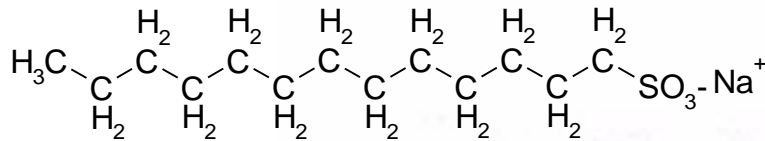
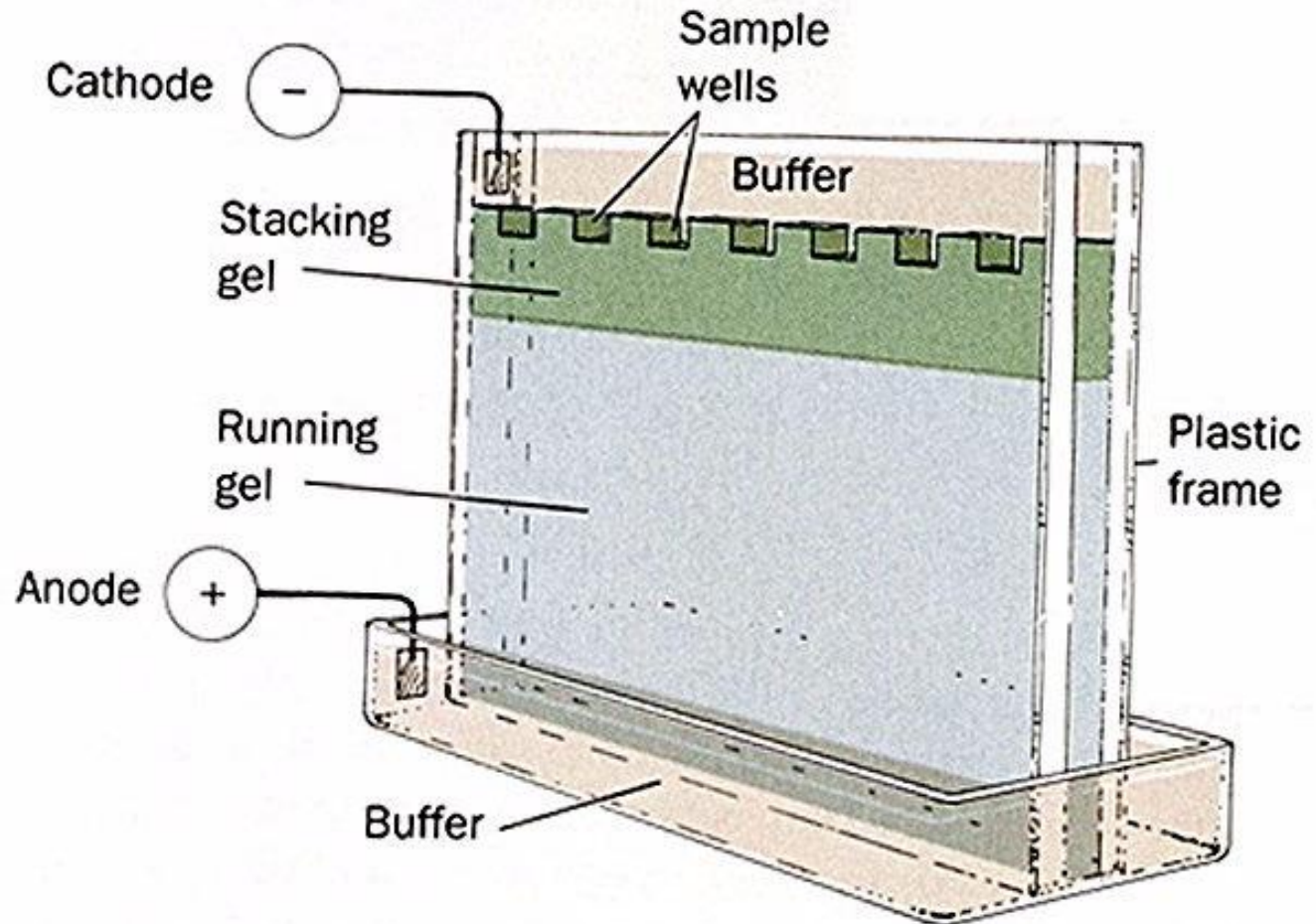


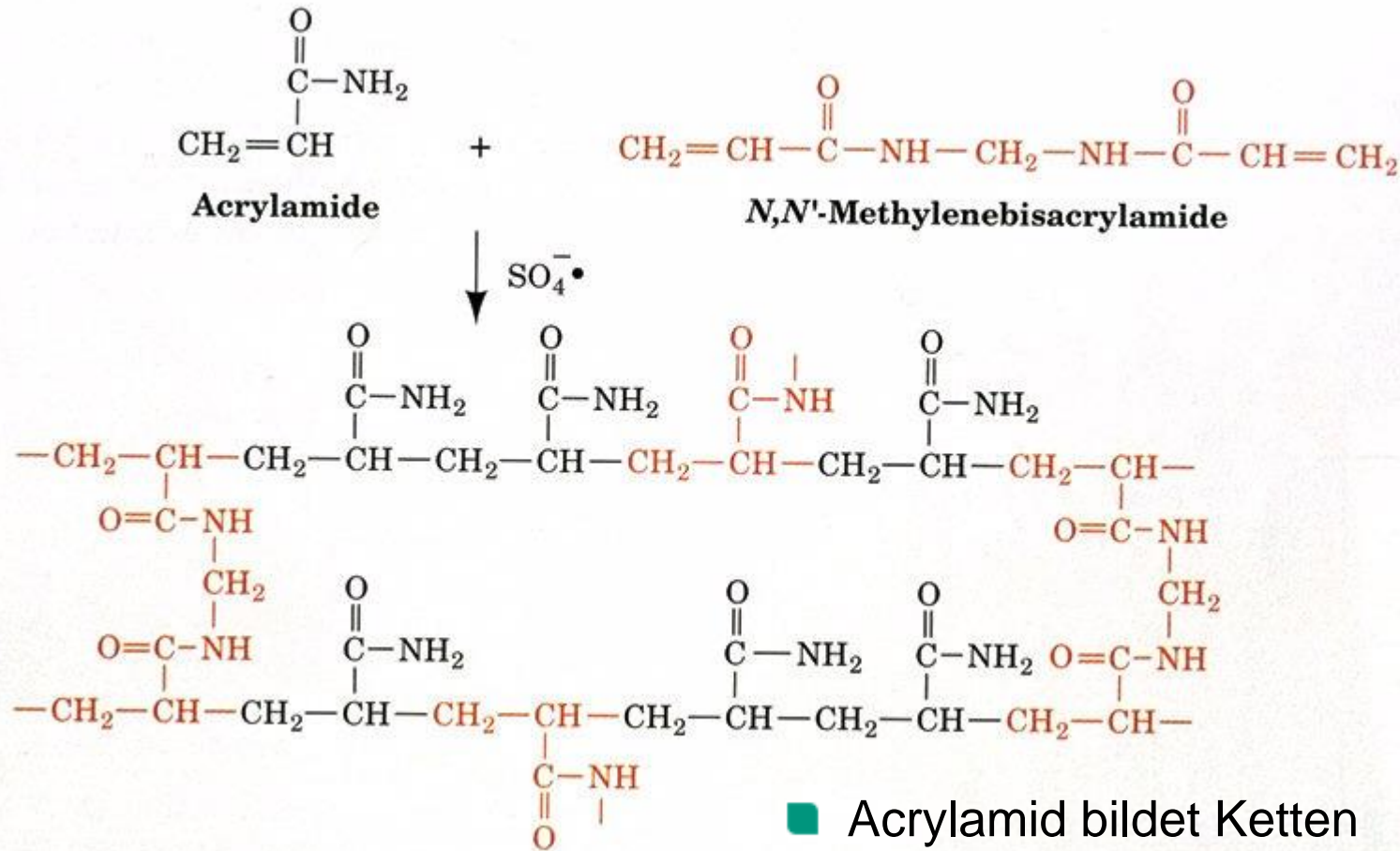
Diskontinuierliche SDS Poly- Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blotting



SDS



Elektrophorese, Acrylamid, Bisacrylamid

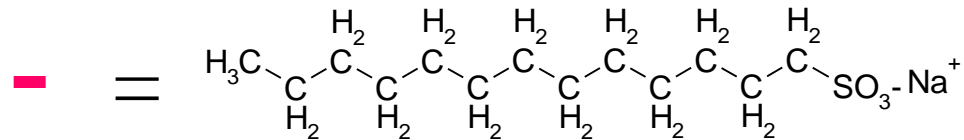
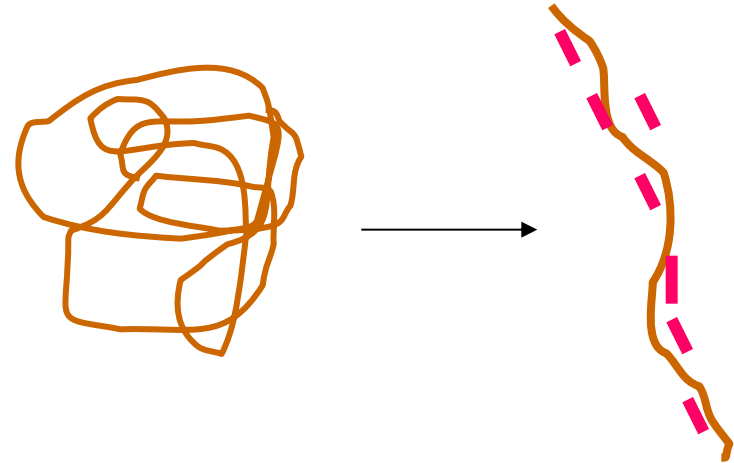


37,5 : 1

- Acrylamid bildet Ketten
- Bisacrylamid Quervernetzung
- Konzentrationen und Mischungsverhältnis bestimmen Maschengröße / Trennbereich

Wirkung von SDS

- Hydrophobe Kette bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins
- Geladenes SO_3^- interagiert mit Wasser
- Ladungen stoßen sich ab
- Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins geht verloren
- Protein ist langgestreckt, alle Proteine haben in erster Näherung die gleiche Form



Wirkung von Mercaptoethanol oder DTT

- Cys-Cys Brücken werden gespalten
- Oxidative Reaktionen werden teilweise rückgängig gemacht

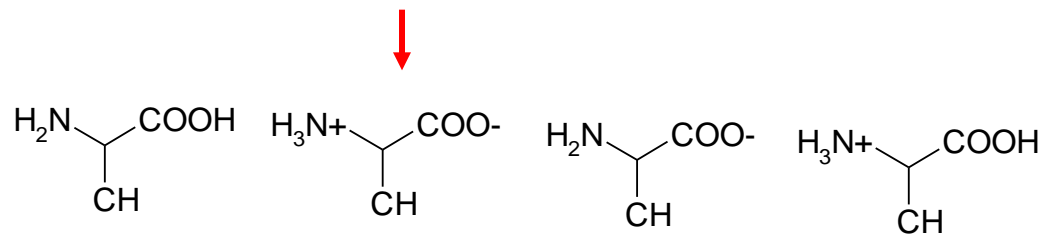
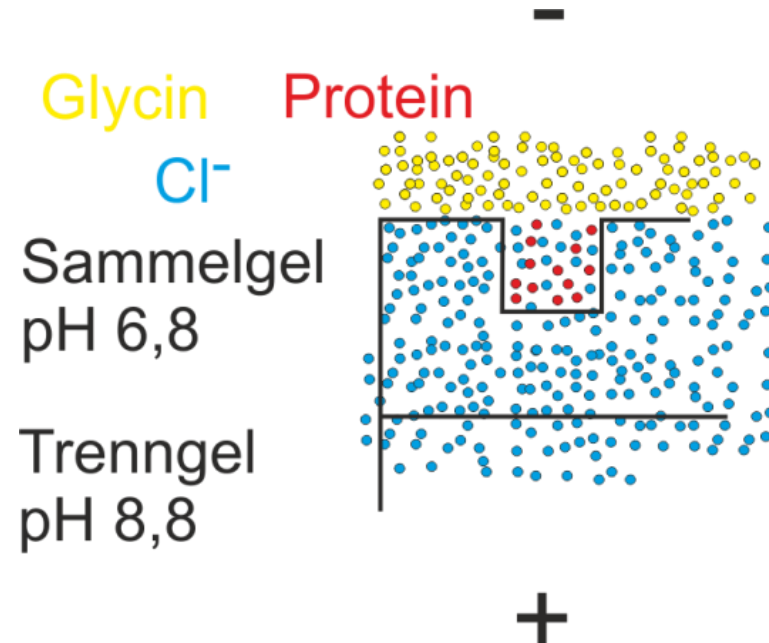
Wirkung von Glycerin

- Probe sinkt in die Tasche des Sammelgels

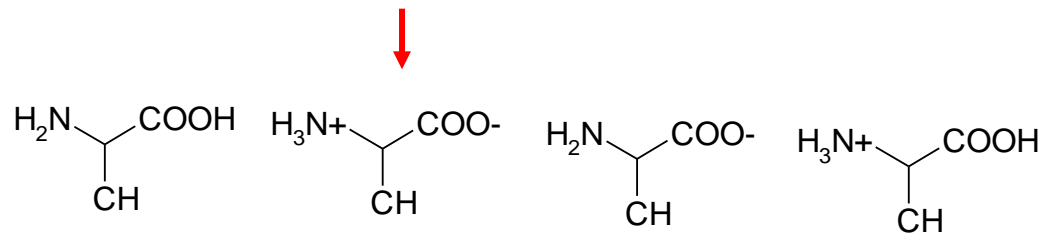
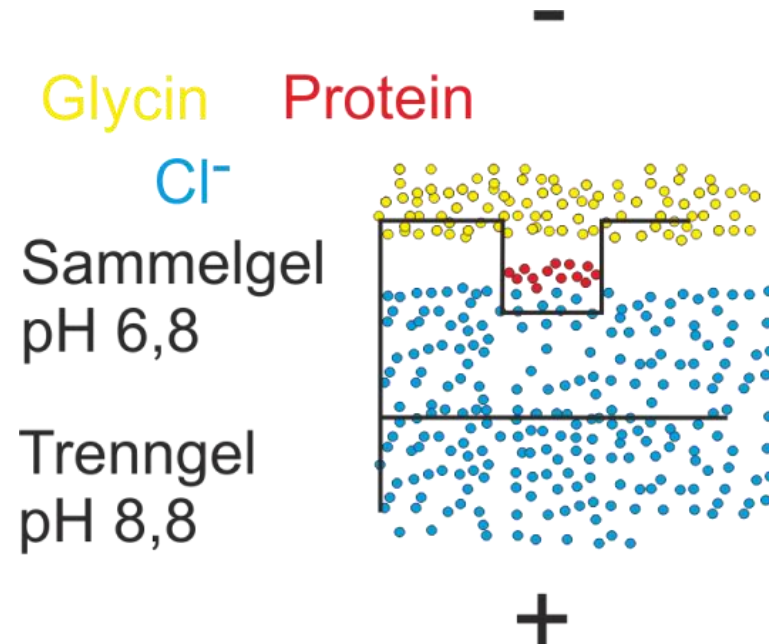
Wirkung von Bromphenolblau

- Färbt die Front

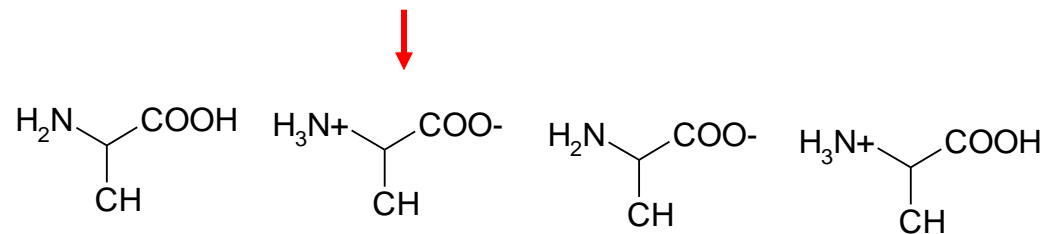
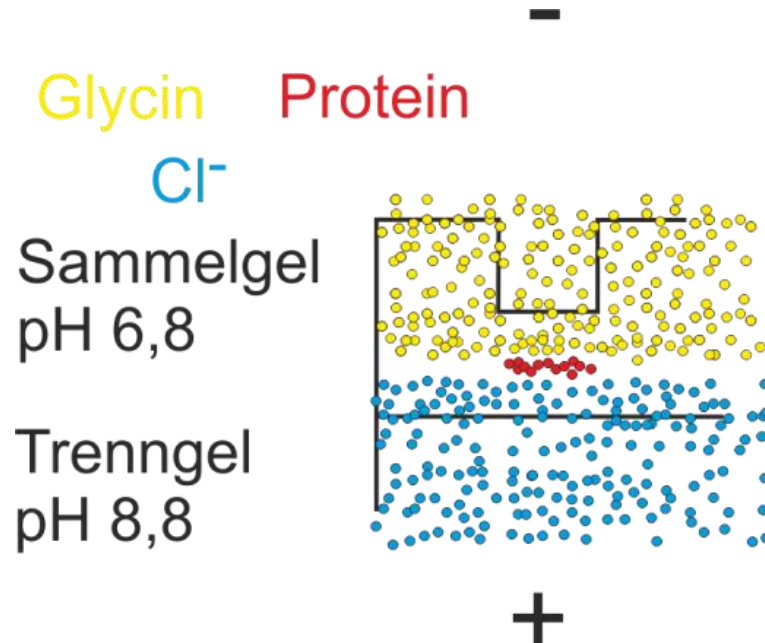
Diskontinuierliche PAGE



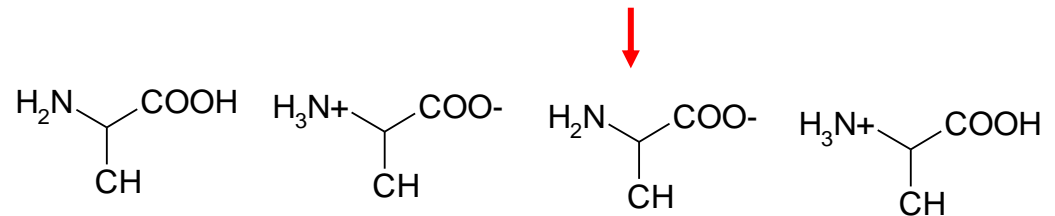
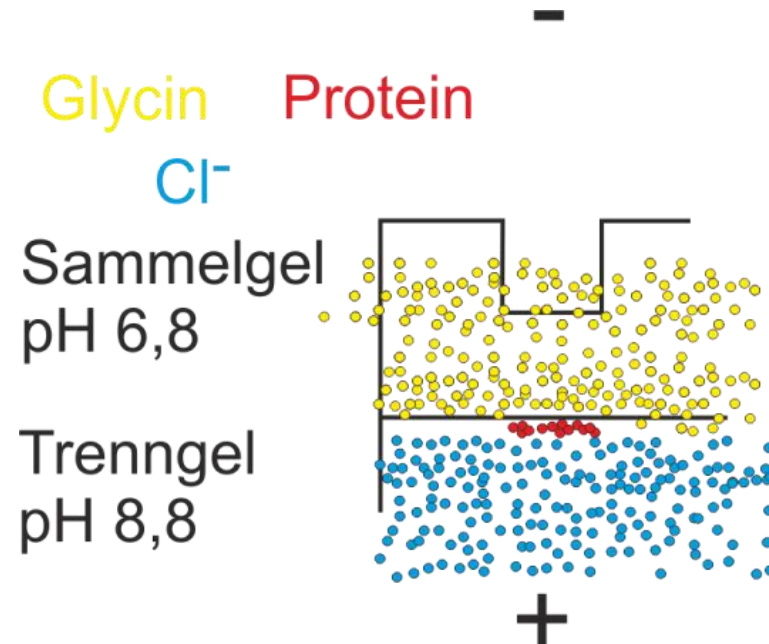
Diskontinuierliche PAGE



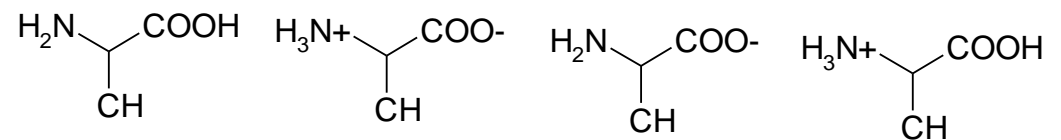
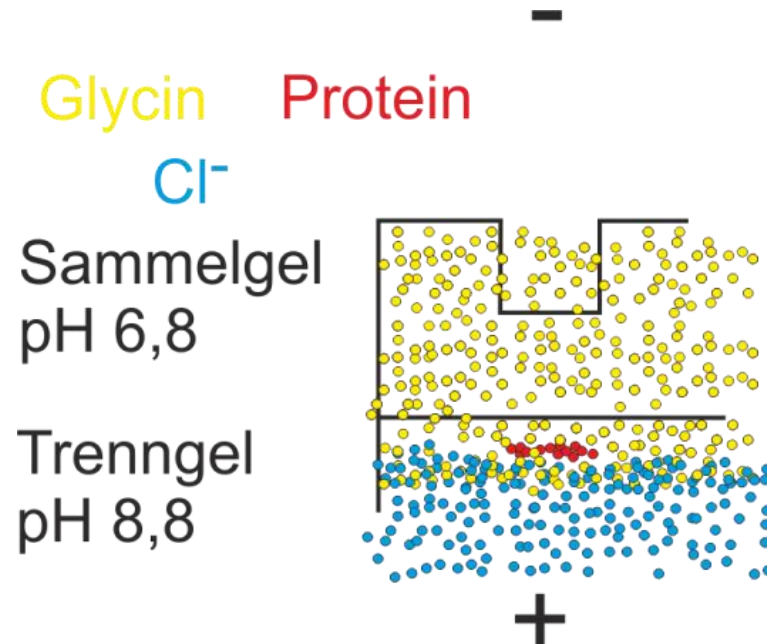
Diskontinuierliche PAGE



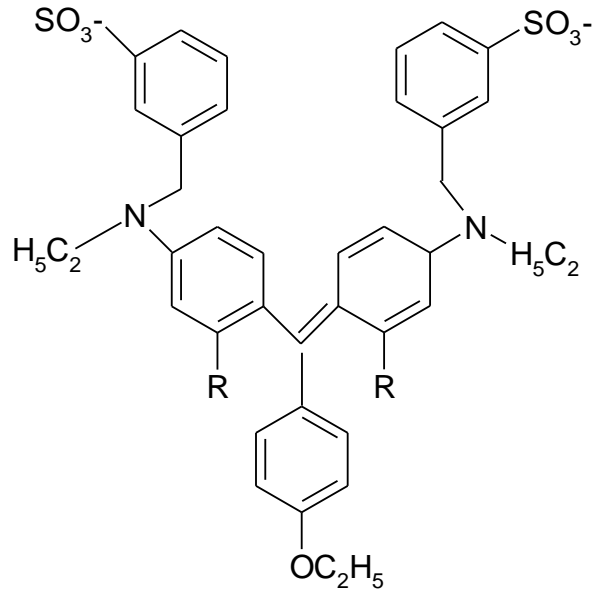
Diskontinuierliche PAGE



Diskontinuierliche PAGE



SDS-PAGE, Coomassie Färbung

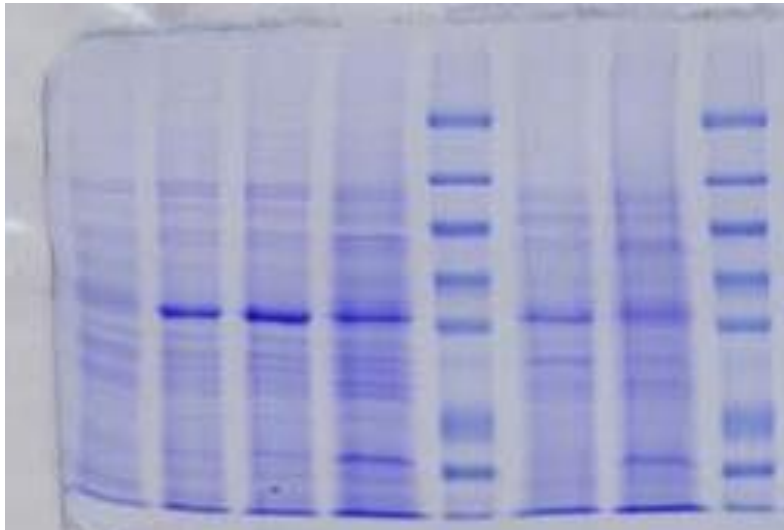


Coomassie Brilliant Blue

R250: R = H

G250: R = CH₃

Western-Blot



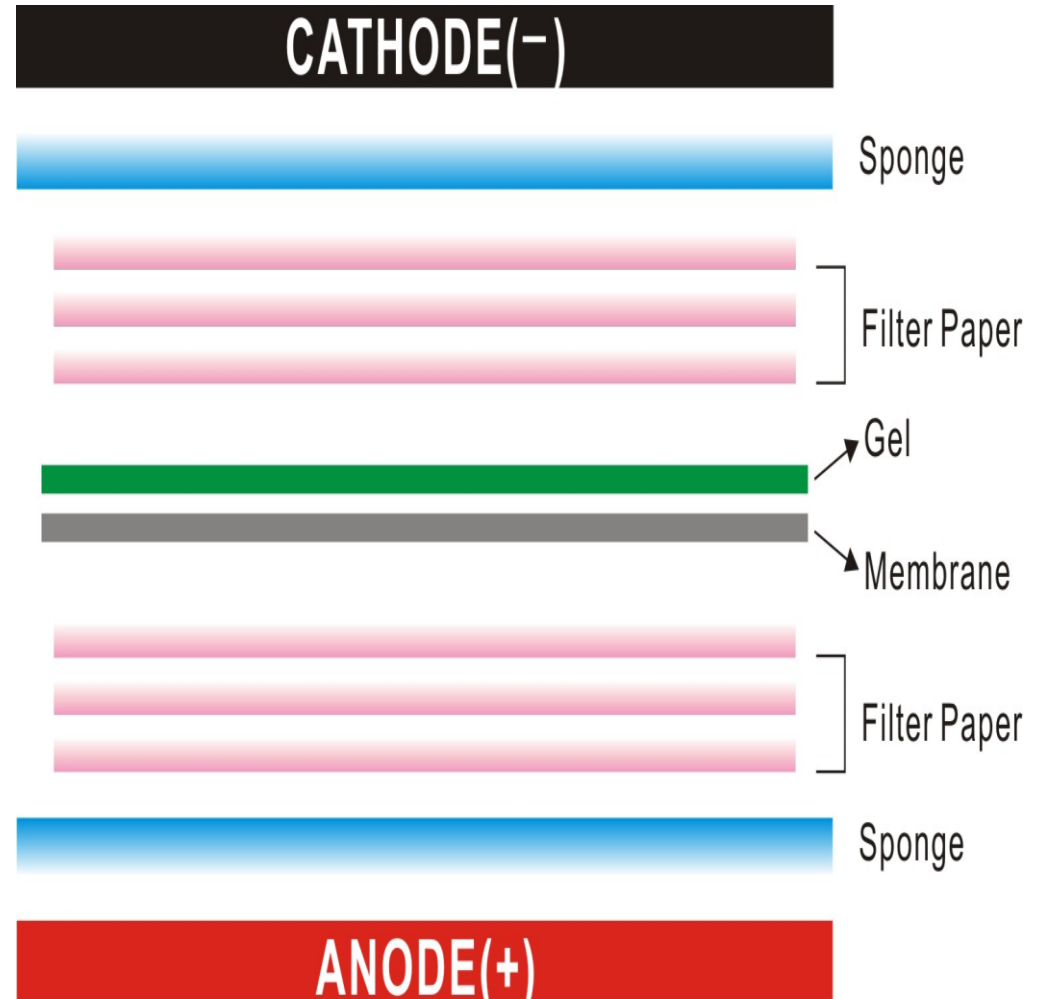
Coomassie gefärbtes Gel



Western Blot vom gleichen Gel

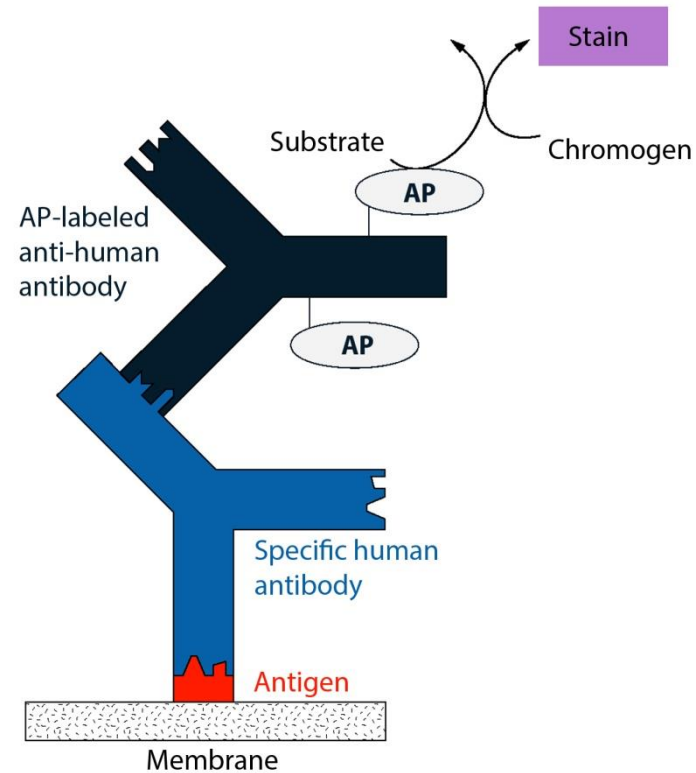
Western-Blot

- Membran: PVDF, Polyvinylidendifluorid
- Kein Schwamm
- Filter Papier: Whatman
- Kathode zum Gel, Anode zur Membran
- TGM Puffer



Western-Blot

- Primär: Anti Histidin und Anti MBP
- Sekundär: Anti-Maus und Anti-Hase mit Alkalischer Phosphatase



Western-Blot

- Transfer der Proteine auf eine PVDF (Poly-Vinyl-Difluorid) Membran
- Blocken mit BSA und Detergens
- Inkubation primärer Antikörper (bindet Phytochrom)
- Waschen mit Detergens
- Inkubation sekundärer Antikörper (*anti-rabbit*-Alkalische-Phosphatase)
- Waschen mit Detergens
- Anfärben der alkalischen Phosphatase mit BCIP und NBT