

Inhaltsverzeichnis

1	Das tägliche Brot	1
1.1	Puffer herstellen	2
1.2	Protein bestimmen	2
1.2.1	BCA-Test	2
1.2.2	Bradford-Test	4
1.2.3	Lowry-Test	4
1.2.4	Der Starcher-Test	5
1.2.5	Pilztest	6
1.2.6	Weniger beliebte, aber gute Methoden	7
1.3	Gele	8
1.3.1	SDS-Gele	8
1.3.2	Für Eilige: SDS-Elektrophorese ohne Sammelgel	11
1.3.3	Native Gele	12
1.4	Gele färben	13
1.4.1	Fixieren	13
1.4.2	Färben	13
1.4.3	Trocknen	22
1.5	Fällen und Konzentrieren	22
1.5.1	Denaturierende Fällung	23
1.5.2	Native Fällung	23
1.5.3	Konzentrieren	23
1.6	Blottern	25
1.6.1	Proteinfärbung auf Blots	27
1.6.2	Blocken	29
1.6.3	Immunfärbung	30
1.6.4	Ca ²⁺ -Bindung	31
1.6.5	Ligandenfärbung	32
1.6.6	Ablösen von Proteinen von Blots	33
1.7	Autoradiographie von Gelen und Blots	33
2	Ligandenbindung	37
2.1	Radioaktive Ligandenmarkierung	39
2.1.1	Iodierung von Peptiden und Proteinen	39
2.1.2	Iodierung von Molekülen mit niedrigem MG	42
2.1.3	Isolierung einzelner iodierter Spezies	43
2.1.4	Vor- und Nachteile des Iodierens	43
2.1.5	Tritieren	45
2.2	Bindung	46
2.2.1	Isolierung von Membranen	46
2.2.2	Bindungstest	55
2.2.3	Bindungstests mit Membranen	57
2.2.4	Entwicklung von Membranbindungstests	58
2.2.5	Bindungstests mit Proteinen in Lösung	59
2.2.6	Keine Bindung, was tun?	77

2.3	Auswertung von Bindungsdaten	78
2.3.1	Die Bindung ist im Gleichgewicht	79
2.3.2	Kinetik	91
2.4	Vernetzen von Liganden	94
2.4.1	Dreikomponentenvernetzung (3K-Vernetzung)	94
2.4.2	Photoaffinitätsvernetzung	99
2.4.3	Kontrollen bei Vernetzungsversuchen	100
2.4.4	Vernetzung nicht-radioaktiver Liganden	104
2.5	Sinniges	104
3	Membranproteine solubilisieren	109
3.1	Seifen	111
3.1.1	Saubere Begriffe	111
3.1.2	Vom Umgang mit Seifen	111
3.2	Solubilisieren	116
3.2.1	Solubilisierungskriterien	122
3.2.2	Physikalische Parameter solubilisierter Membranproteine	123
3.2.3	Wie werde ich die Seife wieder los?	125
4	Rekonstitution von Proteinen	127
4.1	Rekonstitution der Tertiärstruktur löslicher Proteine	128
4.2	Rekonstitution von Membranproteinen in Membranen	130
4.2.1	Einleitung	130
4.2.2	Liposomen	131
4.2.3	Proteoliposomen	133
4.2.4	Rekonstitution in Membranen	134
4.2.5	Nachweis der Rekonstitution in Membranen durch Fluxtests	136
4.2.6	Aufbauende Überlegungen	142
5	Säubern und Putzen	143
5.1	Putziges	144
5.2	Konventionelle Reinigungsmethoden	147
5.2.1	Reinigung nach Hydrophobizität	147
5.2.2	Reinigung nach Größenunterschieden	152
5.2.3	Reinigung nach Ladungsunterschieden	155
5.2.4	Das Blaugel	164
5.2.5	Zeolit-Chromatographie	164
5.3	Affinitätschromatographie	166
5.3.1	Lektinchromatographie	166
5.3.2	Ligandenchromatographie	168
5.4	Unkonventionelle Reinigungsmethoden	176
5.4.1	Nichtzerstörende präparative Massenspektrometrie	176
5.5	Die Reinheitsprobe	179
5.6	Ausschlachten	180

6	Antikörper	183
6.1	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	187
6.1.1	Antigen	187
6.1.2	Adjuvans	188
6.1.3	Injektion und Serumgewinnung	188
6.1.4	Reinigung von Antikörpern	190
6.2	Immunpräzipitation	191
6.2.1	Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein A	191
6.2.2	Immunpräzipitation mit immobilisiertem Antikörper	192
6.2.3	Nachweis präzipitierter Antigene mit biotinylierten Antikörpern	193
6.3	Immunoaffinitätschromatographie	195
6.4	Antikörper gegen ungereinigte Proteine	195
6.5	Immunologische Nachweistechniken	196
6.5.1	Dot-Blots	197
6.5.2	Elisa	198
6.5.3	Signalverstärkung bei Immunoassays	201
7	Proteomics	209
7.1	Einführung	210
7.2	Probennahme	213
7.2.1	Laserklebetechnik	214
7.3	2D-Gelelektrophorese und andere mehrdimensionale Trenntechniken	217
7.3.1	Probenvorbereitung in der 2DE	217
7.3.2	Vorfraktionieren für die 2DE	220
7.3.3	Die Technik der 2DE	227
7.4	Proteine spalten	240
7.4.1	Proteasenverdau	241
7.4.2	Bromcyan- und Säurespaltung	243
7.5	Massenspektrometrie von Proteinen und Peptiden	243
7.5.1	Einführung	243
7.5.2	Ionenquellen und Probenvorbereitung	244
7.5.3	Analysatoren und Detektoren	257
7.5.4	MS-Parameter und Spektreninterpretation	263
7.5.5	Peptidmassen Fingerabdruck	272
7.5.6	Peptidsequenzierung mit der MS	273
7.5.7	Möglichkeiten der MS mit ESI-Quellen	293
7.5.8	Möglichkeiten der MS mit MALDI-Quellen	302
7.5.9	Bildgebende Massenspektrometrie	309
7.5.10	MS-Strategie	309
7.6	Proteinchips	311
7.6.1	Antikörperchips	311
7.6.2	Aptamere	314
7.7	Aussterbende Dinosaurier?	315
7.7.1	Blockierte N-Termini	316
7.7.2	Der Edman-Abbau	317
7.7.3	Carboxyterminale Sequenzierung	319

7.8	Rehm's Proteomics-Philosophie	321
7.9	Letzel's Proteomics-Philosophie	322
8	Untereinheiten	323
8.1	Stöchiometrie & Merigkeit	324
8.1.1	Über die Schwierigkeiten bei Stöchiometriebestimmungen	324
8.1.2	S&M mit Röntgenstrukturanalyse	325
8.1.3	S&M mit Hybridisierungsexperimenten	325
8.1.4	S&M mit Vernetzungsexperimenten	328
8.1.5	S&M mit Aminosäureanalysen oder Antikörpern	335
8.2	Was unsre Welt im Innersten zusammenhält	336
9	Glykoproteine	339
9.1	Wie, wo und wozu werden Proteine glykosyliert?	340
9.2	Nachweis von Glykoproteinen in Gelen	341
9.3	Nachweis von Glykoproteinen auf Blots	341
9.3.1	Nichtselektive Glykoproteinfärbung	341
9.3.2	Selektive (Lektin-)Färbung	341
9.4	Deglykosylierung	343
9.4.1	Glykosylierungshemmer	343
9.4.2	Endoglykosidasen	346
9.4.3	Chemische Deglykosylierung	350
9.4.4	Massenspektrometrische Deglykosylierung	352
9.5	Die Zuckerketten	353
9.5.1	Monosaccharidzusammensetzung	353
9.5.2	Aufbau und Sequenz	353
10	Der Schatz im Silbersee	363
10.1	Vom Paper	364
10.2	Vom Schreiben eines Papers	364
11	Durch die Wüste	367
12	Unter Geiern	371
12.1	Lieferanten	372
12.2	Lieferanten gegliedert nach Produkten	375
	Das Letzte	377
	Index	379