

SDS –Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Anleitung für Minigele

Mini-Gelträger nach Anleitung zusammenbauen. Saubere Handschuhe tragen!!!

Glasscheiben ordentlich putzen (EtOH). Testen ob Kammer dicht ist (Wasser einfüllen).

Gewünschte Höhe des Trenngels (bis ca. 1cm unter Kamm) mit Edding markieren.

1. Trenngel

(für je 2 /10 Minigele 10/50 ml)

	8 %	9 %	10 %	12%	15%	18%
30% Acrylamid	2.7 / 13.5ml	3 / 15ml	3.3 /16.5 ml	4 / 20 ml	4.5 / 22.5 ml	6 / 30
Lower Tris	2.5 / 12.5 ml	2.5 / 12.5 ml	2.5 / 12.5ml	2.5 / 12.5 ml	2.5 / 12.5 ml	2,5 / 12,5
Bidest	4.8 / 24 ml	4.5 / 22.5 ml	4.2 /21 ml	3.5 / 17.5 ml	3 / 15 ml	1,5 / 7,5
Temed	10 / 50 µl	10 / 50 µl	10 / 50 µl	10 / 50 µl	10 / 50 µl	10 / 50
10 % APS	100 / 500 µl	100 / 500 µl	100 / 500 µl	100 / 500 µl	100 / 500 µl	100 / 500

Bei Verwendung des 10er-Gießstandes gleiche Mengen Isopropanol auf jedes Gel geben.

10 %ige Gele sind Standard.

- Acrylamidlösung (**30:0.8 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid**), Lower Tris und Bidest. in einem kleinen Erlenmeyerkolben zusammenpipettieren und durch Schwenken mischen.
- Temed hinzufügen, vorsichtig schwenken und dann APS hinzufügen, vorsichtig schwenken.
- Mit einer Plastikpipette in die Gelkammern einfüllen.
- Mit Isopropanol vorsichtig überschichten.
- ca. 15 bis 30 Minuten auspolymerisieren lassen.
- Nach dem Auspolymerisieren Isopropanol entfernen und die Geloberkante 2 x mit Bidest spülen.
- Geloberkante mit einem Edding markieren.

2. Sammelgel

(für je 2 / 10 Gele)

30% Acrylamid	440 / 2.200µl
Upper Tris	1000 / 5.000µl
Bidest	2.6 / 13 ml
Temed	6 / 30 µl
10 % APS	40 / 200 µl

- Zutaten wie oben beschrieben zusammenpipettieren, auf das Trenngel pipettieren und Kamm einsetzen.
- Gel auspolymerisieren lassen.
- Sammelgel kann bei Bedarf mit Bromphenolblau angefärbt werden.
- Gele in die Gelkammern einspannen und Kammern mit 1 x Laemmli-Laufpuffer (pH 8,8) auffüllen. ~300ml Puffer pro Kammer für 2 Gele
- Taschenpositionen vor dem Ziehen des Kamms markieren.
- Probenauftrag mit ausgezogenen Pipettenspitzen, mehrfach verwenden.
- pro Gel bei **10 mA** einlaufen lassen und mit **20-25 mA** pro Gel trennen. Je geringer die Stromstärke, umso besser ist die Auftrennung.
- Sammelgel vollständig entfernen, Orientierung markieren (Ecke abschneiden).

Anleitung für große Gele

1. Trenngel

(für je 2 große Gele 66 ml)

	8 %	9 %	10 %	12%	15%
30% Acrylamid	17.8 ml	20 ml	22.2 ml	26.7 ml	33.3 ml
Lower Tris	16.7 ml	16.7 ml	16.7 ml	16.7 ml	16.7 ml
Bidest	32.1 ml	29.9 ml	27.8 ml	23.3 ml	16.6 ml
Temed	67 µl	67 µl	67 µl	67 µl	67 µl
10 % APS	670 µl	670 µl	670 µl	670 µl	670 µl

2. Sammelgel

(für je 2 große Gele)

30% Acrylamid	1.6 ml (4%)
Upper Tris	3 ml
Bidest	7.4 ml
Temed	20 µl

10 % APS	100 µl
----------	--------

2x Lämmli-Laufpuffer verwenden (4,5 l)!

Pro Gel bei **20 mA** einlaufen lassen und mit **35 mA** pro Gel trennen. Alternativ **10 mA** über Nacht.

Probenvorbereitung:

Probe darf maximal 100 mM Ionenstärke aufweisen. Ggf. durch Dialyse, Aceton- oder MeOH/Chloroformfällung reinigen. 0,2 Vol. 5x Laemmli-Probenpuffer zugeben und 5-10 min. bei 98°C (Gesamtzellextrakte mit hohem DNA/RNA-Gehalt für 15 min.) erhitzen. Vollständigkeit der Denaturierung durch Pipettieren testen, Probe soll nicht mehr viskos sein. Sonst länger kochen. Im heißen Zustand auftragen. Rest der Probe kann bei -20°C aufbewahrt werden. Vor erneutem Auftrag kurz auf 65°C erwärmen und sicherstellen, daß ein deutlicher Geruch von DTT wahrnehmbar ist. Wenn nicht, frisches DTT auf **20 mM** Endkonzentration zugeben.

Kurzprotokoll:

- Zellen 3 x mit PBS waschen.
- 1 ml heißen 5x Laemmli-Probenpuffer auf eine 10-cm-Schale geben.
- Zellen abschaben.
- 10 min – max. 20 min bei 95°C im Wasserbad kochen; ggf. sonifizieren.
- 10 min 14 000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand in frisches E-Gefäß.
- Aliquotieren und auf Trockeneis/Isopropanol-Bad einfrieren.
- Lagerung bei -80°C.

Zusammensetzung der Puffer:

Lower Tris:	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	181.7 g Tris
	0.4 % SDS	4 g SDS oder 20 ml 20% stock solution
	Aqua bidest.	ad 1 l
Upper Tris:	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	15.1 g
	0.4 % SDS	1 g oder 5 ml 20% stock solution
	Aqua bidest.	ad 250 ml

korrekten pH einstellen und beide Puffer autoklavieren.

Laemmli-Laufpuffer (1 x konz.):

	<u>1 x konz.</u>	<u>5 x konz.</u>
23 mM Tris-Base	2.79 g	69.655 g
190 mM Glycin	14.26 g	356.58 g
0.1% SDS	5 ml 20 %	125 ml 20%
Tris lösen, Glycin hinzufügen		
SDS zuletzt zugeben und		
mit Aqua bidest. auffüllen	1 l	5 l
pH 8,8		

5x Laemmli-Probenpuffer:

50 mM Natriumphosphat pH 6,8	10 ml 1 M NaPhosphat, pH 6.8
5 % SDS	50 ml 20% SDS
50 mM DTT	10 ml 1 M DTT
5 mM EDTA	2 ml 0.5 M EDTA
5 mM EGTA	0.38 g EGTA
20 % Glycerin ultrapur	40 ml Glycerin
0,01 % Bromphenolblau	800 µl 2.5% Bromphenolblau-Stocklösung
mit Aqua bidest. Auffüllen	<u>87,2 ml</u>
	200 ml

In 5 ml-Aliquots bei -20 C einfrieren.

Höchstens 5 x auftauen/einfrieren.

Gradientengele

für ein 1,5 mm Gel 14,5 x 12 cm (große Amersham Kammer)

	9 %	18 %
30% Acrylamid	3,9 ml	7,9 ml
Lower Tris	3,3 ml	3,3 ml
Bidest	5,7 ml	2,5 ml
Temed	14 µl	14 µl
10 % APS	95 µl	95 µl

- Acrylamidlösung (**30:0.8 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid**), Lower Tris, Bidest und APS in einem Erlenmeyerkolben zusammenpipettieren und durch Schwenken mischen.
- Optional: zur Visualisierung des Gradientens 50µl 2,5% Bromphenolblau in einen Ansatz geben.
- Die höher konzentrierte Acrylamidlösung in die vordere Kammer und die niedrig konzentrierte in die hintere Kammer des Gradientenmischers einfüllen.
- Temed hinzufügen und durch Magnetrührer mischen
- Gradientengel einlaufen lassen
- Mit Isopropanol vorsichtig überschichten.
- ca. 15 bis 30 Minuten auspolymerisieren lassen.
- Nach dem Auspolymerisieren Isopropanol entfernen und die Geloberkante 2 x mit Bidest spülen.
- weiter mit Sammelgel.