

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	XVII
Wörterbuch der elektrophoretischen Termini	XXI

1 Theorie und Grundlagen der Elektrophorese

1.1 Die Elektrophorese und ihre Systematik	1
1.1.1 Überblick über die Elektrophorese	1
Auflösung der Elektrophorese	4
Vergleich zwischen der Elektrophorese und anderen Trennmethoden	4
1.1.2 Wichtigste elektrophoretische Methoden	5
Zonenelektrophorese	6
Isotachophorese	9
Isoelektrische Fokussierung	10
Kombinationen zwischen den wichtigsten elektrophoretischen Methoden	10
Blotting	10
1.2 Die Elektrophorese wird in Puffern durchgeführt	12
1.2.1 Elektrolyte	12
Konzentrationsdissoziationskonstante und Ionenstärke	12
1.2.2 Puffer	16
Pufferkapazität	18
1.2.3 Puffer, die bei der Elektrophorese häufig verwendet werden	19
1.3 Die Proteine und Nukleinsäuren bilden in Lösung Polyionen	22
1.3.1 Elektrische Doppelschicht eines geladenen Teilchens	22
Modell von Helmholtz	22
Modell von Gouy-Chapman	23
Theorie von Debye-Hückel	23
Modell von Stern	24
1.3.2 Struktur und Konformation der Proteine und Nukleinsäuren	25
Struktur der Proteine	25
Struktur der Nukleinsäuren	27
1.3.3 Massen und Ladungen der Proteine und Nukleinsäuren	30
Massen und Ladungen der Proteine	30
Isoelektrischer Punkt eines Proteins	32
Massen und Ladungen der Nukleinsäuren	33
1.3.4 Native und denaturierte Proteine und Nukleinsäuren	33
Denaturierung der Proteine	33
Denaturierung (Schmelzen) der Nukleinsäuren	34
1.4 Die Polyionen bewegen sich in einem elektrischen Feld	36
1.4.1 Gleichung von Smoluchowski	37
1.4.2 Gleichung von Hückel	37
1.4.3 Funktion von Henry	38
1.4.4 Gleichung von Onsager	38
1.4.5 Gleichung von Robinson-Stokes	39
1.4.6 Parameter der Ionenmobilität	39
1.4.7 Quadratische Gleichung der Ionenmobilität	40
1.5 Theorie der Elektrophorese	45
1.5.1 Wovon hängt die Polyionenmobilität ab?	45
Einfluß der Natur des Polyions	46
Einfluß des Puffers	47
Einfluß des Trägers	49

1.5.2	Wovon hängt die Stärke des elektrischen Feldes ab?	50
1.5.3	Theorie der isoelektrischen Fokussierung	51
	Auflösung der isoelektrischen Fokussierung	51
	IEF mit Trägerampholyten	53
	IEF in immobilisierten pH-Gradienten	54
1.5.4	Entwicklung Joulescher Wärme während der Elektrophorese	55
1.6	Die Elektrophorese benötigt spezielle Geräte	56
1.6.1	Elektrophoretische Kammern	56
	Horizontalkammern	57
	Vertikalkammern	57
1.6.2	Stromversorger	58
1.6.3	Thermostate	58
1.6.4	Densitometer	59
	Optik eines Densitometers	59
1.6.5	Gelgießsystem	60
	Gießkassette	61
	Gradientenmischer	61
1.6.6	Puffermischer	62
1.6.7	Blotter	62
1.6.8	Geräte für halbautomatische Elektrophorese	63
1.6.9	Geräte für präparative Elektrophorese	64
1.7	Die Elektrophorese wird in unterschiedlichen Trägern durchgeführt	65
1.7.1	Papier und Dünnschichten	65
1.7.2	Acetylcellulose und Cellogel - Struktur und Eigenschaften	65
	Acetylcellulose-Folien und Cellogel-Streifen	65
1.7.3	Gele	66
1.7.4	Stärkegel - Struktur und Eigenschaften	66
1.7.5	Agarosegel - Struktur und Eigenschaften	66
	Herstellung von Agarosegelen	67
1.7.6	Polyacrylamidgel - Struktur und Eigenschaften	68
	Der Trennbereich hängt von der Polyacrylamidkonzentration ab - Ferguson-Plots	72
	Dünne und ultradünne Polyacrylamidgele	73
	Herstellung von homogenen foliengestützten Polyacrylamidgelen	74
	Kassettentechnik	74
	Klapptechnik	76
	Schiebetechnik	77
	Herstellung von Gradienten-Polyacrylamidgelen auf Haftfolien	77
	Lineare Gradientengele	79
	Exponentielle Gradientengele	80
	Herstellung von netzgestützten Polyacrylamidgelen	80
	Herstellung von Polyacrylamidgelen mit erhöhter Polyolkonzentration	80
	Herstellung von rehydratisierbaren Polyacrylamidgelen	81
<i>Aufgaben 1</i>		85
 2 Elektrophorese der Proteine		
	Papier- und Dünnschicht-Zonenelektrophorese	87
	Stärkegel-Zonenelektrophorese	87
2.1	Acetylcellulose- und Cellogel-Zonenelektrophorese der Proteine	88
2.1.1	Acetylcellulose-Zonenelektrophorese	88
	Acetylcellulose-Zonenelektrophorese von Serumproteinen	88
2.1.2	Cellogel-Zonenelektrophorese	90
<i>Problemlösungen</i>		92

2.2	Agarosegel-Zonenelektrophorese der Proteine.....	94
2.2.1	Agarosegel-Zonenelektrophorese von Serumproteinen	94
	Probenvorbereitung	95
	Elektrophoretische Trennbedingungen	95
2.2.2	Immunelektrophorese.....	98
	Immundiffusions-Elektrophorese nach Grabar und Williams	98
	Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell	99
	Gegenstrom-Immunelektrophorese nach Estela und Heinrichs	100
	Immunfixation	101
	Immunprinting	104
	2D-Immunelektrophorese.....	104
2.2.3	Affinitätselektrophorese	105
	<i>Problemlösungen</i>	106
2.3	Polyacrylamidgel-Zonenelektrophorese der Proteine	109
	Probenvorbereitung	109
2.3.1	Homogengel-Zonenelektrophorese	110
2.3.2	Gradientengel-Zonenelektrophorese	112
	Effekt des Molekülsiebes	112
2.3.3	Ermittlung der Radien und Massen von nativen Proteinen	115
2.3.4	Polyacrylamidgel-Zonenelektrophorese von ladungs- und massenisomeren Proteinen	117
	<i>Problemlösungen</i>	118
2.4	Isotachophorese der Proteine.....	121
2.4.1	"Beharrliche" Funktion von Kohlrausch.....	121
2.4.2	Gleichungen eines diskontinuierlichen Puffersystems.....	125
	<i>Problemlösungen</i>	127
2.5	Kapillarelektrophorese der Proteine	129
2.5.1	Injektion	131
2.5.2	Trennung	131
2.5.3	Detektion	131
2.5.4	Anwendungsbeispiele.....	132
	<i>Problemlösungen</i>	133
2.6	Disk-Elektrophorese der Proteine	135
2.6.1	Disk-Elektrophorese nach Ornstein und Davis	135
	Puffer-Gel-Systeme für die Disk-Elektrophorese nach Ornstein und Davis	137
2.6.2	Disk-Elektrophorese nach Allen et al.	140
	Effekt von Hjerten	140
2.6.3	Disk-Elektrophorese in einem Puffer bei zwei pH-Werten	141
	<i>Problemlösungen</i>	146
2.7	SDS-Elektrophorese der Proteine.....	149
	Vertikale und horizontale SDS-Elektrophorese	152
2.7.1	SDS-Zonenelektrophorese.....	152
	Nichtreduzierende Probenvorbereitung.....	154
	Reduzierende Probenvorbereitung	155
	Reduzierende Probenvorbereitung mit Alkylierung	155
2.7.2	SDS-Disk-Elektrophorese - die verbreitetste elektrophoretische Methode	156
	SDS-Disk-Elektrophorese in homogenen Gelen	156
	SDS-Disk-Elektrophorese in einem TRIS-Chlorid-Glycinat-Puffersystem	156
	SDS-Disk-Elektrophorese in einem TRIS-Formiat-Taurinat-Puffersystem	158
	SDS-Disk-Elektrophorese in Gradientengelen.....	163
	SDS-Disk-Elektrophorese in einem TRIS-Acetat-TRICINat-Puffersystem	163
2.7.3	Färbung der Proteinbanden	165
2.7.4	Blotting nach der SDS-Elektrophorese	166

2.7.5 Bestimmung der Molekülmassen von SDS-denaturierten Proteinen.....	167
<i>Problemlösungen</i>	169
2.8 Isoelektrische Fokussierung der Proteine - eine besondere Art von Elektrophorese	174
2.8.1 Isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten	175
Eigenschaften der Trägerampholyte	175
IEF mit Trägerampholyten in Polyacrylamidgelen	178
Dünne und ultradünne Polyacrylamidgele für IEF mit Trägerampholyten	179
Rehydratisierbare Polyacrylamidgele für IEF mit Trägerampholyten	180
IEF mit Trägerampholyten in Agarosegelen	181
Dünne und ultradünne Agarosegele für IEF	182
Durchführung der IEF in Gelen mit Trägerampholyten	182
2.8.2 Isoelektrische Fokussierung in immobilisierten pH-Gradienten	189
Eigenschaften der Immobililine	189
Dünne und ultradünne IPG-Gele	190
Rehydratisierbare IPG-Gele	195
Durchführung der IEF in IPG-Gelen	196
<i>Problemlösungen</i>	198
2.9 Free-Flow-Elektrophorese der Proteine	206
Theorie der Free-Flow-Elektrophorese	206
2.9.1 Free-Flow-Zonenelektrophorese	208
2.9.2 Free-Flow-Isotachophorese	209
2.9.3 Free-Flow-Isoelektrische-Fokussierung	210
2.9.4 Detektion	211
<i>Problemlösungen</i>	212
2.10 Die Proteine können in zwei Richtungen getrennt werden - die zweidimensionale Elektrophorese	213
2.10.1 Isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension	215
Herstellung von Polyacrylamidgelen mit Trägerampholyten oder IPG-Gelen für die isoelektrische Fokussierung	215
Probenvorbereitung für die erste Dimension	216
Isoelektrische Fokussierung	216
2.10.2 SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension	218
Herstellung von Gelen für die SDS-Elektrophorese	218
SDS-Äquilibration der IEF-Gelstreifen für die zweite Dimension	219
SDS-Elektrophorese	220
2.10.3 Nachweis der Proteine und Auswertung der 2D-Pherogramme	221
<i>Problemlösungen</i>	222
2.11 Präparative Elektrophorese der Proteine	227
2.11.1 Elution der Proteine während der Elektrophorese	227
2.11.2 Elution der Proteine nach der Elektrophorese	229
<i>Problemlösungen</i>	230
2.12 Präparative isoelektrische Fokussierung	233
2.12.1 Präparative IEF mit Trägerampholyten in granulierten Gelen	233
Herstellung eines granulierten Gels	233
Einlegen einer Probe ins granuliert Gel	235
Isoelektrische Fokussierung	236
Isolieren und Elution der Proteine	236
Rezyklisierende isoelektrische Fokussierung	238
2.12.2 Präparative IEF in immobilisierten pH-Gradienten	239
Präparative IEF in dicken IPG-Gelen	239
Kanalfokussierung	240
<i>Problemlösungen</i>	242

2.13 Qualitative Auswertung der Protein-Pherogramme	245
Fixieren	245
Färben	245
Entfärben	246
Trocknen	246
2.13.1 Coomassie-Färbung	246
2.13.2 Silberfärbung der Proteine	250
2.13.3 Glykoproteinfärbung	254
2.13.4 Lipoproteinfärbung	254
2.13.5 Enzymfärbung	255
2.13.6 Immunologische Nachweismethoden	256
2.13.7 Autoradiographie und Fluorographie der Proteine	257
2.13.8 Dokumentation der Protein-Pherogramme	258
Problemlösungen	259
2.14 Quantitative Auswertung der Protein-Pherogramme - Densitometrie	262
2.14.1 Grundlagen der Densitometrie	262
2.14.2 Auflösung eines Densitometers	264
2.14.3 Basislinie und Bandenintegration	265
2.14.4 Auswertung eines Densitogramms	266
2.14.5 Zweidimensionale Densitometrie	266
2.14.6 Densitometriefehler	267
Problemlösungen	268
2.15 Blotting der Proteine - Western-Blotting	270
2.15.1 Blotmembranen	270
2.15.2 Transfer	271
Elektroblotting der Proteine	271
Tankblotting	271
Semidry-Blotting	272
Transferbedingungen	274
2.15.3 Blockierung	275
2.15.4 Detektion durch Sonden und Farbstoffe	275
Problemlösungen	279
2.16 Fertiggele und -kits für Protein-Elektrophorese	282
2.16.1 Fertigkits für Acetylcellulose-Zonenelektrophorese	282
2.16.2 Agarose-Fertiggele und -kits	282
Fertiggele und -kits für Agarosegel-Zonenelektrophorese der Proteine	282
Fertiggele und -kits für Immunfixation und Affinitätselektrophorese	283
2.16.3 Polyacrylamid-Fertiggele und -kits	283
Fertiggele und -kits für Disk-Elektrophorese der Proteine	284
Fertiggele und -kits für SDS-Disk-Elektrophorese der Proteine	285
Fertiggele und -kits für isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten	286
Fertiggele und -kits für isoelektrische Fokussierung mit Immobilynen	286
Fertigkits für Blotting der Proteine	287
Problemlösungen	287
2.17 Klinische Anwendungen der Protein-Elektrophorese	290
2.17.1 Serumprotein-Elektrophorese	290
Albumin	290
Alpha ₁ -Globuline	291
Alpha ₂ -Globuline	293
Beta-Globuline	293
Gamma-Globuline	294
2.17.2 Lipoprotein-Elektrophorese	295
Alpha-Lipoproteine	296

Präbeta-Lipoproteine	296
Beta-Lipoproteine	296
Chylomikronen	296
Hyperlipoproteinämien	296
2.17.3 Immunglobulin-Elektrophorese	298
Struktur und Funktion der Immunglobuline	299
2.17.4 Hämoglobin-Elektrophorese	300
Normale Hämoglobine	301
Anomale und pathologische Hämoglobine	302
Sichelzellanämie	302
Thalassämien	303
Durchführung der Hämoglobin-Elektrophorese	305
2.17.5 Elektrophorese der Kreatin-Kinase	306
Isoenzyme der Kreatin-Kinase und ihre klinische Bedeutung	306
2.17.6 Elektrophorese der Lactat-Dehydrogenase	308
Isoenzyme der Lactat-Dehydrogenase	308
Klinische Bedeutung der LDH-Isoenzyme	309
2.17.7 Elektrophorese der alkalischen Phosphatase	310
Isoenzyme der alkalischen Phosphatase	311
2.17.8 Liquorprotein-Elektrophorese	313
Serumprotein-ähnliches Pherogramm	313
Permeabilitäts-Pherogramm	313
Gamma-Globulin-Pherogramm	313
Laboruntersuchungen bei der multiplen Sklerose	314
Degeneratives Pherogramm	314
2.17.9 Urinprotein-Elektrophorese	314
Proteinurien	315
Problemlösungen	316
Aufgaben 2	323

3 Elektrophorese der Nukleinsäuren

3.1 Submarine-Zonenelektrophorese der Nukleinsäuren	325
3.1.1 Puffer für Submarine-Zonenelektrophorese	326
3.1.2 Herstellung von Agarosegelen für Submarine-Elektrophorese	327
3.1.3 Probenvorbereitung	328
3.1.4 Elektrophoretische Trennbedingungen	328
3.1.5 Ermittlung der Molekülmassen von DNA-Bruchstücken größer als 1 Kilobase	329
3.1.6 Pulsfeld-Zonenelektrophorese	329
3.1.7 Elution der DNA aus Agarosegelen	331
Problemlösungen	332
3.2 Polyacrylamidgel-Zonenelektrophorese der Nukleinsäuren	335
3.2.1 Vertikal-Zonenelektrophorese	335
3.2.2 Horizontal-Zonenelektrophorese	336
3.2.3 Elution der DNA aus Polyacrylamidgelen	340
Problemlösungen	340
3.3 Disk-Elektrophorese der Nukleinsäuren	344
3.3.1 Disk-Elektrophorese von PCR-Produkten	344
Problemlösungen	347
3.4 SDS-Elektrophorese der Nukleinsäuren	351
Problemlösungen	351
3.5 Temperaturgradientengel-Elektrophorese der Nukleinsäuren	354
Problemlösungen	356

3.6	Auswertung der Nukleinsäure-Pherogramme	359
3.6.1	Fluoreszenz-Nachweismethode	359
3.6.2	Silberfärbung der Nukleinsäuren	360
3.6.3	Autoradiographie der Nukleinsäuren	361
	<i>Problemlösungen</i>	362
3.7	Blotting der Nukleinsäuren - Southern- und Northern-Blotting	364
3.7.1	Transfer	364
	Diffusionsblotting	364
	Kapillarblotting	365
	Vakuumblotting	365
	Elektroblotting der Nukleinsäuren	366
3.7.2	Blockierung	366
3.7.3	Detektion mit Sonden und Farbstoffen	367
	<i>Problemlösungen</i>	367
3.8	Fertiggele für die Nukleinsäure-Elektrophorese	369
3.8.1	Agarose-Fertiggele	369
3.8.2	Polyacrylamid-Fertiggele	369
	<i>Problemlösungen</i>	370
	<i>Aufgaben 3</i>	372
4	Gegenwart und Zukunft der Elektrophorese	
4.1	Worauf ist bei der Elektrophorese zu achten?	373
	Gefahr durch Objekte, die zur Untersuchung anstehen	373
	Gefahr durch das Trennmedium	373
	Gefahr durch vor- oder nachelektrophoretische Behandlungen	374
	Gefahr durch elektrophoretische Bedingungen	374
4.2	Tendenzen in der Entwicklung der Elektrophorese	375
	Freie oder Träger-Elektrophorese?	375
	Vertikal- oder Horizontalelektrophorese?	375
	Welche Gele werden bevorzugt?	375
	Selbstproduzierte Gele und Kits, oder Fertiggele und -kits?	375
	Wird die Elektrophorese beschleunigt und automatisiert?	375
	Welche elektrophoretische Methoden haben eine Zukunft?	376
	Werden neue Auswertungsmethoden entwickelt?	376
	Wird die Bedeutung des Blottings steigen?	376
	Wird die Elektrophorese mit nichtelektrophoretischen Methoden verknüpft?	376
Anhang		
	Chronologie der Elektrophorese	379
	SI-Einheiten und physikalische Konstanten für die Elektrophorese	384
	Lösung der Aufgaben	387
	Stichwortverzeichnis	397