

Inhaltsverzeichnis

Geleitwort *XV*

Vorwort *XVII*

Vorwort zur ersten Auflage *XIX*

Abkürzungen *XXI*

Teil I **Grundlagen** *I*

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 Agarosegelektrophorese *25*

1.2.2 Polyacrylamidgelektrophorese von niedermolekularen Substanzen *27*

1.3 Elektrophorese in restriktiven Gelen *28*

1.3.1 Der Ferguson-Plot *28*

1.3.2 Agarosegelektrophorese *29*

1.3.3 Polyacrylamidgelektrophorese von Nukleinsäuren *31*

1.3.4 Polyacrylamidgelektrophorese 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	Titrationskurvenanalyse	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 Gießkassette	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 TM , Pharmalyte TM)	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 Immobilinerezepuren	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 Gelkassette	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-Porengradienten gele	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