

Reiner Westermeier

Elektrophorese- Praktikum

unter Mitwirkung von

Sonja Gronau-Czybulka

Corinna Habeck

Hubert Schach

Hanspeter Schickle

Günter Theßeling

Peter Wiesner

Weinheim · New York · Basel · Cambridge



Inhalt

Teil I

Grundlagen

0	Übersicht	1
1	Elektrophorese	5
1.0	Allgemeines	5
1.1	Elektrophoresen in nichtrestriktiven Gelen	12
1.1.1	Agarose-Gel-Elektrophorese	12
1.1.2	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von niedermolekularen Substanzen	15
1.2	Elektrophorese in restriktiven Gelen	16
1.2.1	Der Ferguson-Plot	16
1.2.2	Agarose-Gel-Elektrophoresen	17
1.2.3	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)	19
2	Isotachophorese	34
3	Isoelektrische Fokussierung	39
3.1	Prinzip	39
3.2	Freie Trägerampholyte	41
3.3	Immobilisierte pH-Gradienten	44
3.4	Gele für die IEF	47
3.5	Temperatur	48
3.6	Kontrolle der pH-Gradienten	49
3.7	Präparative Isoelektrische Fokussierung	49
3.8	Titrationsskurvenanalyse	50
4	Blotting	53
4.1	Prinzip	53
4.2	Transfermethoden	53
4.3	Blotmembranen	57
4.4	Puffer für elektrophoretische Transfers	58
4.5	Allgemeine Anfärbung	60
4.6	Blockieren	60
4.7	Spezial-Detektion	61
4.8	Proteinsequenzierung	62
4.9	Transfer-Probleme	63
5	Apparatives	65
5.1	Strom- und Spannungsbedingungen	65
5.2	Stromversorger	67

5.3	Trennkammern	67
5.3.1	Vertikalapparaturen	67
5.3.2	Horizontalapparaturen	68
5.4	Automatisierte Elektrophorese	71
5.5	Sicherheits-Hinweise	72
6	Auswertung von Elektrophoresen	75
6.1	Allgemeines	75
6.1.1	Reinheitskontrolle	75
6.1.2	Gehaltsbestimmungen	75
6.2	Densitometrie	77
6.2.1	Anwendung der Densitometrie	78
6.2.2	Die Optik eines Densitometers	79
6.2.3	Integration und Basislinie	82
6.2.4	Auswertung der Densitogramme	82
	Arbeitsmaterial	86
	Methoden	86
	Apparative Ausrüstung	86
	Laborausrüstung	89
	Verbrauchsmaterial	90
	Verwendete Chemikalien	91

Teil II

Methoden

Methode 1 : PAGE von Farbstoffen	95
1 Probenvorbereitung	95
2 Stammlösungen	95
3 Vorbereitung der Gießkassette	95
4 Gießen der ultradünnen Gele	98
5 Elektrophoretische Trennung	98
Methode 2: PAGE von Oligonukleotiden	101
1 Probenvorbereitung	102
2 Stammlösungen	102
3 Herstellung der leeren Gele	102
4 Elektrophoretische Trennung	105
Methode 3: Agarose- und Immun-Elektrophoresen	109
1 Probenvorbereitung	109
2 Stammlösungen	109
3 Herstellung der Gele	110
4 Elektrophoresen	114
5 Proteinnachweis	117

Methode 4: Titrationskurvenanalyse	121
1 Probenvorbereitung	121
2 Stammlösungen	121
3 Herstellung der leeren Gele	122
4 Titrationkurven-Elektrophorese	125
5 Coomassie- und Silberfärbung	128
6 Interpretation der Kurven	130
 Methode 5: Native PAGE in amphoteren Puffern	 133
1 Probenvorbereitung	134
2 Stammlösungen	134
3 Herstellung der leeren Gele	135
4 Elektrophorese	139
5 Coomassie- und Silberfärbung	142
 Methode 6: Agarose-IEF	 145
1 Probenvorbereitung	145
2 Herstellung des Agarose-Gels	146
3 Isoelektrische Fokussierung	148
4 Proteinnachweis	150
 Methode 7: PAGIEF in rehydratisierten Gelen	 153
1 Probenvorbereitung	153
2 Stammlösungen	154
3 Herstellung der leeren Gele	154
4 Isoelektrische Fokussierung	157
5 Coomassie- und Silberfärbung	159
6 Densitometrische Auswertung	161
7 Methodischer Ausblick	164
 Methode 8: SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	 167
1 Probenvorbereitung	167
2 Stammlösungen für Gelherstellung	171
3 Vorbereitung der Gießkassette	172
4 Gradienten-Gel	174
5 Elektrophorese	177
6 Coomassie- und Silberfärbung	180
7 Blotting	182
8 Densitometrie	183
9 Methodischer Ausblick	187
 Methode 9: Semidry-Blotting von Proteinen	 189
1 Transferpuffer	190
2 Technische Durchführung	191
3 Färbung von Blotfolien	195

Methode 10: IEF im immobilisierten pH-Gradienten	197
1 Probenvorbereitung	198
2 Stammlösungen	198
3 Immobiline-Rezepturen	199
4 Vorbereitung der Gießkassette	202
5 Herstellung der pH-Gradienten-Gele	203
6 Isoelektrische Fokussierung	210
7 Coomassie- und Silberfärbung	211
8 Strategie der IPG-Fokussierung	214
 Methode 11: Hochauflösende 2D-Elektrophorese	 215
1 Probenvorbereitung	216
2 Stammlösungen	217
3 Gelherstellung	218
4 Trennbedingungen	222
5 Coomassie- und Silberfärbung	225
 Anhang	
A Problemlösungen	
A 1 Isoelektrische Fokussierung	229
A 1.1 PAGIEF mit Trägerampholyten	229
A 1.2 Agarose-IEF mit Trägerampholyten	236
A 1.3 Immobilisierte pH-Gradienten	240
A 2 SDS-Elektrophorese	246
A 3 Semidry-Blotting	254
A 4 Zweidimensional-Elektrophorese (IPG-DALT)	260
 B Literatur	 265
 Sachregister	 271