

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Das tägliche Brot</b>	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 <sup>2+</sup> -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
<b>2</b>	<b>Ligandenbindung</b>	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	Tritiieren	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	<b>Auswertung von Bindungsdaten</b> .....	84
2.3.1	Die Bindung ist im Gleichgewicht .....	85
2.3.2	Kinetik.....	95
2.4	<b>Vernetzen von Liganden</b> .....	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	<b>Sinniges</b> .....	107
	Literatur .....	110
<b>3</b>	<b>Membranproteine solubilisieren</b> .....	115
3.1	<b>Seifen</b> .....	117
3.1.1	Saubere Begriffe .....	117
3.1.2	Vom Umgang mit Seifen .....	117
3.2	<b>Solubilisieren</b> .....	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
<b>4</b>	<b>Rekonstitution von Proteinen</b> .....	133
4.1	<b>Rekonstitution der Tertiärstruktur löslicher Proteine</b> .....	134
4.2	<b>Rekonstitution von Membranproteinen in Membranen</b> .....	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
<b>5</b>	<b>Säubern und Putzen</b> .....	151
5.1	<b>Putziges</b> .....	152
5.1.1	Proteinaggregation messen und verhindern .....	155
5.2	<b>Konventionelle Reinigungsmethoden</b> .....	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	<b>Affinitätschromatographie</b>	181
5.3.1	Lektinchromatographie	181
5.3.2	Liganden-Affinitätschromatographie	182
5.4	<b>Unkonventionelle Reinigungsmethoden</b>	190
5.4.1	Nicht-zerstörende präparative Massenspektrometrie	190
5.5	<b>Die Reinheitsprobe</b>	192
5.6	<b>Ausschlachten</b>	193
	Literatur	195
<b>6</b>	<b>Antikörper und Aptamere</b>	199
6.1	<b>Herstellung von polyklonalen Antikörpern</b>	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	<b>Immunpräzipitation</b>	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	<b>Immunaффinitätschromatographie</b>	209
6.4	<b>Antikörper gegen ungereinigte Proteine</b>	210
6.5	<b>Immunologische Nachweistechiken</b>	212
6.5.1	Dot-Blots	212
6.5.2	ELISA	214
6.5.3	Signalverstärkung bei Immunoassays	218
6.6	<b>Antikörperersatz: Aptamere und andere Bindungsmoleküle</b>	222
6.6.1	Aptamere	222
6.6.2	Ribosomen-Display	227
	Literatur	230
<b>7</b>	<b>Proteomics</b>	233
7.1	<b>Einführung</b>	235
7.2	<b>Probennahme</b>	238
7.2.1	Mikrodissektion mit Lasererfassung	239
7.3	<b>2D-Gelelektrophorese und andere mehrdimensionale Trenntechniken</b>	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	<b>Proteine spalten</b>	264
7.4.1	Proteasenverdau	265
7.4.2	Bromcyan- und Säurespaltung	267
7.5	<b>Massenspektrometrie von Proteinen und Peptiden</b>	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	<b>Proteinchips</b> .....	333
7.6.1	Antikörperchips .....	333
7.7	<b>Aussterbende Dinosaurier?</b> .....	336
7.7.1	Blockierte N-Termini .....	337
7.7.2	Edman-Abbau .....	338
7.7.3	Carboxyterminale Sequenzierung .....	339
7.8	<b>Rehms Proteomics-Philosophie</b> .....	340
7.9	<b>Letzels Proteomics-Philosophie</b> .....	342
	Literatur .....	342
<b>8</b>	<b>Untereinheiten</b> .....	347
8.1	<b>Stöchiometrie und Merigkeit</b> .....	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	<b>Was unsre Welt im Innersten zusammenhält</b> .....	360
	Literatur .....	361
<b>9</b>	<b>Glykoproteine</b> .....	363
9.1	<b>Wie, wo und wozu werden Proteine glykosyliert?</b> .....	364
9.2	<b>Nachweis von Glykoproteinen in Gelen</b> .....	364
9.3	<b>Nachweis von Glykoproteinen auf Blots</b> .....	365
9.3.1	Nicht-selektive Glykoproteinfärbung .....	365
9.3.2	Selektive (Lektin-)Färbung .....	365
9.4	<b>Anreicherung von Glykopeptiden für die LC/MS</b> .....	369
9.5	<b>Deglykosylierung</b> .....	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	<b>Zuckerketten</b> .....	376
9.6.1	Monosaccharidzusammensetzung .....	376
9.6.2	Aufbau und Sequenz .....	377
	Literatur .....	384
<b>10</b>	<b>Der Schatz im Silbersee</b> .....	387
10.1	<b>Vom Paper</b> .....	388
10.2	<b>Vom Schreiben eines Papers</b> .....	388
10.3	<b>Wie bringe ich andere dazu, mein Paper zu zitieren?</b> .....	390
	Literatur .....	391

<b>11</b>	<b>Durch die Wüste</b> .....	393
	Literatur .....	395
	<b>Serviceteil</b> .....	397
	Das Letzte .....	398
	Sachverzeichnis .....	399

Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics

Rehm, H.; Letzel, Th.

2016, XV, 406 S. 158 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-662-48850-8