrophorese	200

- M2.5.3 Coomassie-Färbung (Immunelektrophoresen) 201
- M2.5.4 Silberfärbung 202
 - Literatur 202

Methode 3 Titrationskurvenanalyse 203

- M3.1 Probenvorbereitung 203
- M3.2 Stammlösungen 203
- M3.3 Herstellung der leeren Gele 204
 - M3.3.1 Vorbereitung der Gießform 204
 - M3.3.2 Zusammenbau der Gelkassette 205
 - M3.3.3 Befüllen der Gelgießkassette 207
 - M3.3.4 Entnahme des Gels aus der Gießkassette 207
- M3.4 Titrationskurvenelektrophorese 209
 - M3.4.1 Erzeugung des pH-Gradienten (Lauf ohne Probe) 209
 - M3.4.2 Nativelektrophorese im pH-Spektrum 210
- M3.5 Coomassie- und Silberfärbung 210
 - M3.5.1 Kolloidale Coomassie-Färbung 210
 - M3.5.2 Acid-Violet-17-Färbung 211
 - M3.5.3 Fünf-Minuten-Silberfärbung getrockneter Gele 211
- M3.6 Interpretation der Kurven 212
 - Literatur 214

Methode 4 Native PAGE in amphoteren Puffern 215

- M4.1 Probenvorbereitung 216
- M4.2 Stammlösungen 217
- M4.3 Herstellung der leeren Gele 218
 - M4.3.1 Slotformer 218
 - M4.3.2 Zusammenbau der Gießkassette 219
 - M4.3.3 Polymerisationslösungen 220
 - M4.3.4 Befüllen der gekühlten Gelgießkassette 221
 - M4.3.5 Entnahme des Gels aus der Gießkassette 221
 - M4.3.6 Waschen und Trocknen der Gele 222
 - M4.3.7 Quellen des Gels im amphoteren Puffer 222
- M4.4 Elektrophorese 224
- M4.5 Coomassie- und Silberfärbung 226
 - M4.5.1 Kolloidale Coomassie-Färbung 226
 - M4.5.2 Acid-Violet-17-Färbung 227
 - M4.5.3 Fünf-Minuten Silberfärbung getrockneter Gele 227
- Literatur 228

Methode 5 Agarosegel-IEF 231

- M5.1 Probenvorbereitung 231
- M5.2 Herstellung des Agarosegels 232
 - M5.2.1 Hydrophobisierung des Abstandhalters 232
 - M5.2.2 Zusammenbau der Gelkassette 232

M5.2.3	Herstellung der Agaroselösung (0,8 % Agarose)	233
M5.3	Isoelektrische Fokussierung	235
M5.3.1	Herstellung der Elektrodenlösungen	235
M5.4	Proteinnachweis	237
M5.4.1	Coomassie-Blau-Färbung	237
M5.4.2	Immunfixation	237
M5.4.3	Silberfärbung	238
	Literatur	239

Methode 6 PAGIEF in rehydratisierten Gelen 241

M6.1	Probenvorbereitung	241
M6.2	Stammlösungen	241
M6.3	Herstellung der leeren Gele	242
M6.3.1	Hydrophobisierung des Abstandhalters	242
M6.3.2	Zusammenbau der Gelkassette	242
M6.3.3	Befüllen der Gelgießkassette	243
M6.3.4	Entnahme des Gels aus der Gießkassette	244
M6.3.5	Waschen des Gels	244
M6.3.6	Trocknen des Gels	245
M6.4	Isoelektrische Fokussierung	245
M6.4.1	Rehydratisierlösung (Servalyt™, Pharmalyte™)	245
M6.4.2	Quellen des Gels	245
M6.4.3	Proteintrennung	246
M6.4.4	Probenaufgabe	247
M6.5	Coomassie- und Silberfärbung	248
M6.5.1	Kolloidale Coomassie-Färbung	248
M6.5.2	Acid-Violet-17-Färbung	249
M6.5.3	Die empfindlichste Silberfärbung für die IEF	249
M6.6	Methodischer Ausblick	251
	Literatur	253

Methode 7 Horizontale SDS-Polyacrylamidelektrophorese 255

M7.1	Probenvorbereitung	255
M7.1.1	Nicht reduzierende SDS-Behandlung	255
M7.1.2	Reduzierende SDS-Behandlung	256
M7.1.3	Reduzierende SDS-Behandlung mit Alkylierung	257
M7.2	Proteinmarkierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff	257
M7.2.1	Markierung	257
M7.2.2	Detektion	258
M7.3	Stammlösungen für die Gelherstellung	258
M7.4	Vorbereitung der Gießkassette	259
M7.4.1	Herstellen des Slotformers	259
M7.4.2	Zusammenbau der Gießkassette	260
M7.5	Gradienten-Gel	261
M7.5.1	Gießen des Gradientengels	261

M7.6	Elektrophorese	265
M7.6.1	Vorbereitung der Trennkammer	265
M7.6.2	Entnahme des Gels aus der Kassette	265
M7.6.3	Platzierung auf der Kühlplatte	265
M7.6.4	Elektrophorese	267
M7.7	Coomassie- und Silberfärbung	267
M7.7.1	Heiße Coomassie-Färbung	267
M7.7.2	Kolloidalfärbung	268
M7.7.3	Reversible Imidazol-Zink-Negativfärbung	269
M7.7.4	Silberfärbung	270
M7.7.5	Fluoreszenzfärbung mit SERVA Purple	270
M7.8	Blotting	271
M7.9	Methodischer Ausblick	272
M7.9.1	SDS-Elektrophorese in gewaschenen und rehydratisierten Gelen	272
M7.9.2	Trennung von Peptiden	273
	Literatur	274

Methode 8 Vertikale PAGE 275

M8.1	Probenvorbereitung und Proteinmarkierung	276
M8.2	Stammlösungen für die SDS-PAGE	277
M8.3	Gießen von Einzelgelen	278
M8.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele	278
M8.3.2	Gradientengele	279
M8.4	Gießen von Mehrfachgelen	281
M8.4.1	Multiple diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele	282
M8.4.2	Multiple SDS-Polyacrylamidgradientengele	283
M8.5	Elektrophorese	286
M8.6	SDS-Elektrophorese von niedermolekularen Peptiden	288
M8.6.1	Stammlösungen	288
M8.7	Zweidimensional-Elektrophorese	289
M8.8	DNA-Elektrophorese	290
M8.9	Langzeitstabile Gele	291
M8.10	Proteindetektion	291
M8.11	Präparieren von Glasplatten mit Bind-Silan	292
M8.11.1	Beschichten einer Glasplatte mit Bind-Silan	292
M8.11.2	Entfernen von Gel und Bind-Silan von einer Glasplatte	293
	Literatur	293

Methode 9 Blau-Nativ-PAGE 295

M9.1	Solubilisierung	295
M9.2	Stammlösungen	296
M9.3	Gießen der Gele	297
M9.4	Elektrophorese	299
	Literatur	300

Methode 10 Semidry-Blotting von Proteinen 301

- M10.1 Transferpuffer 303
 - M10.1.1 Kontinuierliches Puffersystem 303
 - M10.1.2 Diskontinuierliches Puffersystem 303
 - M10.1.3 Transfers aus Agarosegelen 304
- M10.2 Technische Durchführung 304
 - M10.2.1 Gele ohne Trägerfolie 305
 - M10.2.2 Trägerfoliengebundene Gele 306
 - M10.2.3 Bei Verwendung von Nitrocellulose (NC)-Membran 306
 - M10.2.4 Bei Verwendung einer PVDF-Membran 307
 - M10.2.5 Proteintransfer aus den abgeschnittenen Gelen 308
- M10.3 Färbung von Blotfolien 309
 - M10.3.1 Amidoschwarzfärbung 309
 - M10.3.2 Reversible Färbung 309
 - M10.3.3 Indian-Ink-Färbung 310
- Literatur 311

Methode 11 IEF im immobilisierten pH-Gradienten 313

- M11.1 Probenvorbereitung 314
- M11.2 Stammlösungen 314
- M11.3 Immobilinerezepturen 315
 - M11.3.1 Maßgeschneiderte pH-Gradienten 315
- M11.4 Vorbereitung der Gießkassette 318
 - M11.4.1 Hydrophobisierung des Abstandhalters 318
 - M11.4.2 Zusammenbau der Gießkassette 319
- M11.5 Herstellung der pH-Gradientengele 320
 - M11.5.1 Gießen des Gradienten 321
- M11.6 Isoelektrische Fokussierung 327
 - M11.6.1 Probenaufgabe 327
 - M11.6.2 Elektrodenlösungen 328
 - M11.6.3 Fokussierungsbedingungen 328
 - M11.6.4 Messung des pH-Gradienten 329
- M11.7 Coomassie- und Silberfärbung 329
 - M11.7.1 Kolloidale Coomassie-Färbung 329
 - M11.7.2 Acid-Violet-17-Färbung 330
- M11.8 Strategien der IPG-Fokussierung 331
 - Literatur 332

Methode 12 Hochauflösende Zweidimensional-Elektrophorese 333

- M12.1 Probenvorbereitung 334
 - M12.1.1 Probenaufreinigung 335
 - M12.1.2 Wichtige Hinweise zur kompletten Resolubilisierung der Pellets 335
- M12.2 Proteinmarkierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff 338
 - M12.2.1 Markierung einer Probe 338
 - M12.2.2 Detektion 338

- M12.3 Stammlösungen für die Gelherstellung 339
- M12.4 Gelherstellung 340
 - M12.4.1 IPG-Streifen 340
- M12.5 SDS-Porengradientengele 344
- M12.6 Trennbedingungen 346
 - M12.6.1 Erste Dimension (IPG-IEF) 346
 - M12.6.2 Äquilibrieren 351
 - M12.6.3 Zweite Dimension (SDS-Elektrophorese) 352
- M12.7 Proteindetektion 356
 - M12.7.1 Färben von multiplen Gelen 356
 - M12.7.2 Kolloidalfärbung 358
 - M12.7.3 Reversible Imidazol-Zink-Negativfärbung 358
 - M12.7.4 Silberfärbung 359
 - M12.7.5 Fluoreszenzfärbung mit SERVA Purple 360
- Literatur 361

Methode 13 Zweidimensional-Differenzgelelektrophorese (DIGE) 365

- M13.1 Planung eines Experiments 365
- M13.2 Probenvorbereitung 366
 - M13.2.1 Solubilisierung von DIGE-Proben 366
 - M13.2.2 Rekonstituierung der CyDyes 367
 - M13.2.3 Für Minimalmarkierung der Lysine 367
 - M13.2.4 Für Sättigungsmarkierung der Cysteine 368
- M13.3 DIGE-Markierung 368
 - M13.3.1 Minimalmarkierung der Lysine 368
 - M13.3.2 Sättigungsmarkierung der Cysteine 369
- M13.4 Vorbereitung für die Probenaufgabe auf die IPG-Streifen 371
- M13.5 Detektion der DIGE-Spots 371
- Literatur 372

Methode 14 PAGE von DNA-Fragmenten 373

- M14.1 Stammlösungen 374
 - M14.1.1 Puffersystem I (Tris-Acetat/Tris-Tricin) 374
 - M14.1.2 Puffersystem II (Tris-Phosphat/TBE) 375
- M14.2 Herstellung der Gele 375
 - M14.2.1 Vorbereitung der Gießkassette 375
 - M14.2.2 Herstellen des Slotformers 376
 - M14.2.3 Zusammenbau der Gießkassette 377
 - M14.2.4 Befüllen der Gelgießkassetten 378
 - M14.2.5 Entnahme des Gels aus der Gießkassette 379
 - M14.2.6 Waschen und Trocknen der Gele 379
- M14.3 Probenvorbereitung 379
 - M14.3.1 PCR-Produkte generell 379
 - M14.3.2 SSCP-Proben 380
- M14.4 Elektrophorese 381

M14.4.1	Anquellen von gewaschenen und getrockneten Gelen	381
M14.4.2	Vorbereitung der Elektrodendochte	383
M14.4.3	Entnahme des Gels aus der Kassette	383
M14.4.4	Platzierung auf der Kühlplatte	384
M14.4.5	Probenaufgabe und Elektrophorese	385
M14.5	Silberfärbung	386

Anhang A Problemlösungen 389

A.1	Häufige Fehler	389
A.2	Isoelektrische Fokussierung	392
A.2.1	PAGIEF mit Trägerampholyten	392
A.2.2	Agarosegel-IEF mit Trägerampholyten	401
A.2.3	Immobilisierte pH-Gradienten	406
A.3	SDS-Elektrophorese	413
A.3.1	Horizontale SDS PAGE	413
A.3.2	Vertikale PAGE	422
A.4	Zweidimensional-Elektrophorese	425
A.5	Semidry-Blotting	433
A.6	PAGE von DNA-Fragmenten	440
	Literatur	443

Stichwortverzeichnis 445