

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Quantitative Methoden</b>	<b>1</b>
1.1	Quantitative Proteinbestimmungen	1
1.1.1	Proteinbestimmung nach Lowry u. Mitarb.	2
1.1.2	Proteinbestimmung nach Lowry u. Mitarb. in Gegenwart störender Begleitsubstanzen	4
1.1.3	Proteinbestimmung nach Bradford	5
1.1.4	Proteinbestimmung in Probenlösungen für die SDS-Gelelektrophorese	6
1.1.5	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	7
1.1.6	Mikro-Biuret-Methode	8
1.1.7	Proteinbestimmung durch UV-Messung	8
1.2	Quantitative Nukleinsäurebestimmungen	9
1.2.1	DNS-, RNS- und Proteintrennungsgang nach Schmidt und Thannhauser	9
1.2.2	RNS-Bestimmung mit Orcin	10
1.2.3	DNS-Bestimmung mit Diphenylamin	10
1.2.4	DNS- bzw. RNS-Bestimmung in Gewebehomogenaten	11
1.2.5	Quantitative Nukleinsäurebestimmung durch UV-Messung	12
1.3	Quantitative Phosphatbestimmungen	15
1.3.1	Bestimmung von anorganischem Phosphat	15
1.3.2	Bestimmung von Gesamt-Phosphat	15
1.3.3	Phospholipid-Bestimmung	17
1.4	Monosaccharid-Bestimmung	17
<b>2</b>	<b>Gelelektrophoretische Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Elektrophoresesysteme	19
2.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	21

# VIII Inhaltsverzeichnis

2.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Weber, Pringle und Osborn . . . . .	24
2.1.3	Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	26
2.1.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei pH 2.4 . . . . .	27
2.1.5	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei pH 2 . . . . .	29
2.1.6	Anodisches diskontinuierliches Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem . . . . .	30
2.1.7	Kathodisches diskontinuierliches Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem . . . . .	31
2.1.8	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (O'Farrel-Technik) . . . . .	32
2.1.9	Nicht-denaturierende Nukleinsäure-Elektrophorese . . . . .	35
2.1.10	Denaturierende Nukleinsäure-Elektrophorese . . . . .	37
2.1.11	Identifizierung von Phosphoaminosäuren . . . . .	38
2.2	Hilfsmittel für die Kontrolle der Elektrophorese . . . . .	40
2.2.1	Markerfarbstoffe für die Kontrolle der Elektrophorese . . . . .	40
2.2.2	Eichproteine für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	41
2.2.3	Kovalente Farbmarkierung von Eichproteinen . . . . .	42
2.3	Färbemethoden . . . . .	43
2.3.1	Proteinfärbung mit organischen Farbstoffen . . . . .	43
2.3.2	Silberfärbung von Proteinen (Glutaraldehyd-Fixierung) . . . . .	45
2.3.3	Silberfärbung von Proteinen (Formaldehyd-Fixierung) . . . . .	47
2.3.4	Silberfärbung von Glycoproteinen und Polysacchariden . . . . .	48
2.3.5	Abschwächen von silbergefärbten Gelen . . . . .	49
2.3.6	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulose mit Tusche . . . . .	50
2.3.7	Färbung auf Nitrocellulose mit kolloidalem Gold . . . . .	51

2.3.8	Färbung von Proteolipiden bzw. Lipiden und Lipoproteinen . . . . .	51
2.3.9	Färbung von Glycoproteinen und Polysacchariden mit Schiff'schem Reagenz (PAS staining) . . . . .	52
2.4	Elektroelution aus Gelen . . . . .	53
2.4.1	Quantitative Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen und Entfernung von SDS .	53
2.4.2	Elektrotransfer von Proteinen (Western blot) . .	54
2.4.3	Immunochemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer . . . . .	56
2.4.4	Glycoprotein-Detektion nach Elektrotransfer . .	57
2.4.5	Transfer von Nucleinsäuren . . . . .	58
2.5	Trocknung von Elektrophoresegelen . . . . .	60
2.6	Autoradiographie von $^3\text{H}$ - und $^{35}\text{S}$ -markierten Verbindungen in Elektrophoresegelen . . . . .	61
<b>3</b>	<b>Chromatographische Methoden . . . . .</b>	<b>63</b>
3.1	Dünnschichtchromatographie (DC) . . . . .	63
3.1.1	Dünnschichtchromatographie von modifizierten Aminosäuren (Bestimmung der N-terminalen Aminosäure im Polypeptid) . . . . .	63
3.1.2	Trennung von Nukleosidphosphaten . . . . .	67
3.1.3	Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie von Lipiden . . . . .	69
3.2	Säulenchromatographie . . . . .	71
3.2.1	Konzentrierung von Proteinlösungen . . . . .	71
3.2.2.	Praktische Hinweise zur Säulenchromatographie	74
3.2.3	Vorbehandlung von Ionenaustauscher-Materialien . . . . .	85
3.3	Affinitätschromatographie . . . . .	87
3.3.1	Bromcyanaktivierung von Polysaccharid-Chromatographieträgern . . . . .	90
3.3.2	Kopplung an Bromcyan-aktivierte Gele . . . . .	91
3.3.3	Kopplung von Reaktivfarbstoffen an Polysaccharide . . . . .	93

3.3.4	Kovalente Bindung von Biotin (Biotin-Avidin/Streptavidin-System) . . . . .	94
<b>4</b>	<b>Immunochemische Methoden</b> . . . . .	96
4.1	Heidelberger-Kurve . . . . .	96
4.2	Doppelt-radiale Immunodiffusion nach Ouchterlony . . . . .	98
4.3	Immunelektrophorese . . . . .	100
4.4	Gegenstromelektrophorese . . . . .	101
4.5	dot-blot-Test . . . . .	102
4.6	Enzym-Immunsorbent-Test (EIA bzw. ELISA) . . . . .	103
4.7	Meerrettichperoxidase-Immunoglobulin- Konjugat (Glutaraldehyd-Methode) . . . . .	105
4.8	Alkalische-Phosphatase-Immunoglobulin- Konjugat (Glutaraldehyd-Methode) . . . . .	107
4.9	Protein-kolloidales-Gold-Komplex . . . . .	109
<b>5</b>	<b>Ultrazentrifugation</b> . . . . .	112
5.1	Differentialzentrifugation . . . . .	113
5.2	Dichtegradientenzentrifugation . . . . .	114
5.2.1	Stufengradientenzentrifugation . . . . .	116
5.2.2	Saccharosegradientenzentrifugation . . . . .	117
5.2.3	Isopyknische Zentrifugation . . . . .	120
5.3	Drehzahl-Zentrifugalbeschleunigungs- Nomogramme . . . . .	125
<b>6</b>	<b>Nukleinsäure-Sequenzanalyse (V. Hahn)</b> . . . . .	127
6.1	DNS-Sequenzanalyse . . . . .	127
6.1.1	Chemisches Sequenzierungsverfahren (Maxam-Gilbert-Verfahren) . . . . .	127
6.1.2	Enzymatisches Sequenzierungsverfahren (Sanger-Technik), Prinzip der basenspezifisch beendeten Synthese (Kettentermination) . . . . .	148

6.2	RNS-Sequenzanalyse . . . . .	155
6.2.1	Markierung der RNS . . . . .	156
6.2.2	Sequenzierung der RNS mittels basenspezifischer chemischer Spaltung . . . . .	159
6.2.3	Sequenzierung durch basenspezifische enzymatische Spaltung . . . . .	161
6.2.4	Basenspezifische chemische Spaltung von RNS an einem Träger (Festphasen-Sequenzanalyse) . . . . .	163
<b>7</b>	<b>Markierung mit radioaktiven Isotopen . . . . .</b>	<b>166</b>
7.1	[ <sup>32</sup> P]-Phosphatinkorporation in Proteine . . . . .	167
7.2	Iodierung mit <sup>125</sup> I-Iodverbindungen . . . . .	169
7.3	Radioaktiver Zerfall . . . . .	171
7.4	Zerfallstabellen für Phosphor-32, Schwefel-35 und Iod-125 . . . . .	172
7.5	Szintillator-Lösungen für die Flüssigszintillationsmessung . . . . .	174
<b>8</b>	<b>Puffersysteme und pH-Wert . . . . .</b>	<b>176</b>
8.1	pK-Werte und Molmassen von Puffersubstanzen . . . . .	176
8.2	Diagramm zur Pufferberechnung . . . . .	177
8.3	pH-Farbindikatoren . . . . .	180
8.4	Nomogramm zur Herstellung von Phosphatpuffern mit definierter Ionenstärke . . . . .	182
8.5	Pufferlösungen . . . . .	184
8.6	pH-Eichpuffer . . . . .	188
<b>9</b>	<b>Reinigungsvorschriften für ausgewählte Laborchemikalien . . . . .</b>	<b>190</b>
<b>10</b>	<b>Tabellen . . . . .</b>	<b>193</b>
10.1	Konzentrationsmaße . . . . .	193
10.2	Umrechnung SI-fremder Maßeinheiten in SI-Einheiten . . . . .	193

<b>XII</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
10.3	Molmassen häufig verwendeter Substanzen . . . .	195
10.4	Molmassen und isoelektrischer Punkt von Proteinen . . . . .	198
10.5	Absorptionskoeffizienten von Proteinen . . . . .	199
10.6	Aminosäure-Einbuchstabencode und Molmassen von Aminosäuren . . . . .	201
10.7	Spektroskopische Daten von Nukleotiden . . . .	203
10.8	Stoffwerte von Detergenzien (Tensiden) . . . . .	204
10.9	Brechungsindex und Dichte von Saccharose-Lösungen . . . . .	206
10.10	Ammoniumsulfat-Tabelle . . . . .	207
10.11	Angaben zur Herstellung verdünnter Lösungen .	209
<b>11</b>	<b>Anhang</b> . . . . .	210
11.1	Statistische Formeln . . . . .	210
11.2	BASIC-Programme . . . . .	214
<b>12</b>	<b>Sachverzeichnis</b> . . . . .	219