

Inhaltsverzeichnis

1 Das tägliche Brot	3
1.1 Puffer herstellen	3
1.2 Protein bestimmen	4
1.2.1 BCA-Test	5
1.2.2 Bradford-Test	5
1.2.3 Lowry-Test	5
1.2.4 Ferner liefern	6
1.3 Gele	6
1.3.1 SDS-Gele	6
1.3.2 Native Gele	9
1.3.3 Zweidimensionale Elektrophorese	10
1.4 Gele färben	12
1.4.1 Fixieren	12
1.4.2 Färben	12
1.4.3 Trocknen	15
1.5 Füllen und Konzentrieren	16
1.5.1 Denaturierende Fällung	16
1.5.2 Native Fällung	16
1.5.3 Konzentrieren	17
1.6 Blotten	18
1.6.1 Proteinfärbung auf Blots	20
1.6.2 Blocken	21
1.6.3 Immunfärbung	22
1.6.4 Ca ²⁺ -Bindung	24
1.6.5 Ligandenfärbung	24
1.7 Autoradiographie	25
2 Ligandenbindung	29
2.1 Radioaktive Ligandenmarkierung	30
2.1.1 Iodierung von Peptiden und Proteinen	30
2.1.1.1 The day after	33
2.1.2 Iodierung von Molekülen mit niedrigem MG	34
2.1.3 Isolierung einzelner iodierter Spezies	34
2.1.4 Vor- und Nachteile des Iodierens	35
2.1.5 Tritiiieren	37
2.2 Bindung	38
2.2.1 Isolierung von Membranen	38
2.2.2 Bindungstest	40
2.2.3 Bindungstests mit Membranen	41
2.2.4 Entwicklung von Membranbindungstests	44

2.2.5 Bindungstests mit löslichen Proteinen	45
2.2.6 Keine Bindung, was tun?	51
2.3 Auswertung von Bindungsdaten	53
2.3.1 Die Bindung ist im Gleichgewicht	53
2.3.1.1 Bestimmung von K_D und B_{\max}	55
2.3.1.2 Bindungshemmung	60
2.3.1.3 Irrtümer	61
2.3.1.4 Hügeliges	63
2.3.2 Kinetik	67
2.4 Vernetzen von Liganden	69
2.4.1 Dreikomponentenvernetzung (3K-Vernetzung)	70
2.4.1.1 Homofunktionelle Vernetzer	72
2.4.1.2 Heterofunktionelle Vernetzer	72
2.4.1.3 3K-Vernetzungsexperimente	74
2.4.2 Photoaffinitätsvernetzung	74
2.4.2.1 Herstellung eines Photoaffinitätsliganden	74
2.4.2.2 Zur Strategie der Photoaffinitätsvernetzung	75
2.4.2.3 Photoaffinitäts-Vernetzungsexperimente	76
2.4.3 Kontrollen bei Vernetzungsversuchen	76
2.5 Sinniges	77
3 Membranproteine solubilisieren	81
3.1 Seifen	81
3.1.1 Saubere Begriffe	81
3.1.2 Vom Umgang mit Seifen	83
3.2 Solubilisieren	86
3.2.1 Solubilisierungskriterien	91
3.2.2 Physikalische Parameter solubilisierter Proteine	92
4 Proteinnachweis durch Funktionsmessung	94
4.1 Translokatoren	94
4.1.1 Liposomen	95
4.1.2 Proteoliposomen	97
4.2 Rekonstitution	98
4.2.1 Rekonstitution aus einer Lösung	98
4.2.2 Rekonstitution in vorgefertigte Liposomen	100
4.3 Fluxtest	100
4.3.1 Influxtest	102
4.3.2 Effluxtest	105
4.4 Aufbauende Überlegungen	106

5 Säubern und Putzen	108
5.1 Putziges	108
5.2 Konventionelle Reinigungsmethoden	111
5.2.1 Zur Säulentechnik	112
5.2.2 Reinigung nach Größenunterschieden	113
5.2.2.1 Gelfiltration	113
5.2.2.2 Präparative Gelelektrophorese	115
5.2.3 Reinigung nach Ladungsunterschieden	116
5.2.3.1 Ammoniumsulfatfällung	116
5.2.3.2 Ionenaustauscher	116
5.2.3.3 Isoelektrische Fokussierung	117
5.2.3.4 Chromatofokussierung	120
5.2.3.5 Hydroxyapatit	122
5.2.4 Hydrophobe Chromatographie	123
5.3 Affinitätschromatographie	124
5.3.1 Lektinchromatographie	124
5.3.2 Ligandenchromatographie	126
5.3.2.1 Einführung	126
5.3.2.2 Die Rolle des Liganden	128
5.3.2.3 Die Rolle der Matrix	128
5.3.2.4 Wie geht man vor?	130
5.4 Die Reinheitsprobe	132
5.5 Ausschlachten	133
6 Antikörper	136
6.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern	140
6.1.1 Antigen	140
6.1.2 Adjuvans	141
6.1.3 Injektion und Serumgewinnung	142
6.1.4 Reinigung von Antikörpern	143
6.2 Immunpräzipitation	144
6.2.1 Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein A	145
6.2.2 Immunpräzipitation mit immobilisiertem Antikörper	146
6.3 Immunoaffinitätschromatographie	146
6.4 Antikörper gegen ungereinigte Proteine	147
6.5 Immunologische Nachweistechiken	149
7 Mikrosequenzierung	154
7.1 Zubereiten des Proteins	155
7.2 Blockierte N-Termini	156
7.3 Spaltung des Proteins in Peptide	156

7.3.1	Proteasenverdau	157
7.3.2	Bromcyan- und Säurespaltung	158
7.4	Carboxyterminale Sequenzierung	158
7.5	Massig Sequenzieren	159
7.5.1	Massenspektrometrie	159
7.5.2	Probenvorbereitung	160
7.5.3	Leitersequenzierung von Peptiden	163
7.5.4	Die Möglichkeiten des MALDI-TOF-Massenspektrometers	168
8	Untereinheiten	170
8.1	Stöchiometrie & Merigkeit (S&M)	170
8.1.1	Über die Schwierigkeiten bei Stöchiometriebestimmungen	170
8.1.2	S&M mit Röntgenstrukturanalyse	171
8.1.3	S&M mit Hybridisierungsexperimenten	171
8.1.4	S&M mit Vernetzungsexperimenten	173
8.1.4.1	Vernetzung von Homooligomeren	174
8.1.4.2	Struktur von Homooligomeren	177
8.1.4.3	Vernetzung von Heterooligomeren	177
8.1.5	S&M mit Aminosäureanalysen oder Antikörpern	179
8.2	Was unsre Welt im Innersten zusammenhält	182
9	Glykoproteine	184
9.1	Wie, Wo und Wozu werden Proteine glykosyliert?	184
9.2	Nachweis von Glykoproteinen in Gelen	185
9.3	Nachweis von Glykoproteinen auf Blots	185
9.3.1	Nichtselektive Glykoproteinfärbung	185
9.3.2	Selektive (Lektin-) Färbung	187
9.4	Deglykosylierung	190
9.4.1	Glykosylierungshemmer	190
9.4.2	Endoglykosidasen	190
9.4.3	Chemische Deglykosylierung	195
9.5	Die Zuckerketten	196
9.5.1	Monosaccharidzusammensetzung	196
9.5.2	Aufbau und Sequenz	196
9.5.2.1	Ablösung der Oligosaccharide von Glykoproteinen	197
9.5.2.2	Markierung von Oligosacchariden	197
9.5.2.3	Trennung von Oligosacchariden	198
9.5.2.4	Sequenzierung von Oligosacchariden	199
10	Der Schatz im Silbersee	202
10.1	Vom Paper	202
10.2	Vom Schreiben eines Papers	203

11	Durch die Wüste	205
12	Wer, was, wo?	207
12.1	Lieferanten	207
12.2	Lieferanten gegliedert nach Produkten	211
	Das Letzte	212
	Register	213