

Horst Wagner · Ewald Blasius (Hrsg.)

# Praxis der elektrophoretischen Trennmethoden

Mit 141 Abbildungen und 42 Tabellen



Springer-Verlag  
Berlin Heidelberg New York  
London Paris Tokyo

# Inhaltsverzeichnis

## Theorie der elektrischen Wanderung

(H. Wagner, R. Kuhn, S. Hoffstetter)

1 Einleitung .....	1
2 Grundlagen .....	1
3 Einflüsse auf die Wanderungsgeschwindigkeit .....	2
3.1 Eigenschaften des geladenen Teilchens .....	3
3.2 Eigenschaften des Mediums .....	5
3.2.1 Einfluß der Ionenstärke .....	5
3.2.2 Einfluß des pH-Wertes .....	6
3.2.3 Einfluß der Komplexbildnerkonzentration .....	8
3.2.4 Einfluß der Temperatur .....	8
3.2.5 Einfluß des elektrischen Feldes .....	9
3.2.6 Einfluß des Trägermaterials .....	10
3.2.6.1 Ionenwanderung im Träger .....	10
3.2.6.2 Elektroosmose .....	11
3.2.6.3 Sogströmung .....	11
4 Prinzipien elektrophoretischer Trennmethoden .....	11
4.1 Zonenelektrophorese .....	11
4.2 Methode der wandernden Grenzflächen .....	12
4.3 Isotachophorese .....	14
4.4 Isoelektrische Fokussierung .....	17
Literatur .....	19

## Praxis der eindimensionalen Gelelektrophorese

(G. M. Rothe)

1 Allgemeines zur Arbeitstechnik .....	21
2 Elektrophoreseapparaturen .....	22
2.1 Geräte für die horizontale Elektrophorese .....	22
2.2 Geräte für die vertikale Elektrophorese .....	24

3 Die einzelnen Elektrophoreseverfahren .....	25
3.1 Die Cellogel- und Zelluloseacetat-Elektrophorese .....	25
3.1.1 Die Cellogel-Elektrophorese .....	25
3.1.1.1 Anwendungsbeispiele .....	29
3.1.1.1.1 Lipoprotein-Muster im Zuge von Hyperlipämien	29
3.1.1.1.2 LDH-Muster .....	30
3.1.2 Die Zelluloseacetat-Elektrophorese .....	30
3.1.2.1 Vorbereitung der Membranen und Einsatz in der Elektrophoreseapparatur .....	30
3.1.2.2 Anwendungsbeispiele .....	33
3.1.2.2.1 Adenylat Kinase .....	33
3.2 Die Agar- und Agarose-Elektrophorese .....	34
3.2.1 Eigenschaften von Agar und Agarose .....	34
3.2.2 Allgemeines zur Agarose-Elektrophorese .....	35
3.2.3 Herstellung von Agarose Flachgelen zur Trennung von DNA-Molekülen nach Schaffner .....	36
3.2.4 Aufbau einer Flachgelelektrophorese-Apparatur zur Trennung von DNA-Molekülen .....	38
3.2.5 Probenauftrag .....	38
3.2.6 Anfärben auf DNA .....	39
3.2.7 Bestimmung der Molmasse von DNA-Bruchstücken .....	40
3.2.8 Elution der DNA aus Agarosegelen .....	42
3.2.9 Anwendungsbeispiel .....	43
3.3 Die Stärkegel-Elektrophorese .....	43
3.3.1 Herstellung von Stärkegelen .....	44
3.3.2 Apparative Ausrüstung .....	45
3.3.3 Anwendungsbeispiele .....	45
3.4 Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	47
3.4.1 Allgemeines zur Technik .....	47
3.4.2 Homogene Gele .....	48
3.4.2.1 Bestimmung der Größe von DNA-Bruchstücken < 1 Kilobasen .....	48
3.4.2.1.1 Abhängigkeit des Fraktionierbereiches von der Polyacrylamid Konzentration .....	48
3.4.2.1.2 Herstellung homogener Flachgele .....	48
3.4.2.1.3 Elektrophoresebedingungen .....	49
3.4.2.1.4 Elution von DNA aus Polyacrylamidgelen .....	50
3.4.2.1.5 Herstellung dünner Flachgele .....	51
3.4.2.2 Die Bestimmung verschiedener Isozym-Typen .....	52
3.4.2.2.1 Definition des Begriffs Isozym .....	52
3.4.2.2.2 Herstellen der Gel- und Elektrodenlösungen ..	53
3.4.2.2.3 Eichbeziehungen zur Ermittlung von Ladungs- bzw. molmassenisomeren Isozymen ..	53
3.4.2.3 Molmassenbestimmung in homogenen SDS-Gelen .....	54
3.4.2.3.1 Allgemeines zur Technik .....	54
3.4.2.3.2 Die Verwendung homogener Gele .....	55

3.4.3 Gradientengel-Elektrophorese .....	62
3.4.3.1 Allgemeines zur Technik .....	62
3.4.3.2 Das Herstellen linearer Gradientengele .....	63
3.4.3.2.1 Die Herstellung von Glaskassetten .....	63
3.4.3.2.2 Das Gießen linearer Gelgradienten .....	65
3.4.3.3 Die Bestimmung der molekularen Größe nativer Proteine .....	67
3.4.3.3.1 Die Bestimmung der maximalen Wanderungsstrecke von Proteinen .....	68
3.4.3.3.2 Das Trennverhalten ladungsisomerer Proteine ..	74
3.4.3.3.3 Das Trennverhalten molmassenisomerer Proteine .....	74
3.4.3.3.4 Die Ermittlung des Stokes-Radius nativer Proteine .....	77
3.4.3.3.5 Die Bestimmung der Molmasse nativer Proteine ..	78
3.4.3.3.6 Die Bestimmung der Molmasse SDS-denaturierter Proteine .....	80
3.4.4 Elution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen .....	85
3.4.5 Affinitäts-Elektrophorese .....	87
3.4.5.1 Anwendungsbeispiele .....	89
Literatur .....	89

**Praxis der Papier-, Dünnschicht- bzw. Säulenelektrophorese und Anwendungsbeispiele aus dem Bereich der anorganischen Chemie**  
(K. Ziegler)

1 Allgemeine Gesichtspunkte zur Arbeitstechnik .....	94
1.1 Trägermaterialien .....	94
1.1.1 Papiere .....	95
1.1.2 Trägermaterialien für die Dünnschichtelektrophorese .....	96
1.1.3 Trägermaterialien für die Säulenelektrophorese .....	96
1.2 Grundelektrolyt .....	98
1.3 Auftragung der Probe .....	99
1.4 Auswertung der Pherogramme .....	100
1.4.1 Papier- bzw. Dünnschichtelektrophorese .....	100
1.4.1.1 Qualitative Auswertung .....	100
1.4.1.2 Quantitative Auswertung .....	100
1.4.1.2.1 Direktbestimmungsmethoden .....	101
1.4.1.2.2 Elutionsmethoden .....	101
1.4.2 Säulenelektrophorese .....	101
2 Apparaturen .....	102
2.1 Papier- bzw. Dünnschichtelektrophorese .....	102
2.2 Säulenelektrophorese .....	105

3 Anwendungsbeispiele aus dem Bereich der anorganischen Chemie .....	110
3.1 Polyanionen .....	110
3.1.1 Polysulfandisulfonate .....	111
3.1.2 $^{35}\text{S}$ und $^{75}\text{Se}$ markierte Polyselenandisulfonate und Polysulfan-selenandisulfonate .....	111
3.1.3 Polysulfandiphosphonate und -phosphonsulfonate .....	112
3.1.4 Halogenohydroborate .....	114
3.2 Chemisch ähnliche Anionen .....	115
3.2.1 $\text{ClO}_3^-$ , $\text{ClO}_4^-$ , $\text{BrO}_3^-$ , $\text{IO}_3^-$ und $\text{IO}_4^-$ .....	115
3.2.2 Carbonsäure- bzw. Sulfonsäureanionen .....	116
3.2.3 Anionen aus radioaktiven Abfallösungen .....	118
3.3 Metallkomplexe .....	119
3.3.1 Gemischligandkomplexe von Pt-Elementen .....	120
3.3.1.1 Chloro-aquo-rhodium (III)-Komplexe .....	120
3.3.1.2 Chloro-bromo-iridate (IV) .....	122
3.3.2 Gemischligandkomplexe des Cr(III) .....	123
3.3.2.1 Cyanato-ethylendiamin-chrom(III) .....	125
3.3.2.2 Thiocyanato-8-hydroxychinolino-chrom(III)-Komplexe ..	126
3.4 Rutheniumkomplexe in radioaktiven Abfallösungen .....	127
3.4.1 Kationische Rutheniumnitrosylnitrito-Komplexe .....	127
3.4.2 Umwandlung der Rutheniumnitrosylnitrito-Komplexe .....	130
3.4.2.1 Gleichgewichtseinstellung einer frisch hergestellten salpetersauren Rutheniumnitrosylnitratokomplexlösung bei Zimmertemperatur .....	131
3.4.2.2 Umwandlung einzelner isolierter Komplexe in Abhängigkeit von der Lagerzeit und der Temperatur ..	132
3.4.2.3 Verhalten bei Gefriertrocknung .....	134
3.4.2.4 Verhalten beim Eindampfen und Calcinieren .....	134
Literatur .....	137

**Praxis der ultradünnsschicht-iselektrischen Fokussierung mit Trägerampholyten und immobilisierten pH-Gradienten**

(A. Görg, W. Postel, S. Günther, R. Westermeier)

I Allgemeine Gesichtspunkte zur Arbeitstechnik .....	139
1.1 Apparaturen .....	141
1.1.1 Stromversorgung .....	141
1.1.2 Trennkammern .....	141
1.1.3 Kühlung .....	142
1.2 Herstellung ultradünner Gele für die IEF mit Trägerampholyten .....	142
1.3 Herstellung dünner Flachgele für die IEF in immobilisierten pH-Gradienten .....	145

2 Isoelektrische Fokussierung .....	146
2.1 IEF mit Trägerampholyten .....	146
2.1.1 Eigenschaften der Trägerampholyte .....	146
2.1.2 Wahl des pH-Gradienten .....	148
2.1.3 Gel-Zusammensetzung .....	149
2.1.4 Probenvorbereitung und -applikation .....	152
2.1.5 Trennbedingungen .....	154
2.1.6 Titrationskurven .....	155
2.2 IEF mit immobilisierten pH-Gradienten .....	156
2.2.1 Eigenschaften der Immobiline .....	156
2.2.2 Wahl des pH-Gradienten .....	159
2.2.3 Gel-Zusammensetzung .....	161
2.2.4 Probenvorbereitung und -applikation .....	166
2.2.5 Trennbedingungen .....	166
2.3 Bestimmung der pI-Werte .....	167
2.3.1 Einflußfaktoren auf den pI-Wert .....	167
2.3.2 pI-Messung .....	169
2.4 Visualisierungsmethoden .....	170
2.4.1 Proteine .....	170
2.4.2 Glykoprotein- und Lipoproteinanfärbung .....	171
2.4.3 Peptidanfärbung .....	172
2.4.4 Enzymanfärbung .....	172
2.4.5 Print-Techniken .....	173
2.4.6 Immunfixation und Immunoprint .....	174
2.4.7 Autoradiographie .....	174
2.5 Aufbewahrung und Dokumentation .....	175
2.5.1 Trocknung der Gele .....	175
2.5.2 Densitometrie .....	175
2.5.3 Photographie .....	175
3 Weitere horizontale Ultradünnschicht-Elektrophorese-Verfahren .....	175
3.1 Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	176
3.2 Disk-Elektrophorese .....	178
3.3 Gradientengel-Elektrophorese .....	178
3.4 SDS-Elektrophorese .....	179
3.5 Zweidimensionale Elektrophorese .....	180
4 Versuche zur isoelektrischen Fokussierung .....	182
4.1 IEF mit Trägerampholyten .....	182
4.2 IEF im immobilisierten pH-Gradienten .....	186
4.2.1 IEF im ultraengen immobilisierten pH-Gradienten .....	186
4.2.2 IEF mit Immobiline-Fertiggelen (DryPlates) .....	188
4.2.3 IEF im immobilisierten pH-Gradienten für die Hochauflösende 2D-Elektrophorese von Bohnensamenproteinen .....	191
Literatur .....	195

**Praxis der zwei-dimensionalen Elektrophorese von Proteinen**

(J. Klose, M. Schmid)

1 Einleitung .....	198
2 Arbeitstechnik .....	201
2.1 Charakterisierung der zwei-dimensionalen Elektrophorese .....	201
2.2 Apparaturen .....	206
2.2.1 Gerät für die isoelektrische Fokussierung .....	206
2.2.2 Geräte für die Elektrophorese .....	206
2.2.3 Stromgeräte .....	207
2.2.4 Geräte zur Geltrocknung .....	207
2.2.5 Geräte zur Auswertung .....	207
2.3 Gele und Lösungen .....	209
2.3.1 Gele und Lösungen für die isoelektrische Fokussierung .....	209
2.3.2 Gele und Lösungen für die Elektrophorese .....	209
2.3.3 Lösungen für die Färbung .....	212
2.3.4 Lösungen für die Fluorographie .....	212
3 Versuchsdurchführung .....	212
3.1 Versuch 1: 2DE in kleinen Gelen (SG-Technik) .....	212
3.1.1 Probenherstellung .....	212
3.1.2 Isoelektrische Fokussierung .....	213
3.1.3 Elektrophorese .....	214
3.1.4 Färbung .....	214
3.1.5 Auswertung der Proteinmuster .....	215
3.2 Versuch 2: 2DE in mittelgroßen Gelen (MG-Technik) .....	217
3.2.1 Probenherstellung .....	217
3.2.2 Isoelektrische Fokussierung .....	218
3.2.3 Elektrophorese .....	218
3.2.4 Fluorographie .....	219
3.2.5 Auswertung der Proteinmuster .....	219
Literatur .....	220

**Praxis der präparativen Free-Flow-Elektrophorese**

(H. Wagner, R. Kuhn, S. Hoffstetter)

1 Einleitung und geschichtliche Entwicklung .....	223
2 Trennapparatur .....	224
2.1 Einleitung .....	224
2.2 Beschreibung der Apparatur Elphor VaP 22 .....	224
2.3 Das Detektionssystem .....	226
2.4 Strömungsprofile .....	228

3 Trennmethoden .....	230
3.1 Zonenelektrophorese .....	231
3.1.1 Prinzip .....	231
3.1.2 Anwendung .....	232
3.1.3 Beispiel .....	234
3.2 Isotachophorese .....	235
3.2.1 Prinzip .....	235
3.2.2 Anwendung .....	236
3.2.3 Beispiele .....	237
3.3 Isoelektrische Fokussierung .....	238
3.3.1 Isoelektrische Fokussierung im linearen pH-Gradienten .....	239
3.3.1.1 Prinzip .....	240
3.3.1.2 Anwendung .....	242
3.3.1.3 Beispiel .....	242
3.3.2 Isoelektrische Fokussierung im stufenförmigen pH-Gradienten .....	243
3.3.2.1 Prinzip .....	243
3.3.2.2 Anwendung .....	244
3.3.2.3 Beispiele .....	246
3.4 Feldsprungelektrophorese .....	247
3.4.1 Prinzip .....	248
3.4.2 Anwendung .....	252
3.4.3 Beispiele .....	253
4 Spezielle Trennapparaturen .....	258
4.1 Einleitung .....	258
4.2 Biostream-Apparatur .....	258
4.3 RIEF-Apparatur .....	258
5 Anhang .....	261
5.1 Tabellen .....	261
5.2 Anwendungen der Free-Flow-Elektrophorese .....	266
Literatur .....	268
<b>Sachverzeichnis .....</b>	<b>279</b>