

Inhalt

Vorwort	1
Teil I	
1. Anwendungsgebiet der eiweißchemischen Untersuchungsmethoden	3
1.1. Einige methodische Fragen und Ergebnisse der Proteinuntersuchungsverfahren	3
1.1.1. Elektrophoretische immunochemische Untersuchung nativer Proteine	3
1.1.2. Elektrophorese nativer Proteine	4
1.1.3. Zonenelektrophoretische Methode	6
1.1.3.1. Papierelektrophorese	8
1.1.3.2. Stärkegel-Elektrophorese	8
1.1.3.3. Agargel-Elektrophorese	9
1.1.3.4. Elektrophorese mittels Celluloseacetatmembran ..	10
1.1.4. Untersuchung nativer Proteine mit immunochemischen Methoden	11
1.1.4.1. Terminologie	11
1.1.4.2. Über die Präzipitationsreaktion im allgemeinen	11
1.1.4.3. Immunodiffusionsmethoden	14
1.1.4.4. Anwendung der Immunodiffusionsmethoden	16
1.1.5. Elektrophoretische und immunochemische Methoden der Untersuchung der Proteine des Blutserums	18
1.1.6. Chromatographie der Proteine mittels Ionenaustauschern	22
1.1.7. Fraktionieren von Proteinen mittels Gelfiltration	25
1.1.8. Anwendung elektrophoretischer und immunochemischer Methoden bei der Strukturuntersuchung nativer Proteine	27
Spezialliteratur zu Kapitel 1.1	29
Zusammenfassende Literatur zu Kapitel 1.1	32
1.2. Bestimmung der Aminosäuresequenz von Proteinen und Polypeptiden	32
1.2.1. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung	34
1.2.2. Trennung der Peptidketten	35
1.2.3. Enzymatische Hydrolyse	37
1.2.4. Nichtenzymatische Spaltung	39
1.2.5. Fraktionierung von Peptiden	40
1.2.6. Analyse »vorbestimmter« Peptide	44
1.2.7. Endgruppenanalyse	47
1.2.8. Einige wichtige Ergebnisse der Sequenzanalyse	50
Spezialliteratur zu Kapitel 1.2	54

Teil II

2. Untersuchung von Proteinen mittels Niederspannungselektrophorese	59
2.1. Niederspannungs-Papierlektrophorese	60
2.1.1. Die Elektrophoresekammer	64
2.1.2. Pufferlösungen	66
2.1.3. Auftragen der zu untersuchenden Substanz	67
2.1.4. Bei der Elektrophorese angewandte Spannung	67
2.1.5. Einige die Elektrophorese beeinflussende Faktoren	68
2.1.6. Auswahl des Filtrierpapiers	70
2.1.7. Adsorption der Proteine am Filtrierpapier	70
2.2. Färbeverfahren	71
2.2.1. Färben von Proteinen	71
2.2.2. Färben von Lipoproteiden	73
2.2.3. Färben von Glykoproteiden	76
2.3. Auswertung der mit Niederspannungs-Papierlektrophorese erhaltenen Ergebnisse bei Proteinuntersuchungen	78
2.3.1. Quantitative Auswertung mittels Elution	79
2.3.2. Quantitative Auswertung mittels direkten photoelektrometrischen Verfahrens	81
2.4. Einige Fehlerquellen der papierlektrophoretischen Methode bei Niederspannung	86
2.5. Cellulosemembran-Elektrophorese	87
2.6. Stärkegel-Elektrophorese	89
2.7. Agargel-Elektrophorese	95
2.8. Zonenelektrophorese in Acrylamidgel	99
2.9. Präparative elektrophoretische Verfahren	103
2.9.1. Kontinuierliche Elektrophorese	103
2.9.2. Präparative Papierlektrophorese	107
Spezialliteratur zu Kapitel 2	111
Zusammenfassende Literatur zu Kapitel 2	112

Teil III

3. Hochspannungs-Papierlektrophorese	113
3.1. Gerät nach Mikeš und seine Anwendung zur absteigenden Papierlektrophorese	113
3.2. Einrichtung für horizontale Hochspannungselektrophorese und ihre Anwendung	116
3.3. Trennen von Aminosäuren mittels Papierlektrophorese unter höherer Spannung	126
Spezialliteratur zu Kapitel 3	129
Zusammenfassende Literatur zu Kapitel 3	129

4. Immunochemische Untersuchungsmethoden. Gewinnung von Immuns- serum	130
4.1. Proteinuntersuchungen mit Hilfe der Präzipitationsreaktion	134
4.1.1. Qualitative Präzipitationsuntersuchung	134
4.1.2. Bestimmung des Antikörpertiters mit der Verdünnungsme- thode	136
4.1.3. Bestimmung der Gleichgewichtszone (Äquivalenzzone) Antigen-Antikörper	138
4.1.4. Interfaciale (ringbildende) Präzipitationsuntersuchung	138
4.1.5. Quantitative Präzipitationsmethode	140
4.2. Proteinuntersuchungen mittels Immunodiffusionsmethode	142
4.2.1. Einfache, lineare Immunodiffusionsmethode	142
4.2.2. Lineare (eindimensionale) doppelte Immunodiffusion	144
4.2.3. Zweidimensionale, doppelte Immunodiffusion	146
4.2.4. Immunelektrophorese	152
4.2.5. Vergleichende Untersuchung von Proteinen	164
4.2.6. Quantitative Geldiffusionsmethoden	166
4.2.6.1. Antikörpergradiens-Methode nach FEINBERG	167
4.2.6.2. Quantitative Immunelektrophorese nach BACKHAUSZ	168
4.3. Untersuchung von Proteinen mittels Immunodiffusion auf einer Membran aus Celluloseacetat	169
4.3.1. Zweidimensionale doppelte Diffusion	169
4.3.2. Immunelektrophorese	170
Spezialliteratur zu Kapitel 4	171
Zusammenfassende Literatur zu Kapitel 4	171

Teil V

5. Chromatographische Methoden	172
5.1. Chromatographie der Aminosäuren, Peptide und Proteine	172
5.1.1. Papierchromatographie von Aminosäuren und Peptiden im System Butanol-Essigsäure-Wasser	172
5.1.2. Präparative Chromatographie auf Hyflo-Supercel-Säule mit dem Butanolsystem	178
5.1.3. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mit der Methode von MOORE und STEIN	179
5.1.4. Fraktionierung stark saurer Peptide auf einer Amberlite- IR4B-Säule	183
5.1.5. Chromatographie basischer Peptide auf der Amberlite-IRC- 50-Säule	185
5.1.6. Fraktionierung von Peptiden auf einer Dowex-50×2-Säule unter Anwendung salzhaltiger Puffer	186
5.1.7. Fraktionierung von Peptiden auf einer Dowex-50×2-Säule unter Anwendung flüchtiger Puffer	189

5.2. Ionenaustauscherchromatographie von Proteinen	191
5.2.1. Chromatographie der Serumproteine auf einer DEAE-Cellulose-Säule	191
5.2.2. Fraktionieren von Serumproteinen auf einer Säule mit Kationenaustauscher-Cellulose	193
5.2.2.1. Fraktionieren auf einer Säule mit P-Cellulose	194
5.2.2.2. Fraktionieren auf einer Säule mit CM-Cellulose	194
5.2.3. Fraktionieren von Serumproteinen auf einer DEAE-Sephadex-Säule	195
5.3. Gelfiltration von Proteinen und Peptiden	197
5.3.1. Entsalzung einer Proteinlösung mit der Sephadex-Säule	197
5.3.2. Einengen von Proteinlösungen mit Hilfe von Sephadex	197
5.3.3. Fraktionieren von Serumproteinen mittels Gelfiltration	198
5.3.4. Trennen von Proteinen mit rezyklisierender Chromatographie	199
Spezialliteratur zu Kapitel 5	202
Zusammenfassende Literatur zu Kapitel 5	202

Teil VI

6. Hydrolyse von Proteinen und Peptiden	203
6.1. Hydrolyse von Proteinen und Peptiden in 6 <i>n</i> Salzsäure	203
6.2. Partielle saure Hydrolyse von Proteinen und Peptiden	205
6.3. Hydrolyse von Proteinen und Peptiden mittels Trypsins	206
6.4. Hydrolyse von Proteinen und Peptiden mittels Chymotrypsins	207
6.5. Hydrolyse von Proteinen und Peptiden mittels Pepsins	208
6.6. Hydrolyse von Proteinen und Peptiden mittels Papains	209
Spezialliteratur zu Kapitel 6	210
Zusammenfassende Literatur zu Kapitel 6	210

Teil VII

7. Endgruppenanalyse bei Proteinen und Peptiden	211
7.1. Bestimmung der N-Terminalen mit der 2,4-Dinitro-Fluorbenzol-Methode	211
7.2. Herstellung von DNP-Aminosäuren	213
7.3. Herstellung von ϵ -DNP-Lysin	215
7.4. Dinitrophenylierung von Protein	216
7.5. Hydrolyse von DNP-Protein bzw. -Peptid und Extraktion der DNP-Derivate	217
7.6. Papierchromatographie von DNP-Aminosäuren	219
7.7. Dünnschicht-Chromatographie von DNP-Aminosäuren	223
7.8. Indirekte Identifizierung von DNP-Aminosäuren	226
7.9. Quantitative Bestimmung von DNP-Derivaten	227
7.10. Bestimmung der N-terminalen Sequenz durch Abbau mit Phenylisothiocyanat	228

7.11. Herstellung von PTH-Aminosäuren	230
7.12. Phenylisothiocyanat(PTC)-Abbau von Peptiden	232
7.13. PTC-Abbau von Proteinen	234
7.14. Identifizierung und Bestimmung von PTH-Derivaten	235
7.15. Bestimmung der N-terminalen Sequenz mit Leucin-Amino-peptidase	238
7.16. Bestimmung von C-Terminalen mittels Hydrazinolyse	240
7.17. Bestimmung der C-terminalen Sequenz mit Hilfe von Carboxy-peptidase-Verdauung	242
Spezialliteratur zu Kapitel 7	244

Teil VIII

8. Proteinbestimmungen	246
8.1. Proteinbestimmung mit dem FOLIN-CIOCALTEU-Phenolreagens	246
8.2. Proteinbestimmung mit der Biuretreaktion	248
8.3. Proteinbestimmung mit der Ninhydrinmethode	249
8.4. Quantitative Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	249

Teil IX

9. Anhang	251
9.1. Konzentrierung von Proteinlösungen mittels Druckdialyse	251
9.2. Konzentrierung von Proteinlösungen durch Ultrafiltration	252
9.3. Konzentrierung von Proteinlösungen mit Hilfe von Substanzen von hohem Molekulargewicht	253
9.4. Bestimmung des Stickstoffgehaltes	254
Spezialliteratur zu Kapitel 8 und 9	257
Tabellen 11 bis 15	258

Gas-chromatographische Analyse von Aminosäurederivaten.

Stand, Möglichkeiten und Grenzen

R. KAISER und A. PROX

Einleitung	267
1. Prinzip der Methode	268
1.1. Arbeitsweise	270
1.1.1. Dosieren	270
1.1.2. Trennen	271
1.1.3. Nachweisen, Registrieren, Auswerten, Identifizieren	273
2. Spezielle apparative Voraussetzungen und methodische Bedingungen für die GC-Analyse von Aminosäurederivaten und Peptiden	276
2.1. Arbeitstemperatur	276
2.2. Probengeber	278
2.3. Säule, Säulenfüllung	278

2.4. Komplette Gas-Chromatographen für die Aminosäureanalyse, Anforderungen	282
2.5. Quantitative Auswertung des Gas-Chromatogramms	283
3. Analytische Eigenschaften der Derivate	285
3.1. Derivatbildung bei Aminosäuren	285
3.2. Derivatbildung durch Schutz der funktionellen Gruppen	287
3.3. Derivatbildung durch chemische Umwandlung der Aminosäuren	304
3.4. Derivatbildung durch Abbau der Aminosäuren	306
4. Pyrolyse von Aminosäuren	307
5. Gas-Chromatographie der Aminosäurederivate	308
6. Probleme der quantitativen Aminosäureanalyse	314
7. Gas-Chromatographie von Peptiden	317
7.1. Verfahren von BIEMANN und Mitarbeitern	320
7.2. Verfahren von WEYGAND und Mitarbeitern	323
Literatur zum Abschnitt gas-chromatographische Analyse von Aminosäurederivaten ..	335
Sachregister	339