

Inhaltsverzeichnis

1	Das tägliche Brot	1
1.1	Puffer herstellen	2
1.2	Protein bestimmen	2
1.2.1	BCA-Test	2
1.2.2	Bradford-Test.....	3
1.2.3	Lowry-Test	4
1.2.4	Starcher-Test	5
1.2.5	Pilztest.....	6
1.2.6	Weniger beliebte, aber gute Methoden	7
1.3	Gele	8
1.3.1	SDS-Gele	8
1.3.2	Für Eilige: SDS-Elektrophorese ohne Sammelgel	11
1.3.3	Native Gele	12
1.4	Gele färben	13
1.4.1	Fixieren.....	13
1.4.2	Färben.....	13
1.4.3	Trocknen	21
1.5	Fällen und Konzentrieren	22
1.5.1	Denaturierende Fällung	22
1.5.2	Native Fällung.....	22
1.5.3	Konzentrieren.....	23
1.6	Blotten	24
1.6.1	Proteinfärbung auf Blots.....	25
1.6.2	Blocken.....	27
1.6.3	Immunfärbung.....	28
1.6.4	Ca ²⁺ -Bindung	29
1.6.5	Ligandenfärbung.....	30
1.6.6	Ablösen von Proteinen von Blots	30
1.7	Autoradiographie von Gelen und Blots	30
1.7.1	Autoradiographie mit Röntgenfilmen.....	30
1.7.2	Phosphorimager	31
	Literatur	33
2	Ligandenbindung	37
2.1	Radioaktive Ligandenmarkierung	39
2.1.1	Iodierung von Peptiden und Proteinen	39
2.1.2	Iodierung von Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht.....	42
2.1.3	Isolierung einzelner iodierter Spezies.....	42
2.1.4	Vor- und Nachteile des Iodierens	43
2.1.5	Tritieren.....	44
2.2	Bindung	45
2.2.1	Isolierung von Membranen	45
2.2.2	Bindungstest.....	52

2.2.3	Bindungstests mit Membranen.....	55
2.2.4	Entwicklung von Membranbindungstests	56
2.2.5	Bindungstests mit Proteinen in Lösung	57
2.2.6	Bindungstests ohne Modifikation der Liganden	60
2.2.7	Wie entwickelt man einen Bindungstest für Proteine in Lösung?	82
2.2.8	Keine Bindung, was tun?	83
2.3	Auswertung von Bindungsdaten	84
2.3.1	Die Bindung ist im Gleichgewicht	85
2.3.2	Kinetik.....	95
2.4	Vernetzen von Liganden	97
2.4.1	Drei-Komponenten-Vernetzung (3K-Vernetzung).....	98
2.4.2	Photoaffinitätsvernetzung	102
2.4.3	Kontrollen bei Vernetzungsversuchen	104
2.4.4	Vernetzung nicht-radioaktiver Liganden	107
2.5	Sinniges	107
	Literatur	110
3	Membranproteine solubilisieren	115
3.1	Seifen	117
3.1.1	Saubere Begriffe	117
3.1.2	Vom Umgang mit Seifen	117
3.2	Solubilisieren	121
3.2.1	Solubilisierungskriterien	128
3.2.2	Physikalische Parameter solubilisierter Membranproteine	129
3.2.3	Wie werde ich die Seife wieder los?.....	131
	Literatur	131
4	Rekonstitution von Proteinen	133
4.1	Rekonstitution der Tertiärstruktur löslicher Proteine	134
4.2	Rekonstitution von Membranproteinen in Membranen	136
4.2.1	Einleitung.....	136
4.2.2	Liposomen.....	137
4.2.3	Proteoliposomen.....	139
4.2.4	Rekonstitution in Membranen	139
4.2.5	Nachweis der Rekonstitution in Membranen durch Fluxtests.....	142
4.2.6	Aufbauende Überlegungen.....	146
	Literatur	148
5	Säubern und Putzen	151
5.1	Putziges	152
5.1.1	Proteinaggregation messen und verhindern	155
5.2	Konventionelle Reinigungsmethoden	158
5.2.1	Reinigung nach Hydrophobizität	158
5.2.2	Reinigung nach Größenunterschieden.....	165
5.2.3	Reinigung nach Ladungsunterschieden	167
5.2.4	Blaugel	178
5.2.5	Zeolithchromatographie.....	179

5.3	Affinitätschromatographie	181
5.3.1	Lektinchromatographie.....	181
5.3.2	Liganden-Affinitätschromatographie	182
5.4	Unkonventionelle Reinigungsmethoden	190
5.4.1	Nicht-zerstörende präparative Massenspektrometrie	190
5.5	Die Reinheitsprobe	192
5.6	Ausschlachten	193
	Literatur	195
6	Antikörper und Aptamere	199
6.1	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	202
6.1.1	Antigen.....	202
6.1.2	Adjuvans	204
6.1.3	Injektion und Serumgewinnung.....	204
6.1.4	Reinigung von Antikörpern	205
6.2	Immunpräzipitation	206
6.2.1	Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein A	207
6.2.2	Immunpräzipitation mit immobilisiertem Antikörper	207
6.2.3	Nachweis präzipitierter Antigene mit biotinylierten Antikörpern	208
6.3	Immunaффinitätschromatographie	209
6.4	Antikörper gegen ungereinigte Proteine	210
6.5	Immunologische Nachweistechiken	212
6.5.1	Dot-Blots	212
6.5.2	ELISA	214
6.5.3	Signalverstärkung bei Immunoassays.....	218
6.6	Antikörperersatz: Aptamere und andere Bindungsmoleküle	222
6.6.1	Aptamere.....	222
6.6.2	Ribosomen-Display.....	227
	Literatur	230
7	Proteomics	233
7.1	Einführung	235
7.2	Probennahme	238
7.2.1	Mikrodissektion mit Lasererfassung	239
7.3	2D-Gelelektrophorese und andere mehrdimensionale Trenntechniken	243
7.3.1	Probenvorbereitung in der 2DE	243
7.3.2	Vorfractionieren für die 2DE	246
7.3.3	Die Technik der 2DE	252
7.4	Proteine spalten	264
7.4.1	Proteasenverdau	265
7.4.2	Bromcyan- und Säurespaltung	267
7.5	Massenspektrometrie von Proteinen und Peptiden	267
7.5.1	Einführung.....	267
7.5.2	Ionenquellen und Probenvorbereitung	268
7.5.3	Analysatoren und Detektoren	281
7.5.4	MS-Parameter und Spektreninterpretation.....	287
7.5.5	Peptidmassen-Fingerabdruck	295

7.5.6	Peptidsequenzierung mit MS	296
7.5.7	Möglichkeiten der MS mit ESI-Quellen	314
7.5.8	Möglichkeiten der MS mit MALDI-Quellen	326
7.5.9	Bildgebende Massenspektrometrie	331
7.5.10	MS-Strategie	332
7.6	Proteinchips	333
7.6.1	Antikörperchips	333
7.7	Aussterbende Dinosaurier?	336
7.7.1	Blockierte N-Termini	337
7.7.2	Edman-Abbau	338
7.7.3	Carboxyterminale Sequenzierung	339
7.8	Rehms Proteomics-Philosophie	340
7.9	Letzels Proteomics-Philosophie	342
	Literatur	342
8	Untereinheiten	347
8.1	Stöchiometrie und Merigkeit	348
8.1.1	Über die Schwierigkeiten bei Stöchiometriebestimmungen	348
8.1.2	S & M mit Röntgenstrukturanalyse	349
8.1.3	S & M mit Hybridisierungsexperimenten	349
8.1.4	S & M mit Vernetzungsexperimenten	350
8.1.5	S & M mit Aminosäureanalysen oder Antikörpern	358
8.2	Was unsre Welt im Innersten zusammenhält	360
	Literatur	361
9	Glykoproteine	363
9.1	Wie, wo und wozu werden Proteine glykosyliert?	364
9.2	Nachweis von Glykoproteinen in Gelen	364
9.3	Nachweis von Glykoproteinen auf Blots	365
9.3.1	Nicht-selektive Glykoproteinfärbung	365
9.3.2	Selektive (Lektin-)Färbung	365
9.4	Anreicherung von Glykopeptiden für die LC/MS	369
9.5	Deglykosylierung	370
9.5.1	Glykosylierungshemmer	370
9.5.2	Endoglykosidasen	371
9.5.3	Chemische Deglykosylierung	375
9.5.4	Massenspektrometrische Deglykosylierung	376
9.6	Zuckerketten	376
9.6.1	Monosaccharidzusammensetzung	376
9.6.2	Aufbau und Sequenz	377
	Literatur	384
10	Der Schatz im Silbersee	387
10.1	Vom Paper	388
10.2	Vom Schreiben eines Papers	388
10.3	Wie bringe ich andere dazu, mein Paper zu zitieren?	390
	Literatur	391

11	Durch die Wüste	393
	Literatur	395
	Serviceteil	397
	Das Letzte	398
	Sachverzeichnis	399