

SDS-PAGE – Herstellung der Gele

Für die Herstellung von SDS-Gelelektrophoreseapparatur Mini Protean TetraCell (Bio-Rad, München) vergleiche unten stehende Tabelle. Das Trenngel wird zwischen die Gelplatten gegossen, mit MilliQ-H₂O überschichtet und ca. 30 min polymerisiert.

Die Oberfläche des Trenngels wird dreimal mit MilliQ-H₂O gewaschen. Anschließend wird das Sammelgel darübergegossen und die Probenkämme eingesteckt. Nach ca. 45 min ist die Polymerisation abgeschlossen. Zur Lagerung können fertige Gele in fusselfreie Tücher eingeschlagen werden. Die Tücher werden mit MilliQ-H₂O befeuchtet und die so geschützten Gelpakete können in einer Plastiktüte für maximal eine Woche im Kühlschrank gelagert werden.

SDS-PAGE – Proteintrennung

Die Proteinproben werden mit Laemmli-Puffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerol in MilliQ-H₂O) vermischt (1:1 (v/v)) und davon maximal 20 µL in eine Probenflasche geladen. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgt für 15 min bei 100V (Eindringen in das Sammelgel) und 35 – 45 min bei 200V (eigentliche Trennung).

Tabelle: Zusammensetzung 12%iger Trenngele und 5%iger Sammelgele.

für 2 Gele	Trenngel 12%	Sammelgel 5%
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40% (v/v)	3.000 µL	625 µL
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	2.500 µL	–
0,5M Tris-HCL, pH 6,8	–	1.250 µL
MilliQ-H ₂ O	4.340 µL	3.040 µL
10% (v/v) SDS	100 µL	50 µL
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	20 µL	10 µL
10% (v/v) Ammoniumpersulfat	100 µL	25 µL
gesamt	10.060 µL	5.000 µL

Kolloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff

Fixierlösung: 40% (v/v) MeOH, 10% (v/v) Essigsäure

Färbelösung: 2% (v/v) Lösung A, 98% (v/v) Lösung B

25 mL je Gel; Mischung nicht lagern!

Lösung A: 5% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250 in MilliQ-H₂O

Lösung B: 2% (w/v) ortho-Phosphorsäure, 20% (w/v) (NH₄)₂SO₄ in MilliQ-H₂O

Entfärben: MilliQ-H₂O

Die Färbelösung vor dem Einsatz aus den Lösungen A und B herstellen und auf einem Schüttler für 4 Stunden durchmischen (z.B. zusammen mit den SDS-Gelelektrophoreseapparatur vorbereiten).

Die Gele nach der Entfernung der Glasscheiben mit MilliQ-H₂O waschen und in einer Box für 1 h in der Fixierlösung schwenken. Anschließend die Fixierlösung abgießen und noch zweimal mit ausreichend MilliQ-H₂O waschen.

Je 25 ml Färbelösung pro Gel hinzugeben und über Nacht schwenken. Die Entfernung von überschüssigem Coomassie erfolgte durch Schwenken der Gele in MilliQ-H₂O.