

Horst Wagner · Ewald Blasius (Hrsg.)

Praxis der elektrophoretischen Trennmethoden

Mit 141 Abbildungen und 42 Tabellen



Springer-Verlag
Berlin Heidelberg New York
London Paris Toyko

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 Trennmethode n	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-Bruch- stücken < 1 Kilobasen	48
3.4.2.1.1 Abhängigkeit des Fraktionierungsbereiches 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 Wanderungs- strecke 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}S und ^{75}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 ClO_3^- , ClO_4^- , BrO_3^- , IO_3^- und 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 Gemischtligandkomplexe 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 Gemischtligandkomplexe 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 Rutheniumnitrosylnitrato-Komplexe	127
3.4.2 Umwandlung der Rutheniumnitrosylnitrato-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 ultradünnschicht-iselektrischen Fokussierung mit Trägerampholyten und immobilisierten pH-Gradienten

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

1 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	Titrationsskurven	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	Immunofixation 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 Gel Trocknung	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
Sachverzeichnis	279