

Martin Holtzhauer

Biochemische Labormethoden

Zweite, überarbeitete Auflage
Mit 15 Abbildungen



Springer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	XIII
1 Quantitative Methoden	1
1.1 Quantitative Proteinbestimmungen	1
1.1.1 Proteinbestimmung nach LOWRY u. Mitarbeitern	2
1.1.1.1 Standardmethode	2
1.1.1.2 Mikromethode	3
1.1.2 Proteinbestimmung nach LOWRY u. Mitarbeitern in Gegenwart störender Begleitsubstanzen	4
1.1.3 Proteinbestimmung nach BRADFORD	6
1.1.4 Proteinbestimmung in Probenlösungen für die SDS-Gelelektrophorese	7
1.1.5 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	8
1.1.6 Mikro-Biuret-Methode	9
1.1.7 Proteinbestimmung mit BCA (Bicinchoninsäure)	9
1.1.7.1 Standardmethode	10
1.1.7.2 Mikromethode	10
1.1.8 Proteinbestimmung nach KJELDAHL	11
1.1.9 Protein-Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorptionsmessung (Photometrie)	12
1.2 Quantitative Nucleinsäurebestimmungen	14
1.2.1 DNA-, RNA- und Proteintrennungsgang nach SCHMIDT und THANNHAUSER	14
1.2.2 RNA-Bestimmung mit Orcin	15
1.2.3 DNA-Bestimmung mit Diphenylamin	16
1.2.4 DNA- bzw. RNA-Bestimmung in Gewebehomogenaten	17
1.2.5 Quantitative Nucleinsäurebestimmung durch UV-Messung	18
1.3 Quantitative Phosphatbestimmung	20
1.3.1 Bestimmung von anorganischem Phosphat	20
1.3.2 Bestimmung von Gesamt-Phosphat	21
1.3.3 Phospholipid-Bestimmung	22
1.4 Monosaccharid-Bestimmung	23
1.5 Auswertung quantitativer Analysen	23
2 Elektrophorese	27
2.1 Elektrophoresesysteme	27
2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI	29
2.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach WEBER, PRINGLE und OSBORN	34
2.1.3 Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Trennung niedermolekularer Proteine	36

2.1.4	TRICINE-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Proteine und Oligopeptide im Molmassenbereich von 1000 bis 50.000 Dalton	37
2.1.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei pH 2.4	38
2.1.6	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei pH 2	39
2.1.7	Anodisches diskontinuierliches Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem	40
2.1.8	Kathodisches diskontinuierliches Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System	42
2.1.9	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (IEF und SDS-PAGE)	42
2.1.9.1	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)	43
2.1.9.2	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
2.1.10	Nicht-denaturierende Nucleinsäure-Elektrophorese	50
2.1.11	Denaturierende Nucleinsäure-Elektrophorese	51
2.1.12	Identifizierung von Phosphoaminosäuren (Papierelektrophorese)	53
2.2	Hilfsmittel für die Kontrolle der Elektrophorese	55
2.2.1	Markerfarbstoffe für die Kontrolle der Elektrophorese	55
2.2.1.1	Anodische Systeme	55
2.2.1.2	Kathodische Systeme	55
2.2.2	Eichproteine für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
2.2.3	Kovalente Farbmarkierung von Eichproteinen	58
2.3	Färbemethoden	58
2.3.1	Proteinfärbung mit organischen Farbstoffen	58
2.3.1.1	Amidoschwarz 10 B	59
2.3.1.2	Coomassie Brilliant Blue R250 bzw. G250	60
2.3.1.3	Fast Green	61
2.3.1.4	Stains All	61
2.3.2	Silberfärbung von Proteinen (Glutaraldehyd-Fixierung)	62
2.3.2.1	Citrat/Formaldehyd-Entwicklung	62
2.3.2.2	Alkalische Entwicklung	63
2.3.2.3	Silberfärbung mit Wolframatokieselsäure	64
2.3.2.4	Kontraststeigerung nach BERSON	64
2.3.3	Silberfärbung von Proteinen (Formaldehyd-Fixierung)	65
2.3.4	Silberfärbung von Glycoproteinen und Polysacchariden	66
2.3.5	Abschwächen von silbergefärbten Gelen	66
2.3.6	Färbung von Proteinen auf Blotting-Membranen	67
2.3.6.1	Färbungen auf Nitrocellulose-Blotting-Membranen mit Farbstoffen	67
2.3.6.2	Proteinfärbung auf Nitrocellulose-Blotting-Membranen mit Tusche	68
2.3.6.3	Färbung auf Nitrocellulose mit kolloidalem Gold	69
2.3.6.4	Proteinfärbung auf PVDF-Blotting-Membranen mit Farbstoffen	69
2.3.7	Färbung von Proteolipiden bzw. Lipiden und Lipoproteinen	70
2.3.8	Färbung von Glycoproteinen und Polysacchariden	70
2.3.8.1	Färbung mit SCHIFFSchem Reagenz (PAS staining)	70
2.3.8.2	Färbung mit Thymol	71
2.4	Elektroelution aus Gelen	72
2.4.1	Quantitative Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen	72
2.4.2	Entfernung von SDS	73
2.4.3	Elektrotransfer von Proteinen (Western blot)	73

2.4.4	Immunochemischer Antignennachweis nach Elektrotransfer	75
2.4.4.1	Detektion von Meerrettich-Peroxidase (POD)	76
2.4.4.2	Detektion von alkalischer Phosphatase (AP)	76
2.4.5	Chemoluminiszenz-Detektion auf Blotting-Membranen	77
2.4.6	Kohlenhydrat-spezifische Glycoprotein-Detektion nach Elektrotransfer .	78
2.4.7	Allgemeiner Kohlenhydrat-Nachweis auf Western blots	79
2.4.8	Transfer von Nucleinsäuren (SOUTHERN- bzw. Northern-Blot)	81
2.5	Trocknung von Elektrophoresegelen	82
2.6	Autoradiographie von radioaktiv markierten Verbindungen in Elektrophoresegelen	83
3	Chromatographische Methoden	89
3.1	Dünnschichtchromatographie	89
3.1.1	Bestimmung der N-terminalen Aminosäure im Polypeptid (Dünnschichtchromatographie von modifizierten Aminosäuren)	89
3.1.2	Trennung von Nucleosidphosphaten	92
3.1.2.1	Gradienten-Dünnschichtchromatographie	92
3.1.2.2	Nachweis von Phosphaten	93
3.1.3	Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie von Lipiden	93
3.2	Säulenchromatographie	95
3.2.1	Praktische Hinweise zur Säulenchromatographie von Proteinen	95
3.2.2	Konzentrierung von Proteinlösungen	100
3.2.2.1	Säurefällung	100
3.2.2.2	Aussalzen	101
3.2.2.3	Ausfällen mit organischen Verbindungen	101
3.2.2.4	Lyophilisation	102
3.2.2.5	Ultrafiltration	102
3.2.3	Gelfiltration	104
3.2.3.1	Auswahl des Trägermaterials	105
3.2.3.2	Füllen einer Gelfiltrationssäule	106
3.2.3.3	Probenauftrag und Elution	107
3.2.3.4	Reinigung	108
3.2.3.5	Bestimmung von Ausschlußvolumen V_0 und Gesamtvolumen V_t	108
3.2.4	Ionenaustrauschchromatographie	110
3.2.4.1	Vorbehandlung von Ionenaustauscher-Materialien	110
3.2.4.2	Test der Bindungsbedingungen	112
3.2.4.3	Probenauftrag	113
3.2.4.4	Elution	114
3.2.4.5	Reinigung und Regenerierung	115
3.2.5	Hydrophobe Chromatographie	118
3.2.5.1	Test der Bindungsbedingungen	118
3.2.5.2	Elution	118
3.2.5.3	Regenerierung	119
3.3	Affinitätschromatographie	119
3.3.1	Bromcyan-Aktivierung von Polysaccharid-Chromatographieträgern . .	123
3.3.2	Kopplung an Bromcyan-aktivierte Gele	124
3.3.2.1	Bestimmung des gebundenen Diamin-Spacer	125
3.3.3	Herstellung Chlorameisensäureester-aktivierter Perlcellulosen	126
3.3.3.1	Aktivierung mit ClCOONB	126

3.3.3.2	Bestimmung des Aktivierungsgrades von ClCOONB-aktivierter Perlcellulose durch HONB-Messung	126
3.3.4	Kopplung von Liganden an ClCOONB-aktivierte Perlcellulose	127
3.3.4.1	Kopplung von Weizenkeim-Lektin an ClCOONB-aktivierte Perlcellulose	127
3.3.5	Kopplung von Reaktivfarbstoffen an Polysaccharide (Farbstoff-Affinitätschromatographie)	128
3.3.6	Kovalente Bindung von Biotin (Biotin-Avidin/Streptavidin-System)	129
3.4	Hochauflösende Ionenaustausch-Chromatographie (HPIEC) von Mono- und Oligosacchariden	130
4	Immunchemische Methoden	135
4.1	Konjugation von Haptenen (Peptiden) an Carrier-Proteine	135
4.1.1	Aktivierung von Carrier-Proteinen	136
4.1.2	Konjugation	136
4.1.3	Immunisierung	137
4.2	Ammonsulfat-Fraktionierung von Immunoglobulinen	138
4.3	HEIDELBERGER-Kurve	139
4.4	Doppelt-radiale Immunodiffusion nach OUCHTERLONY	140
4.4.1	Reinigung des Agars	141
4.4.2	Vorbereitung der Platten	141
4.4.3	Immundiffusion	142
4.4.4	Sichtbarmachung der Präzipitationslinien	142
4.5	Immunopräzipitation von Antigenen	142
4.6	Immunelektrophorese	144
4.7	Gegenstromelektrophorese	146
4.8	dot-blot-Test	147
4.9	Enzym-Immonsorbent-Test (EIA bzw. ELISA)	148
4.10	Meerrettichperoxidase-Immunoglobulin-Konjugat (Glutaraldehyd-Methode)	150
4.10.1	Affinitätschromatographische Reinigung von Meerrettichperoxidase	150
4.10.2	Affinitätschromatographie von Immunoglobulin	150
4.10.3	Glutaraldehyd-Konjugation	151
4.11	Alkalische Phosphatase-Immunoglobulin-Konjugat (Glutaraldehyd-Methode)	152
4.11.1	Konjugation	152
4.11.2	Indikatorreaktion für AP	152
4.12	Kopplung (Konjugation) von Glycoproteinen	153
4.13	Protein-kolloidales-Gold-Komplex	154
4.13.1	Herstellung des Goldsols	155
4.13.2	Proteinbeladung	156
5	Zentrifugation	159
5.1	Differentialzentrifugation	160
5.2	Dichtegradientenzentrifugation	161
5.2.1	Stufengradientenzentrifugation	162
5.2.2	Saccharosegradientenzentrifugation	163
5.2.2.1	Präparation von Oberflächenmembranen (Sarkolemm, SL) des Herzmuskels	163
5.2.2.2	Enzym-Bestimmung: Oubain-sensitive Na,K-ATPase	167

5.2.2.3 Rezeptor-Bestimmung: DHP-Bindungsstellen in der Oberflächenmembran	169
5.2.2.4 Bestimmung der Dissoziations- und Assoziationskinetik des DHP-Rezeptors	170
5.2.2.5 Nicht-denaturierender Saccharosegradient zur RNA-Trennung	171
5.2.2.6 Denaturierende RNA-Gradientenzentrifugation	172
5.2.3 Isopyknische Zentrifugation	173
5.2.3.1 Reinigung hochmolekularer DNA im CsCl-Gradienten	174
5.2.3.2 Zellfraktionierung mittels Percöll	174
5.2.3.3 Leukozytenpräparation	176
5.3 Drehzahl-Zentrifugalbeschleunigungs-Nomogramme	176
6 Radioaktive Markierung	179
6.1 [³² P]-Phosphat-Inkorporation in Proteine	180
6.2 Iodierung mit [¹²⁵ I]-Iodverbindungen	182
6.2.1 Chloramin-T-Methode	182
6.2.2 Iodierung mit BOLTON-HUNTER-Reagens	183
6.3 Radioaktiver Zerfall	184
6.4 Zerfallstabellen für [³² P]Phosphor, [³⁵ S]Schwefel und [¹²⁵ I]Iod	184
6.5 Szintillator-Lösungen für die Flüssigszintillationsmessung	187
7 Puffersysteme	191
7.1 pK-Werte und Molmassen von Puffersubstanzen	191
7.2 Diagramm zur Pufferberechnung	194
7.3 pH-Farbindikatoren	195
7.4 Pufferlösungen	196
7.4.1 Häufig verwendet Pufferlösungen	197
7.4.2 Puffer bzw. Medien für Gewebe- und Zellkulturen bzw. Organperfusion	200
7.4.3 pH-Eichpuffer	202
7.4.4 Flüchtige Puffer	202
8 Reinigungsvorschriften für ausgewählte Laborchemikalien	205
8.1 Reinigungsmittel	205
8.2 Reinigungsvorschriften für einige Laborchemikalien	206
9 Tabellen	211
9.1 Konzentrationsmaße	211
9.2 Umrechnung SI-fremder Maßeinheiten in SI-Einheiten	211
9.3 Molmassen und andere Stoffdaten häufig verwendet Substanzen	212
9.4 Proteindaten	217
9.5 Protease-Inhibitoren	221
9.6 Aminosäure-Einbuchstabencode und Molmassen der Aminosäuren	222
9.7 Spektroskopische Daten von Nucleotiden	224
9.8 Stoffwerte von Detergenzien (Tensiden)	225
9.9 Brechungsindex und Dichte von Saccharose-Lösungen	226
9.10 Ammoniumsulfat-Tabelle	227
9.11 Angaben zur Herstellung verdünnter Lösungen	229
9.12 Mischungskreuz	230

10	Anhang	233
10.1	Statistische Formeln	233
10.1.1	Mittelwert und zusammenhängende Größen	233
10.1.2	Ausgleichsgerade (lineare Regression)	234
10.1.3	t-Test	235
10.2	Formeln zur Versuchsauswertung	237
10.2.1	Rezeptorbindungsstudien	237
10.2.2	Enzymkinetik	240
10.2.3	Molmassenbestimmung in SDS-Elektropherogrammen	243
10.3	Software für die Laborpraxis	243
10.3.1	Datenauswertung und -präsentation	244
10.3.2	Statistik-Programme	244
10.3.3	Sonstiges	245
	Index	246