

Gebrauchsanweisung



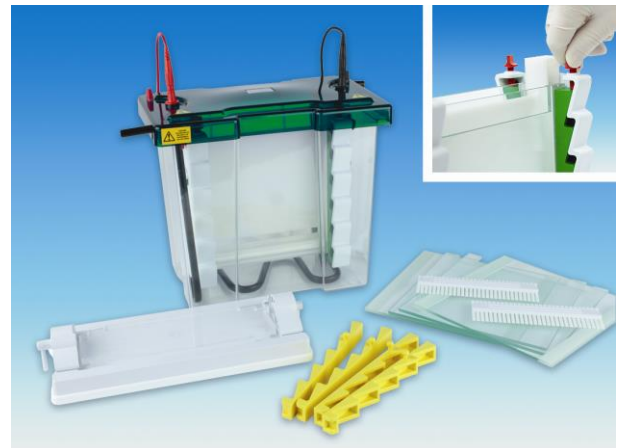
Rotiphorese® PROclamp MAXI Vertikales Elektrophorese System

5769.1

Rotiphorese® PROclamp MAXI
Elektrophorese-Kammer

Mit Zubehör und Gelgießmodul.

Zur Elektrophorese
von bis zu 4 Gelen gleichzeitig.



WICHTIGER HINWEIS:
Bitte lesen Sie die Bedienungsanleitung ausführlich vor Inbetriebnahme.

Warnhinweis:

Wie bei allen elektrischen Geräten besteht auch bei diesen Einheiten die Gefahr von tödlichen Spannungen, wenn sie an eine Stromversorgung angeschlossen werden. Die Elektrophorese-Kammern dürfen nur von qualifiziertem, technisch geschultem Personal bedient werden.

Die vertikalen Elektrophoreseeinheiten von Roth sind für langen Gebrauch und reproduzierbare Ergebnisse in Ihrem Labor konzipiert. Nehmen Sie sich bitte einen kurzen Moment Zeit um diese Anleitung zu lesen.

Diese Einheiten entsprechen den gesetzlichen CE Sicherheitsbestimmungen:
73/23/EEC: Niederspannungsvorschrift: IEC 1010-1:1990 mit Amendment 1:1992
EN 61010-1:1993/BS EN 61010-1:1993

Überprüfen Sie bitte, ob Sie das Gerät vollständig und unbeschädigt erhalten haben. Fehler oder Verluste müssen Roth sofort mitgeteilt werden. Roth kann für Waren, die ohne Mitteilung zurückgeschickt werden, keine Verantwortung übernehmen.

Sehen Sie sich die Packliste durch und überprüfen Sie, ob alle Komponenten und Zubehörteile vorhanden sind.

**Bitte bewahren Sie die gesamte Verpackung bis zum Ende der Garantifrist auf.
Bei Fragen wenden Sie sich bitte an uns, Telefonnr.: 0721/5606-0.**

SPEZIFIKATION

Technische Daten

- Anwenderfreundliche Konstruktion im Spritzgussverfahren – 100 % dicht und nicht-leckend.
- Doppelt isolierte Kabel, die bis 1000 Volt sicher sind.
- Mit Gold beschichtete, korrosionsfreie, elektrische Verbindungen, die bis 1000 Volt sicher sind.
- Eingesenkte, im Sicherheitsdeckel integrierte Stromverbindungen.
- 0,2 mm dicke Platin-Elektroden von 99,99 % iger Reinheit.
- Platin-Elektroden, die vom Benutzer selbst ausgetauscht werden können.
- Die Silikongummi-Dichtung bildet eine leckfreie Abdichtung und ist einfach zu reinigen oder auszutauschen.
- Innovativer Wellen-Klammermechanismus
- Breites Spektrum an Zubehör

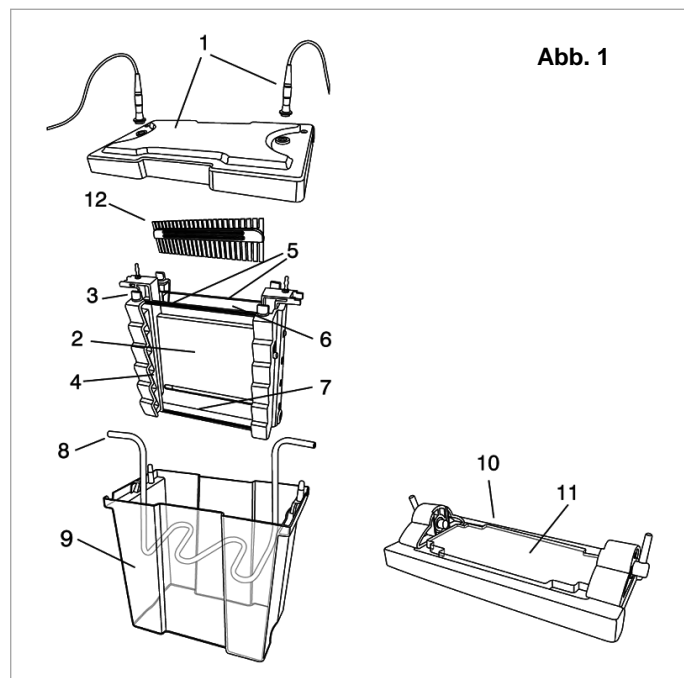
Umgebungsbedingungen

- Das Gerät darf nur in Innenräumen verwendet werden.
- Das Gerät kann ohne Sicherheitsverlust in bis zu einer Höhe von 2000 m über N. verwendet werden.
- Die normale Arbeitstemperatur liegt zwischen 4 °C und 65 °C.
- Die maximal mögliche relative Luftfeuchtigkeit beträgt 80 % bei Temperaturen bis 31 °C. Bei Temperatursteigerung auf 40 °C nimmt sie linear ab auf 50 %.

Alle Roth Produkte, die ausgeliefert werden, haben eine strenge Qualitätskontrolle durchlaufen.

AUFBAU DER KAMMER

1. Deckel und 2 Kabel
2. Laufmodul
3. Arretierungsschrauben (rot + schwarz)
4. Wellenklammern
5. Glasplatten
6. Innere Pufferkammer (= oberer Tank)
7. Gummidichtung
8. Kühlschlange (herausnehmbar)
9. Puffertank (= unterer Tank)
10. Gelgießmodul
11. Gummimatte für Gelgießmodul
12. Kamm



PACKLISTE

Inhalt	5769.1
Tank mit Deckel und Kabeln	1
Laufmodul	1
Kühlschlange (innerer ø 10mm)	1
Ausgleichsplatte (für Lauf mit 1 Gel)	1
Gelbe Wellenklammern (für Lauf mit 3-4 Gelen)	4
Ohrenglasplatte (20x20cm)	2
Glasplatte (20x20cm) mit fixierten 1mm Spacern	2
1mm Kamm mit 24 Taschen	2
Gelgießmodul	1

ZUBEHÖR

(Das Zubehör kann unter den angegebenen Bestellnummern bei Carl Roth GmbH + Co. KG bezogen werden. Weitere Reagenzien und Zubehör für die PAGE finden Sie im Anhang und Punkt L.)

Module und Zubehör

	VE	Best.-Nr.
Puffertank (ohne Deckel und Kühlschlange)	1 Stück	5807.1
Ersatzdeckel für Puffertank (inkl. Kabel)	1 Stück	5809.1
Laufmodul	1 Stück	5786.1
Gelgießmodul	1 Stück	5792.1
Ersatzgummimatte für Gelgießmodul	1 Stück	5793.1
Kühlschlange (innerer ø 10mm)	1 Stück	5812.1

Glasplatten und Spacer

	Dicke (mm)	VE	Best.-Nr.
Standard-Glasplatte (20x20cm)	4,0	1 Paar	5870.1
Ohrenglasplatte (20x20cm)	4,0	1 Paar	5871.1
Ausgleichsplatte (20x20cm)	10,0	1 Stück	5875.1
Glasplatte mit Spacern (20x20cm)	0,75	1 Paar	5877.1
Glasplatte mit Spacern (20x20cm)	1,0	1 Paar	5878.1
Glasplatte mit Spacern (20x20cm)	1,5	1 Paar	5893.1
Glasplatte mit Spacern (20x20cm)	2,0	1 Paar	5897.1
Ohrenglasplatte mit Spacern (20x20cm)	0,75	1 Paar	5904.1
Ohrenglasplatte mit Spacern (20x20cm)	1,0	1 Paar	5906.1
Ohrenglasplatte mit Spacern (20x20cm)	1,5	1 Paar	6011.1
Ohrenglasplatte mit Spacern (20x20cm)	2,0	1 Paar	6020.1
Spacer (1,9x20cm)	0,75	1 Paar	5908.1
Spacer (1,9x20cm)	1,0	1 Paar	5917.1
Spacer (1,9x20cm)	1,5	1 Paar	5921.1
Spacer (1,9x20cm)	2,0	1 Paar	5922.1

Kämme

Taschen	1 + 1	5	10	18	24	30	36	48
Dicke (mm)	Best.-Nr.	Best.-Nr.	Best.-Nr.	Best.-Nr.	Best.-Nr.	Best.-Nr.	Best.-Nr.	Best.-Nr.
0,75	5925.1**	5928.1	5934.1	5936.1*	5940.1	5941.1	5944.1*	5947.1
1,0	5949.1**	5952.1	5953.1	5955.1*	5957.1	5959.1	5960.1*	5961.1
1,5	5962.1**	5964.1	5967.1	5968.1*	5969.1	5970.1	5971.1*	5972.1
2,0	5974.1**	5977.1	5981.1	5983.1*	5984.1	5999.1	6005.1*	6007.1
Max. Probenvolumen pro Tasche								
0,75	1100 µl	160 µl	80 µl	40 µl	30 µl	25 µl	20 µl	15 µl
1,0	1500 µl	200 µl	100 µl	50 µl	40 µl	35 µl	25 µl	20 µl
1,5	2200 µl	320 µl	160 µl	80 µl	60 µl	50 µl	40 µl	30 µl
2,0	3000 µl	400 µl	200 µl	100 µl	80 µl	70 µl	50 µl	40 µl

*Kompatibel mit Mehrkanalpipette

**Kämme für präparative Gele

BETRIEBSDATEN

Für Gele von 1 mm Dicke

Tabelle 1

Puffervolumen		ca. Gelvolumen
Oberer Tank	Unterer Tank	
640 ml (max.)	5400 ml (max.) für 2 Gele 4800 ml (max.) für 4 Gele	35 ml pro Gel

Spannung (V)		Stromstärke (mA)	
maximal	empfohlen	maximal	empfohlen
350 V (2-4 Gele)	92 -120 V (Sammelgel) 120 – 180 V (Trenngel)	30 mA (1 Gel) 60 mA (2 Gele)	35 mA (2-4 Gele)

BENUTZUNG DER VERTIKALEN GELELEKTROPHORESE-EINHEITEN

A. Sicherheitsvorkehrungen

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung bitte vollständig durch, bevor Sie die Kammer in Betrieb nehmen.

Trennen Sie in jedem Fall die Elektrophoreseeinheit vom Netzgerät, bevor Sie den Schutzdeckel abnehmen. Trennen Sie zuerst das Netzgerät von der Stromversorgung, bevor Sie die Kabel entfernen.

Überschreiten Sie nicht die maximal zulässige Arbeitsspannung oder Stromstärke (siehe Tabelle 1).

Acrylamid ist ein flüchtiges, sich anreicherndes Neurotoxin und vermutlich krebserregend. Tragen Sie bei der Arbeit mit Acrylamid immer Schutzkleidung und befolgen Sie genau die Arbeitsanleitung sowie die Vorschriften zur Entsorgung. Polymerisierte Gele enthalten Reste von unpolymerisiertem Monomer. Arbeiten Sie ausschließlich mit Schutzhandschuhen.

Füllen Sie das Gerät nicht über die maximale Füllhöhe mit Laufpuffer auf.

Bewegen Sie das Gerät während des Laufs nicht.

ACHTUNG:

Während der Elektrophorese werden an den Elektroden sehr kleine Mengen verschiedener Gase gebildet. Die Art des gebildeten Gases ist abhängig von der Zusammensetzung des verwendeten Puffers. Damit sich diese Gase verflüchtigen können, muß sichergestellt sein, dass das Gerät in einem gut belüfteten Raum verwendet wird.

B. Allgemeine Pflege und Wartung

Reinigen Sie das Gerät regelmäßig mit handwarmem Wasser und einer milden Seifenlösung. Häufig ist ein Spülen mit destilliertem Wasser völlig ausreichend. Trocknen Sie vor Gebrauch die Einzelteile mit sauberen Tüchern z.B. Roth Tissue-Tücher (Best.-Nr. 0087.1)

Wichtig: Acrylglas ist unbeständig gegenüber aromatischen und halogenierten Kohlenwasserstoffen, Ketonen, Estern, Alkoholen (>25 %) und Säuren (>25 %); sie sind besonders für das UV-transparente Plastik ungeeignete Reinigungsmittel und dürfen nicht verwendet werden. Verwenden Sie keine Scheuermittel. Die Kammern dürfen nicht mit folgenden Reinigungsmitteln in Kontakt kommen, da diese einen irreversiblen und zunehmenden Schaden verursachen: Aceton, Phenol, Chloroform, Tetrachlormethan, Methanol, Ethanol, Isopropanol, Alkali.

Vor Gebrauch und danach monatlich muss das Gerät auf Undichtigkeit geprüft werden. Sie können das Gerät auf ein Blatt saugfähiges Papier stellen und mit destilliertem Wasser bis zur maximalen Füllhöhe auffüllen. Mögliche Undichtigkeiten werden Sie auf dem Papier sehen. Entdecken Sie eine Undichtigkeit, versuchen Sie bitte nicht, das Gerät zu reparieren oder es in Betrieb zu nehmen, sondern benachrichtigen Sie umgehend die Firma Carl Roth GmbH+Co. KG (0721/5606 – 172).

Die Platinelektroden sind aus Sicherheitsgründen teilweise ummantelt. Wenn Sie den Haupttank reinigen, verwenden Sie im Elektrodenbereich bitte trotzdem keine Reinigungsbürsten.

Stellen Sie bitte sicher, dass die elektrischen Verbindungen vor Gebrauch oder Lagerung trocken und sauber sind.

C. RNase Dekontamination

Kann mit dem folgenden Protokoll durchgeführt werden:

Reinigen Sie das Gerät mit einem milden Detergens wie vorgegeben.

Waschen Sie 10 min mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂).

Spülen Sie mit 0,1 % DEPC-behandeltem, destilliertem Wasser.

Vorsicht: DEPC ist möglicherweise krebserregend. Treffen Sie immer die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen beim Gebrauch.

Roti[®]-Nukleinsäurefrei (Best.-Nr. HP69) und RNase AWAY^(TM) (Best.-Nr. A998) können ebenfalls verwendet werden. Bitte lesen Sie die Verwendung in der jeweiligen Bedienungsanleitung nach.

D. Anbringen der Elektrodenkabel

1. Bitte beachten Sie die Position des Deckels auf dem Gerät. Die Farben zeigen die korrekte Polarität und Orientierung der Kabel an – schwarz für negativ und rot für positiv.
2. Nehmen Sie den Deckel vom Gerät ab. Bitte beachten: Beim Versuch, die Kabel in den Deckel zu schrauben, während dieser auf der Kammer aufsitzt, können Sie die Goldbeschichtung der Elektroden beschädigen.
3. Ziehen Sie die Kabel in den Gewindelöchern so fest wie möglich an, damit keine Lücke zwischen Deckel und Kante der Kabelverschraubung entsteht.
4. Legen Sie den Deckel wieder auf.

E. Vorbereitung der Glasplatten

1. Reinigen Sie die Glasplatten, Abstandhalter (Spacer) und Kämme mit einem milden Detergens (z.B. Spülmittel). Verwenden Sie keinesfalls Scheuermittel. Für Gele, die eine besonders saubere Oberfläche benötigen (z.B. große oder sehr dünne Gele, Silberfärbung), können Sie die Glasplatten anschließend noch mit Ethanol, Aceton und wieder mit Ethanol reinigen.
2. Die Glasplatten können durch Bedampfen mit Dimethyldichlorsilan silanisiert werden, wenn dies zur leichteren Trennung der Platte vom Gel nach dem Gellauf benötigt wird.
3. Wir empfehlen, die Glasplatten nur mit Handschuhen anzufassen (Fingerabdrücke können mit Aceton entfernt werden).

F. Zusammenfügen der Glasplatten

Legen Sie die gesäuberten Glasplatten mit den fixierten Spacern nach oben auf eine ebene, saubere Unterlage und legen Sie die ebenfalls gesäuberten, eingebuchteten Glasplatten (Ohrenplatten) passgerecht darauf.

Bitte beachten: Die Glasplatten mit fixierten Spacern tragen an der Oberkante der Spacer einen Pfeil als Markierung, um die obere Seite der Platten zu markieren.

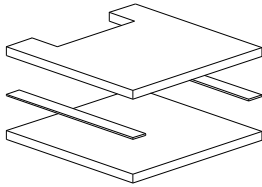
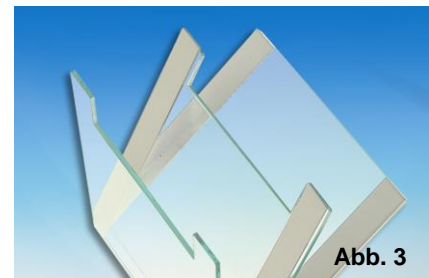


Abb.2 Zusammenfügen von Glasplatten ohne fixierte Spacer

Sollten Sie Standard-Glasplatten ohne fixierte Spacer verwenden, legen Sie die Spacer längs außen an die kurzen Seiten der Platten und legen Sie die Ohrenplatte darauf. Achten Sie darauf, dass die matt geschliffene Seite der Glasplatten später die untere Kante bildet.

Für den gleichzeitigen Lauf von 3-4 Gelen sind dreifache Glasplattensandwiches nötig. In ihnen können 2 Gele nebeneinander gegossen werden. Dazu verwenden Sie eine Standard- Glasplatte mit fixierten Spacern und 2 Ohrenplatten – 1x mit und 1x ohne fixierte Spacer (Abb. 3). Geeignet sind Gele von 1 bis 2 mm Dicke.



G. Vorbereitung des Gellaufmoduls

Das Gellaufmodul besitzt an jeder Seite grüne, wellenförmige Druckleisten, die sich in entsprechenden Ausbuchtungen befinden. Durch Anziehen der schwarzen bzw. roten Arretierungsschrauben oberhalb der Druckleisten werden diese nach unten und gleichzeitig gegen die Glasplatten gedrückt (Abb. 4). So wird ein gleichmäßiger Druck auf die Dichtkanten der Glasplatten erzeugt, was zu einer kompletten Abdichtung des Gels führt. Vor dem Einsetzen der Glasplatten müssen die Schrauben gelockert sein und die Druckleisten oben in den Ausbuchtungen sitzen.

Für den gleichzeitigen Lauf von 3-4 Gelen ersetzen Sie die grünen Druckleisten durch die etwas schmalere, gelben Leisten (im Set enthalten). Jede Druckleiste besitzt einen Stabilisierungsstift am oberen Ende, mit dem sie im Laufmodul verankert ist. Der Stift sitzt in einer rechtwinkligen Führungsschiene im Laufmodul (Abb. 5). Ist die Arretierungsschraube gelockert, befindet sich der Stift im Winkel zwischen der waagerechten und senkrechten Führungsschiene. Zieht man die Arretierungsschraube an, wird er nach unten in die senkrechte Schiene gedrückt. Zum Entfernen der Leiste müssen die Arretierungsschrauben immer gelockert sein. Schieben Sie die Leiste waagerecht Richtung Mittelstrebe des Laufmoduls, drücken Sie den Stift aus der Führungsschiene und lassen Sie die Leiste herausfallen. Entsprechend setzen Sie die gelben Leisten ein, indem Sie den Stabilisierungsstift in die waagerechte Führungsschiene drücken und nach vorn schieben.



1. Stellen Sie das Gellaufmodul auf eine flache Oberfläche. Setzen Sie den Einsatz **noch nicht** in das Gelgießmodul.
2. Lockern Sie die Arretierungsschrauben und setzen Sie die Glasplattensandwiches ein. Dann ziehen Sie die Arretierungsschrauben wieder an. Wird nur ein Gel gegossen, muss die Dummyplatte in die zweite Position gebracht und vollständig angezogen werden. Prüfen Sie jetzt bitte, ob die unteren Kanten der Spacer und Glasplatten auf gleicher Höhe sind.

Zum Einsetzen der dreifachen Glasplattensandwiches – vor allem bei 1,5 und 2 mm dicken Gelen – empfehlen wir, das Laufmodul auf die Seite zu legen, einen eventuellen Widerstand der Dichtung zu überwinden. Dabei muss sich die Seite, auf der die Glasplatten eingesetzt werden sollen, unten befinden. Die Arretierungsschrauben müssen gut gelockert sein. Schieben Sie das Sandwich waagerecht in den Zwischenraum zwischen Druckleisten unten und Mittelstrebe des Laufmoduls mit Dichtung oben. Die Ohren-Glasplatten zeigen dabei nach oben. Anschließend

stellen Sie das Laufmodul wieder aufrecht, überprüfen Sie die Kanten der Platten und Spacer (s.o.) und ziehen Sie die Arretierungsschrauben an.

3. Setzen Sie das Gellaufmodul in das Gelgießmodul ein. Dabei müssen die Nockenstifte ganz nach außen gezogen sein und die Hebel der Nockenstifte nach unten zeigen. Drücken Sie das Gellaufmodul leicht nach unten und schieben Sie jetzt die Nockenstifte nach innen in die Bohrungen des Gellaufmoduls.
4. Drehen Sie die Nockenstifte an den Hebeln in entgegengesetzter Richtung nach oben, bis das Gellaufmodul fest am Gelgießmodul ansitzt und die Glasplatten in die Silikonmatten eingedrückt sind. **Achten Sie bitte darauf**, dass nicht zu viel Druck ausgeübt wird, da dann die Glasplatten nach oben geschoben werden und die Gelgießeinrichtung möglicherweise undicht wird. Das Gerät ist jetzt für die Gelvorbereitung und das Gießen bereit.
5. Drehen Sie die Silikonmatte nach jedem Gießen um, um zu vermeiden, dass durch das Eindrücken der Glasplatten Vertiefungen entstehen. Lassen Sie niemals das vorbereitete Gelgießmodul mit festgezogenem Gellaufmodul stehen, da hierdurch Abdrücke in den Silikonmatten entstehen können.

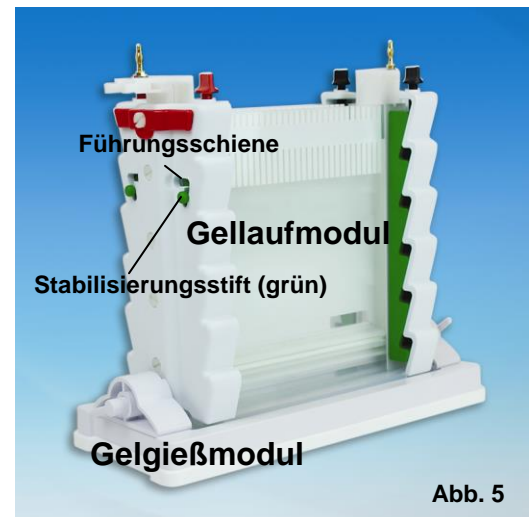


Abb. 5

H. Das Gießen des Geles

Für reproduzierbare Ergebnisse und für Ihre Sicherheit empfehlen wir die Verwendung von Acrylamid-Stammlösungen z.B. Rotiphorese® Gel 30 oder Rotiphorese® Gel 40; weitere Acrylamid-Stammlösungen für Ihre Anwendungen finden Sie im Roth-Gesamtkatalog. Acrylamid-Lösungen sollten an einem kühlen, dunklen Ort (Kühlschrank) gelagert werden. Zum Gießen des Gels sollten die Lösungen Raumtemperatur haben, aber bringen Sie nur das für das Gel / die Gele benötigte Aliquot auf Raumtemperatur. Vermeiden Sie Hitze- und Sonnenexposition.

1. Trennung von Proteinen: Für ein 12 %iges Gel der Größe 20 x 20 cm setzen Sie insgesamt 100 ml in einem sauberen Glasgefäß an: 40 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung, 25 ml Tris (1,5 M, pH 8,8), 1 ml SDS (10 %), destilliertes Wasser ad 100 ml. Direkt vor dem Gießen zugeben: 1 ml frisch angesetztes Ammoniumpersulfat (10 %), 40 µl TEMED.
Trennung von DNA: Für ein 12 %iges Gel der Größe 20 x 20 cm setzen Sie insgesamt 100 ml in einem sauberen Glasgefäß an: 40 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung, 20 ml 5 x TBE, destilliertes Wasser ad 100 ml. Direkt vor dem Gießen zugeben: 700 µl frisch angesetztes Ammoniumpersulfat (10 %), 40 µl TEMED.
Mischen ohne Luftblasen zu erzeugen.
2. Testen Sie ein kleines Volumen in einem extra Gefäß, bevor Sie das Gel gießen. Die Polymerisation sollte innerhalb von 5-10 Minuten stattfinden. Ist das nicht der Fall, adaptieren Sie die Bedingungen, indem Sie die zugegebene TEMED-Menge entsprechend erhöhen oder erniedrigen. Gießen Sie das Gel nicht im direkten Sonnenlicht.
3. Das Gelgießen kann direkt in der Gelgießeinheit durchgeführt werden. Füllen Sie das Gemisch langsam zwischen die Glasplatten ein. Vermeiden Sie die Bildung von Luftblasen.
4. Wenn Sie ein Zweiphasengel (Sammelgel und Trenngel) gießen wollen, gießen Sie zuerst das Trenngel (s. oben) bis etwa 3 cm unter den Rand der Einbuchtung der Ohrenplatte. Achten Sie darauf, dass sich keine Luftblasen im Gel befinden und überschichten Sie das Trenngel vorsichtig 3-5 mm hoch mit Isopropanol. Durch den Luftabschluss erzielen Sie eine bessere Polymerisation.
5. Nach der Polymerisation des Trenngels gießen Sie das überschichtete Isopropanol weg. Saugen Sie Restmengen Isopropanol mit einem Filterpapier ab, vermeiden Sie dabei jeden Kontakt zur Geloberfläche. Spülen Sie den oberen Rand des Trenngels einmal mit destilliertem Wasser und saugen Sie die Flüssigkeitsreste wieder ab.
6. Setzen Sie jetzt das Sammelgel frisch an und gießen Sie es. Stellen Sie beim Einfüllen der Kammer sicher, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden. Sammelgele bestehen i. d. R. aus 5 % konzentriertem Acrylamid. Setzen Sie insgesamt 20 ml in einem sauberen Glasgefäß an: 3,3 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung, 2,5 ml Tris (1 M, pH 6,8), 200 µl SDS (10 %), destilliertes Wasser ad 20 ml. Direkt vor dem Gießen zugeben: 200 µl frisch angesetztes Ammoniumpersulfat (10 %), 20 µl TEMED.
7. Schieben Sie sofort vorsichtig einen Kamm zwischen die Gelplatten und lassen Sie die Acrylamidlösung auspolymerisieren.
Vorsicht: Schieben Sie den Kamm langsam ein! Vermeiden Sie ein Spritzen des Acrylamids! Wir empfehlen, für diesen Schritt einen Augenschutz zu tragen.

8. Sobald das Sammelgel polymerisiert ist, können Sie das Gel verwenden. Entfernen Sie die Halter des Gelgießstandes und entnehmen Sie das Laufmodul mit den gegossenen Gelen.
Für den Lauf: Öffnen Sie **nicht** die Schrauben am Laufmodul, sondern setzen Sie es mit den Gelen in den Tank ein.
Für eine Lagerung: Öffnen Sie vorsichtig die Schrauben. Schlagen Sie das Gel leicht feucht in Klarsichtfolie ein und lagern Sie es bei 4 °C für maximal 2 Tage.

I. Gel- und Puffervolumina / Bedingungen für den Gellauf / Kühlung

Falls Sie mit nur einem Gel arbeiten, bringen Sie bitte auf der anderen Seite des Laufmoduls die Ausgleichsplatte an. Gießen Sie mind. 1 l Laufpuffer in den äußeren (unteren) und ca. 640 ml Laufpuffer in den inneren (oberen) Puffertank. Für einen optimalen Stromfluss muss das Glasplattensandwich unten vollständig in die Flüssigkeit eintauchen und oben bis über die Geltaschen mit Pufferlösung bedeckt sein.

Laufpuffer für Proteingele: Tris-Glycin-Puffer: 25 mM Tris-base, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1 % SDS

Laufpuffer für DNA-Gele: 1 x TBE-Puffer

Einige Richtlinien für die Arbeitsbedingungen sind in Tabelle 1 dargestellt, jedoch variieren die Bedingungen in Abhängigkeit von der Gelanzahl, ihrer Zusammensetzung und dem Vernetzungsgrad Polyacrylamids. Der benötigte Strom nimmt proportional zur Gelanzahl oder Geldicke zu, vorausgesetzt die Spannung erweist sich nicht als begrenzend. Zum Beispiel benötigen 2 Gele eine doppelt so hohe Stromstärke wie ein Gel, bei gleicher Spannung. Durch Erhöhung der Gelkonzentration erhöht sich der elektrische Widerstand und dadurch verringert sich die Wanderungsgeschwindigkeit. Es können höhere Spannungen angelegt werden, achten Sie jedoch bitte darauf, dass das Gel nicht überhitzt wird. Die Leitfähigkeit von Gelen mit nicht dissoziierenden Puffersystemen variiert enorm und die Bedingungen müssen empirisch bestimmt werden.

Wenn Sie mit Gel-Kühlung arbeiten möchten, legen Sie vor dem Einsetzen des Laufmoduls die Kühlschlange in den Puffertank. Sie muss an eine geeignete Wasserzufuhr und -ableitung angeschlossen werden. Der innere Durchmesser der Kühlschlange beträgt 10 mm.

Die Angaben zu den Laufbedingungen dienen nur als Richtlinien und gelten für SDS-Tris-Glycin-Gele. Sollten die Platten heiß werden, erhöhen Sie die Wasserflussraten innerhalb der empfohlenen Grenzen oder reduzieren Sie die Stromstärke.

J. Probenauftrag

- Entfernen Sie vorsichtig den Probenkamm und spülen Sie sofort die Vertiefungen mit einer Spritze oder Plastikpasteurpipette mit Laufpuffer aus.
Bei Verwendung von denaturierenden SDS-Gelen ist kein Vorlauf nötig. Bei nativen Proteingelen oder bei DNA-Gelen lassen Sie diese bitte ca. 30 Min. im Gerät vorlaufen, bevor sie die Proben auftragen.
Der Tabelle 2 können die Proteinmengen entnommen werden, die erfolgreich auf ein Gel aufgetragen werden können.

Tabelle 2

Geltasche	Einzelbande	zahlreiche Banden	Probenvolumen
1 mm x 5 mm	1,25 – 7,5 µg	35-75 µg	<60 µl
1,5 mm x 5 mm	1,25 -12,5 µg	65-125 µg	<95 µl

- Versetzen Sie Ihre Proteinproben mit 1/3 Volumen Roti-Load 4fach (SDS-Laufpuffer) oder nehmen Sie das Pellet in ca. 30 µl 1 x Roti-Load auf. Erhitzen Sie die Probe für 3 Min. auf 100 °C oder für 5 Min. auf 80 °C. Zentrifugieren Sie sie für 5 Min. bei 12000 g.
DNA wird mit 1/5 Volumen 6 x Probenpuffer versetzt (z. B. 6 x Roti-Load DNA) oder pelletierte DNA in 1 x Laufpuffer aufgenommen (z. B. 1 x Roti-Load DNA).
- Tragen Sie die Proben mit einer Pipette mit Gelladespitze auf. Vermeiden Sie dabei, Probe aus der Sedimentregion am Boden des Reaktionsgefäßes zu entnehmen. Die Pipettenspitze sollte während des Probenauftrags 1-2 mm über dem Boden der Auftragsvertiefung gehalten werden, um die Verdünnung der Probe zu minimieren und um die Probe als dichte Schicht aufzutragen. Füllen Sie die unbenutzten Taschen mit gleichen Volumina 1 x Probenpuffer, um einen gleichmäßigen

elektrischen Widerstand über das gesamte Gel zu erhalten. Schließen Sie den Sicherheitsdeckel fest, um sicherzustellen, dass die elektrischen Verbindungen guten Kontakt haben.

4. Verbinden Sie die Elektrophoresekammer mit dem Netzgerät und schließen Sie dieses an die Stromversorgung an. Stellen Sie an Ihrem Netzgerät die für das jeweilige Gel erforderlichen Werte ein (siehe auch Tabelle 1).

K. Das Ende des Gellaufes

1. Stellen Sie die Schalter des Netzgerätes auf Null, schalten Sie die Stromversorgung ab und **entfernen Sie die Kabel.**
2. Stellen Sie die Wasserzufuhr ab, wenn das Gerät gekühlt wurde.
3. Entfernen Sie den Sicherheitsdeckel, indem Sie von oben gegen den Tank drücken und den Deckel herunternehmen.
4. Entnehmen Sie das Laufmodul aus dem Tank und gießen Sie den Puffer aus der oberen Pufferkammer aus. Nun können Sie vorsichtig die Arretierungsschrauben lösen und das Gel / die Gele entnehmen.
5. Nachdem Sie das Gel aus der Halterung entfernt haben, trennen Sie die Platten mit einer festen breiten Klinge. Beginnen Sie dabei das Trennen der Platten nicht an den Ausbuchtungen. Verteilen Sie die Kraftwirkung über eine große Fläche.
6. Überführen Sie das Gel vorsichtig in eine Färbekammer und färben Sie es mit Giemsa (z.B. Roti[®]-Blue A152) oder durch Silberfärbung. Oder übertragen Sie es zum Blotten auf eine Membran. DNA-Gele können mit Ethidiumbromid gefärbt werden.
7. Nachdem das Gel entfernt wurde, reinigen Sie die Platten sorgfältig und spülen sie mit destilliertem Wasser.
8. Leeren Sie die Pufferkammer mit einer Vakuumpumpe und einer angeschlossenen Fangflasche oder gießen Sie vorsichtig den Puffer ab.
9. Spülen Sie die Kammer mit destilliertem Wasser, trocknen Sie danach die elektrischen Verbindungen mit einem Tuch entsprechend den Angaben unter Punkt B. Stellen Sie vor erneutem Gebrauch oder Lagerung sicher, dass die Verbindungen sauber und trocken sind.

L. Zusätzliche Reagenzien und Hilfsmittel

Aceton, >99,5 %, zur Synthese	5025
Ammoniumpersulfat (APS)	9592
Desinfektionsmittel, neutral	K354
Ethanol 70 %, DAB	7301
Ethidiumbromid	7870
Ethidiumbromidlösung 1%	2218
Filterpapier	4926
Giemsa-Proteinfärbelösung Roti [®] -Blue 5x	A152
Isopropanol	6752
Klemmen	z.B. 0566
Natriumazid	K305
Nivelliertisch	N854
Roti [®] -Blue 5x Kolloidale Coomassie-Färbung	A152
Roti [®] -GelStain (Ersatz für Ethidiumbromid)	3865
Rotilabo [®] -Halteklammern	0827
Roti [®] -Load 1, 4x (reduzierend)	K929
Roti [®] -Load 2, 4x (nicht-reduzierend)	K930
Roti [®] -Load 3 (LDS), 4x (nicht-reduzierend)	3359
Roti [®] -Load DNA 1x (mit Glycerin)	0100
Roti [®] -Load DNA 6x (mit Saccharose / Glycerin / Ficoll)	T847 / X904 / X905
Roti [®] -Load DNASTAIN 1+2 6x (mit Glycerin / Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen [®])	5783, 5784
Roti [®] -Mark 10-150	T850
Roti [®] -Mark PRESTAINED	T852
Roti [®] -Mark STANDARD	T851

Rotiphorese® Blau R Coomassie-Färbung	3074
Rotiphorese® Gel 30 oder 40	3029 oder 3030
Rotiphorese® 10 x SDS PAGE <i>ready-to-use</i> Laufpuffer	3060
Silberfärbung Roti®-Black N (DNA)	N769
Silberfärbung Roti®-Black P (Proteine)	L533
Silberfärbung/Entfärber Roti®-Bleach	N766
TEMED	2367
Zinkfärbung für Proteingele, Roti®-White	K063

M. Trouble shooting und Tipps

Gel läuft während des Gießens aus

- Achten Sie darauf, dass die Glasplatten und Spacer sauber sind und keine Schmutzpartikel anhaften.
- Achten Sie darauf, dass die Gelplatten nach dem Einspannen gerade mit der Unterkante des Laufmoduls abschließen.
- Achten Sie darauf, dass alle Schrauben gleichmäßig und fest angezogen sind.
- Schmieren Sie ein wenig Vaseline auf die Spacer, bevor Sie die Gelplatten zusammenbauen.
- Dichten Sie nach dem Einspannen der Gelplatten in Laufmodul und Gelgießstand die Unterkante des Gels mit Agarose ab. Hierzu wird 1 %ige Agarose in 375 mM Tris, pH 8,8 (Proteingele) oder 1 x TBE (DNA-Gele) durch Schmelzen angesetzt bis keine Schlieren mehr sichtbar sind. Halten Sie den Gelgießstand incl. Platten etwas schräg und lassen Sie etwas Agarose recht heiß an einer Seite des Gels innen hineinlaufen. Stellen Sie die Gelgießeinrichtung gerade so, dass die Agarose sich unten verteilt und eine Abdichtung bildet. Sie können Agarose einfüllen bis zu einer Höhe von etwa 5 mm und nach wenigen Minuten das Polyacrylamidgel gießen. Die Agarose muss vor dem Lauf nicht entfernt werden, sondern bleibt während des Laufes zwischen den Platten.
- Vor dem Einspannen der Gelplatten kann das untere Ende mit Packband abgeklebt werden. Heften Sie hierzu die Platten nach dem Zusammenbau mit kräftigen Klammern zusammen und kleben Sie einen Streifen breites Packband längs an den unteren Rand der Glasplatten, so dass er den Spalt abschließt und an beiden Seiten einige Zentimeter übersteht. Nach Umschlagen und Festkleben an den Glasplatten wird das Packband fest angedrückt. Die Glasplatten können nun zum Gießen des Gels in das Laufmodul und den Gelgießstand eingespannt werden. Nach dem Auspolymerisieren des Gels muss das Packband allerdings entfernt werden, bevor das Gel erneut eingespannt und für den Lauf vorbereitet wird.

Luftblasen im Gel beim Gießen

- Sofort entfernen mit einem dünnen Spacer oder das Gel etwas schräg halten und die Luftblasen an den Rand klopfen.

Das Gel polymerisiert nicht vollständig aus

- Kann verursacht werden durch niedere Temperaturen, zu geringe Mengen an TEMED, zu altes (degradiertes) TEMED, zu altes APS oder zu niedrige Acrylamidkonzentrationen. Verwenden Sie frische Lösungen, v.a. frisch angesetztes APS. Bewahren Sie alle anderen Lösungen im Kühlschrank auf. Entgasen Sie die Gellösung vor dem Ansetzen.

Gel läuft nicht / keine Luftblasen an den Elektroden

- Kontrollieren Sie alle Anschlüsse, Stecker und Schalter. Achten Sie darauf, dass der Spiegel des oberen Puffers über die Ausbuchtung der Ohrenplatte reicht.

Glasplatten haben nach dem Lauf Sprünge oder brechen während des Laufes

- Das Gel war zu großer Spannung ausgesetzt. Ziehen Sie die Schrauben etwas weniger fest an. Achten Sie beim Festziehen darauf, dass der Druck auf alle Schrauben in kleinen Schritten gleichmäßig erhöht wird! Erniedrigen Sie die Voltzahl während des Laufes. Hierdurch wird das Gel weniger heiß.

Nach oben gezogene Ränder des Gels, „Smiling“

- Die Temperatur im Gel war nicht gleichmäßig verteilt. Reduzieren Sie die Voltzahl während des Laufs, verstärken Sie die Kühlung. Achten Sie darauf, leere Taschen mit Probenpuffer zu befüllen.

Vertikale Schlieren in den Banden

- Möglicherweise befanden sich Schmutzpartikel im Gelansatz. Verwenden Sie Roth-Acrylamid Stammlösungen, achten Sie darauf, dass die Gellösung in sauberen Glasbehältern angesetzt wird. Vor dem Zusatz von APS und TEMED kann die Lösung filtriert und entgast werden.
- Die Probe wurde vor dem Auftragen nicht zentrifugiert oder Sediment wurde mit aufgetragen.
- Es wurde zuviel Protein aufgetragen. Verdünnen Sie die Probe.
- Reduzieren Sie die Spannung (Volt) während des Laufes.

Banden sind horizontal verwischt

- Wird durch Diffusion der Probe vor dem Lauf verursacht. Tragen Sie rascher auf und lassen Sie das Gel nach dem Auftragen sofort laufen.

Banden sind diffus

- Zu große Proteinmenge für zu kleine Taschen bzw. zu dünnes Gel. Tragen Sie weniger Protein auf.
- Zu hohe Spannung reduziert zwar die Laufzeit, ergibt aber eine schlechtere Trennung der Proteine. Reduzieren Sie die Spannung während des Laufes.
- Bei DNA Gelen: Verwenden Sie den gleichen Ansatz 5 x TBE, um das Gel und den Laufpuffer herzustellen. Kleine Unterschiede in der Ionenkonzentration können die Trennung empfindlich stören.

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5
76185 Karlsruhe
Postfach 100121
76231 Karlsruhe

Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Telefax: +49 (0) 721/ 5606-149
E-mail: info@carlroth.de
Internet: www.carlroth.com

s.t. 03/2017