

Inhalt

Kapitel 1. Proteinstruktur und Stabilität	1
Die Rolle des Wassers	2
Die Wirkung spezifischer Liganden bei der Bindung an Proteine	3
Allgemeine Wirkung von Salzen	4
Wäßrige organische Lösungsmittel	6
Monohydrische Alkohole	7
Polyhydrische Alkohole	8
Die Wirkung von Druck und Temperatur	10
Druck	10
Temperatur	11
Denaturierung und Stabilisierung	11
Denaturierung	12
Stabilisierung	15
Renaturierung	19
Literatur	21
Kapitel 2. Proteinkonzentration und Enzymaktivität	25
Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen	25
Absorptionsmethoden	25
Die Lowry-Methode	28
Die Biuret-Methode	33
Die Coomassieblau-Farbstoffbindungsmethode (der Bradford-Nachweis)	34
Fluoreszenzmethoden	35
Weitere Methoden	36
Bewertung der Methoden zur quantitativen Proteinbestimmung	36
Bestimmung von Enzymaktivitäten	39
Die Initialgeschwindigkeit	39
Einheiten der Enzymaktivität	40
Enzymtests	41
Der direkte Enzymtest	41
Der gekoppelte Enzymtest	42
Der Reaktionsstart	49
Schwierigkeiten bei Enzymtests	49
Literatur	50

Anhang 2.1 Reagentien und Verfahren zur Bestimmung der Protein- konzentration mit den Derivat-Methoden	52
Anhang 2.2 Einige nützliche Eigenschaften der Pyridinnukleotid-Coenzyme NAD ⁺ , NADH, NADP ⁺ und NADPH	54
Kapitel 3. Die Reinigung eines Enzyms	56
Strategie zur Aufstellung eines Reinigungsschemas	56
Herstellung eines Rohextraktes	57
Die Wahl eines Gewebes	57
Mikrobielle Zellen	58
Erythrozyten	61
Feste Gewebe	61
Pflanzliche Gewebe	62
Membranenzyme	62
Die vorläufige Charakterisierung eines Enzyms	66
Die Reinigung eines Enzyms	68
Fraktionierte Fällung von Rohextrakten	69
Denaturierung von Begleitproteinen	77
Gelpermeationschromatographie	78
Ionenaustauschchromatographie	82
Hydrophobe Chromatographie	85
Farbstoffliganden-Affinitätschromatographie	89
Bioliganden-Affinitätschromatographie	93
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	97
Fast-Flow Flüssigkeitschromatographie	102
Elektrophoretische Trennmethode	102
Weitere Fraktionierungsmethoden	104
Kristallisation	105
Die Reihenfolge der Fraktionierungsschritte	105
Reinigungsprotokolle	107
Die Lagerung von homogenem Protein	109
Problemfelder	109
Verdünnte Proteinlösungen	109
Dissoziation von Cofaktoren oder Untereinheiten	110
Adsorption von Protein an Glas oder Plastik	110
Literatur	111
Anhang 3.1 Die wichtigsten Methoden zum Aufbrechen von Hefezellen ...	117
Anhang 3.2 Techniken zum Konzentrieren von Proteinlösungen	118

Kapitel 4. Physikalische und chemische Eigenschaften eines Enzyms	119
Kriterien der Homogenität	119
Der Absorptionsindex	120
Die «aktive» Enzymkonzentration	121
Absorption von ultraviolettem Licht	127
Fluoreszenz	133
Die Eigenfluoreszenz	133
Die nichteigene Fluoreszenz	134
Das Molekulargewicht	137
Das Sedimentationsgleichgewicht	138
Die Sedimentationsgeschwindigkeit	140
Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	141
Der Nachweis von Proteinen nach der Elektrophorese	147
Die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit	150
Die Analyse elektrophoretischer Daten	151
Gelpermeationschromatographie	155
Der Aufbau aus Untereinheiten	158
Die Anzahl der Untereinheiten	158
Sind die Untereinheiten identisch?	159
Aminosäurezusammensetzung und -sequenz	160
Die Menge an erforderlichem Protein	160
Die Reinheit des Proteins	161
Die Aminosäureanalyse	161
Die Strategie des Sequenzierens	162
Die Peptidspaltung	163
Die Aminosäuresequenz	165
Posttranslationelle kovalente Modifikationen	166
Peptidkarten	167
Die Spaltung von Proteinen	168
Der Nachweis von Peptiden	168
Topographie eines Proteins	169
Das Auffinden funktioneller Gruppen	169
Das Auffinden spezifischer Peptide	171
Das Auffinden chromophorer Gruppen	172
Die räumliche Nähe funktioneller Gruppen	173
Die räumliche Nähe anderer Gruppen	173
Literatur	174
Anhang 4.1 Verfahren zur Proteinfärbung nach Elektrophorese in Polyacrylamidgelen	181

Kapitel 5. Protein-Ligand-Komplexe und Enzymkinetik	183
Die alleinige Bestimmung von K_D	183
Kinetische Methoden	184
Die Störung einer Proteineigenschaft	184
Affinitätschromatographie und Affinitätselektrophorese	186
Die Bestimmung der Stöchiometrie und der Dissoziationskonstanten	188
Gleichgewichtsdialyse	190
Ultrafiltration	192
Die kontinuierliche Gleichgewichtsdialyse	193
Gelpermeationschromatographie	196
Ultrazentrifugation	198
Störung einer Eigenschaft eines Liganden	198
Störung des Proteins	199
Weitere Methoden	201
Sehr starke Komplexe	201
Die Bestimmung der Stöchiometrie	204
Die Reaktion der Konformation	205
Enzymkinetik	209
Die Michaelis-Menten-Gleichung	209
Die Bestimmung der Initialgeschwindigkeit	210
Die Erstellung eines Kinetik- und Bindungsexperimentes	212
Die Analyse von Kinetik- und Bindungsdaten	215
Die Bestimmung von V und V/K_m	223
Die Hemmung von Enzymen	224
Die Aktivierung von Enzymen	227
Allosterische Enzymkinetik	230
Positive und negative Kooperativität	231
Literatur	234
 Anhang I Zusammensetzung von Stammlösungen zur Verwendung in der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	239
I. Stammlösungen für Trenngele	239
II. Stammlösungen für Sammelgele	240
III. Elektrodenpuffer	241
IV. Stammlösungen zur Herstellung der Probe	242
V. Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Konzentrationen	243
VI. Zusammensetzung und Charakterisierung von Elektrophoresepuffern ..	244
 Anhang II Die Anwendung der Fehlerfunktion auf gelchromatographische Daten	245

Anhang III	Zahlenwerte für den Test auf zufällige Gruppierung von zwei Arten von Objekten auf dem 95 % Konfidenzlevel	249
Anhang IV	Gleichungen zur manuellen Berechnung einer gewichteten Regression für eine lineare Form der Michaelis-Menten-Gleichung	250
Anhang V	Anschriften von Lieferfirmen und Herstellern von Enzymen und Reagentien für Enzymtests	251
Anhang VI	Enzym-Datenbank	256
Anhang VII	Eine Auswahl deutschsprachiger Fachbücher über Enzyme	258
Sachverzeichnis		260