ROTH

Gebrauchsanweisung

SYNERGEL™

0184

- Beste Trenneigenschaften und hohe Auflösung
- Klarere Gele ohne Hintergrundfluoreszenz
- Trennt größere DNA-Mengen sauber auf
- Kompatibel mit allen konventionellen Färbeverfahren
- Gelelution und Blotting möglich
- DNase-, RNase-frei
- Leichte Handhabung

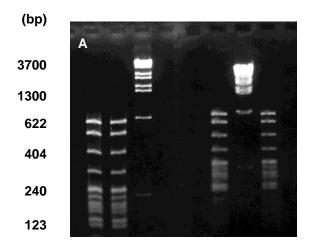


Abbildung A): links 0,7 % Agarose und 1,5 % SynergelTM, rechts 4 % hochaufllösende Agarose (NuSieve[®])

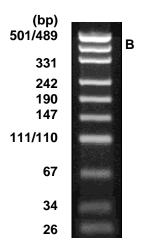


Abbildung B):
DNA-Marker pUC19/Msp I (Best. Nr. T149, lyophilisiert, oder X901 als *ready-to-use* Lösung) in 1 % Agarose und 2 % SynergelTM

I. Die Synergel™ Technologie

Synergel™ ist ein synergistisches Gelier- und Trennmittel bestehend aus einem modifizierten Polysaccharid, welches nach der Verbindung mit Agarose ein wasserstoffvermitteltes, binäres Gelsystem bildet. Synergel™ ist chemisch modifiziert, so dass eine größere Polymerkonzentration in die Gelstruktur eingebaut werden kann, um die Trenneffizienz des Gels zu steigern.

Das Gel wird genauso angesetzt wie ein einfaches Agarosegel. Man wiegt die benötigten Synergel™ - und Agarose-Pulvermengen ab, gibt Puffer zu, löst die Pulvermischung durch Kochen und gießt das Gel. Das Synergel™/Agarose-Gel erstarrt bei ähnlichen Temperaturen, aber etwas schneller als ein reines Agarosegel.

Setzt man Synergel™ der Agarose zu, verbessert sich die Gelleistung in Bezug auf die Auftrennung der Fragmente und der trennbaren DNA-Menge deutlich. Eine Gelmischung bestehend aus 0,7 % Agarose und 1 % Synergel™ ergibt ein wenigstens vergleichbares Ergebnis wie ein 2 %iges reines Agarosegel. Die Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten in 0,7 % Agarose / 2 % Synergel™ ist vergleichbar mit oder besser als die Trennung, die in einem hochauflösenden 4 %igen Agarosegel beobachtet wird. Eine feine räumliche Trennung der Fragmente und kompakte Banden werden dabei nicht nur erzielt für DNA-Fragmente mit einer Größe von 50 bis zu 2.000 bp. Es wurde auch festgestellt, dass Gele mit einer entsprechend

niedrigeren Konzentration an Synergel™ (0,5 %) plus Agarose sehr effizient größere DNA-Fragmente (1-30 kb) trennen.

Für die Gelbildung kann Phosphat-, Acetat- oder Borat-gepuffertes Tris-EDTA verwendet werden. Borat-gepufferte Gellösungen sind dabei etwas viskoser und sollten daher bei höheren Temperaturen gegossen werden. Die Benutzung eines 2,2 M Formaldehyd-haltigen Puffers ermöglicht auch die RNA-Auftrennung mit diesem System.

Synergel™/Agarose-Gele können größere Mengen an DNA auftrennen und reduziert hierdurch Bandenverschleifen und Schmieren. Verglichen mit einfacher Agarose ist das Synergel™/Agarosegel stärker und transparenter und sorgt für eine größere optische Klarheit, die eine bessere Photodokumentation der gefärbten Gels ermöglicht. Die DNA-/RNA-Banden können durch Elektroelution oder mit Glassuspensionen extrahiert und wiedergewonnen werden. Die DNA- bzw. RNA-Fragmente können auch mittels gängigen Southern- und Northern-Blotting Protokollen auf Membranen transferiert werden. Für nähere Einzelheiten siehe VI. FAQs.

II. Zusätzlich benötigte Reagenzien:

Agarose ROTI®Garose NEEO (Best. Nr. 2267.2,

ROTI®Garose Broad Range (Best. Nr. T846.2)

Ethanol (p.a., Best. Nr. 9065.1)

Puffer:

1 x TAE (Best. Nr. T845.1) oder

1 x TAE light (für die Gelelution) (Best. Nr. 0122.1) oder

0,5 x TBE (Best. Nr. 3061.1) oder

0,5 x TPE Puffer (40 mM Tris-base, 4 mM EDTA, pH mit Phosphorsäure auf 8,0)

III. Berechnung des benötigten Synergels™

Die Synergel™-Konzentration wird berechnet, indem man von der üblichen Agarosekonzentration 0,7 % subtrahiert und den Rest durch 2 teilt. Im Folgenden finden Sie detaillierte Anweisungen zur Berechnung der benötigten Menge Synergel™ für ein Synergel™/Agarose-Gel entsprechend einer gegebenen Agarosekonzentration:

- 1. Welcher Prozentsatz Agarose wird momentan benutzt?
- 2. Das Gel wird auf jeden Fall 0,7 % Agarose enthalten (benötigte Agarosekonzentration, um die Gelstabilität sicherzustellen). Ziehen Sie daher 0,7 % von der Gesamtkonzentration Agarose ab.
- 3. Teilen Sie den Rest durch 2. Dieser Wert ergibt den Prozentsatz an Synergel™, welcher der 0,7 %igen Agarose zugegeben wird.

Laut dieses Protokolls liegt die Synergel™-Konzentration generell zwischen 0,2 und 2 % (g/v). Höhere Konzentrationen (bis zu 4 %) können jedoch eingesetzt werden, um sehr kleine Moleküle (100 bp oder geringer) zu fraktionieren.

III. 1. Beispiel: Umrechnung einer 1 %igen Agarose in ein Synergel™/Agarose-Gel

- a. Subtrahieren Sie 0,7 % von 1 %iger Agarose: 1 % 0,7 % = 0,3 %
- b. Teilen Sie den Rest durch 2: 0,3 % : 2 = 0,15 %
- c. 0,15 % beträgt die Menge an Synergel™, die der 0,7 %igen Agarose zugefügt wird, um ein Gel zu erzeugen, das funktionell einem 1 %igen Agarose-Gel entspricht.

III. 2. Beispiel: Umrechnung einer 3 %igen Agarose in ein Synergel™/Agarose-Gel

- a. Subtrahieren Sie 0,7 % von 3 %iger Agarose: 3 % 0,7 % = 2,3 %
- b. Teilen Sie den Rest durch 2: 2,3 % : 2 = 1,15 %
- c. 1,15 % ergibt die Menge an Synergel™, die der 0,7 %igen Agarose zugegeben wird, um ein Gel zu erzeugen, das funktionell einem 3 %igen Agarose-Gel entspricht.

Für eine Trennung von Fragmenten unter 100 bp empfehlen wir 0,7 % Agarose und 2-4 % Synergel™ je nach genauer Fragmentgröße und eingesetztem Puffersystem.

<u>Bitte beachten Sie:</u> Wenn eine Agarose mit niedriger Gelstärke eingesetzt wird (z.B. ROTI®Garose High Resolution, Gelstärke ca. 600 g/cm² bei 1,5%igem Gel), sollte die Agarosemenge auf mindestens 1,4 %

Agarose angehoben werden, um ein stabiles Netzwerk zu erzeugen. Bei Verwendung von weniger Agarose entsteht kein festes Gel.

IV. Verwendung:

- 1. Wiegen Sie die benötigte Agarose-Menge ab und geben Sie sie in ein trockenes Becherglas bzw. einen Erlenmeyerkolben. Die Agarose-Konzentration liegt generell bei 0,7 % (g/v), also 0,7 g / 100 ml.
- 2. Errechnen und wiegen Sie die passende Menge Synergel™ ab (siehe III). Geben Sie das Synergel™-Pulver zu der Agarose in das Becherglas bzw. den Erlenmeyerkolben und vermischen Sie die beiden Pulver gründlich.
- 3. Tränken Sie die vermischten Pulver gründlich mit Ethanol. (Verwenden Sie ausreichend Ethanol, so dass sich die Masse im Behälterboden noch frei bewegen kann aber nicht schwimmt). Gießen Sie überschüssiges Ethanol sorgfältig ab.
- 4. Um Klumpen zu vermeiden, fügen Sie langsam die benötigte Menge Laufpuffer mit leichten kreisförmigen Schüttelbewegungen hinzu.
- 5. Lösen Sie die Suspension in der Mikrowelle bzw durch Erhitzung. Benutzen Sie dabei **auf keinen Fall** Alufolie zum Abdecken der Flasche. Gelegentliches Schütteln während des Wärmeprozesses sorgt dafür, dass sich die Reagenzien gut und schnell lösen und verhindert das Überkochen. Um sicherzustellen, dass alle Partikel aufgelöst sind, schwenken Sie die Suspension gegen das Licht. Sind keine Partikel mehr sichtbar, kann die Lösung abgekühlt und gegossen werden. Sind noch Partikel oder Schlieren vorhanden, kochen Sie die Lösung wieder in der Mikrowelle und lassen Sie sie für ca. 30 Sekunden stehen. Falls erforderlich, kann dieser Vorgang 2 3 Mal wiederholt werden, bis die Suspension klar ist. Bei Bedarf kann das benötigte Volumen durch die Zugabe vom destillierten Wasser wiederhergestellt werden.
- 6. Gießen Sie das Gel und setzen Sie die Kämme ein. Wir empfehlen eine gründliche Reinigung der Kämme vor Gebrauch, um das Herausziehen zu erleichtern und ein Reißen der Gelwände zu verhindern. Die Temperatur für das Gelieren der Synergel™/Agarose-Mischung ähnelt der Geliertemperatur der Agarose-Komponente. Nach dem Erstarren wird der Kamm entfernt und Puffer für die Elektrophorese hinzugefügt.

Für weitere Analysen, z.B. Gelelution bzw. Blotting, empfehlen wir Ihnen zuerst Absatz VI. FAQs zu lesen.

V. Referenz:

Synergel™ verkörpert die zweite Generation modifizierter Polysaccharidprodukte entsprechend der Gelzusammensetzung beschrieben in *Analytical Biochemistry* 163:247-254 (1987).

VI. FAQs zu SynergeI™

- F. Kann Synergel™ für die Proteinelektrophorese eingesetzt werden?
- **A.** Es wird nicht empfohlen.
- **F.** Beeinträchtigt die Anwesenheit von Synergel™ die Interkalationseigenschaften von Ethidiumbromid in DNA?
- A. Nein.

VI .1. Zubereitung des Gels

F. Was ist die Mindestmenge der erforderlichen Agarose, um die Gelwirksamkeit mit Synergel™ sicherzustellen?

A. 0,7 % Agarose wird empfohlen.

F. Wie hoch ist die Geliertemperatur von Synergel™/Agarose-Gelen?

A. Die Temperatur wird durch die Agarose-Komponente des binären Gels bestimmt und ähnelt im Wesentlichen der Temperatur der für das Gel ausgewählten Agarose.

F. Ist die Mischung trotzdem gießfähig, auch wenn sie vor dem Gießen auf 65 °C gekühlt wurde?

A. Wird die Mischung vor dem Gießen gekühlt ergibt dies kein Problem, wenn die verwendete Agarose selbst bei einer niedrigeren Temperatur geliert.

F. Ergibt das Synergel™ auch bei der Verwendung von Low-Melt-Agarose verbesserte Ergebnisse, z.B. bei der DNA-Bandentrennung,?

A. Ja.

F. Ist eine hohe Temperatur erforderlich, um eine Zusammensetzung von Synergel™ und Low-Melt-Agarose zu schmelzen? Wie hoch?

A. Damit es sich auflöst, muss Synergel[™] gekocht werden. Die Gelier-und Schmelztemperaturen des Gels werden jedoch von der Agarose-Komponente bestimmt.

F. Verursacht das Erhitzen eines DNA-Fragments in Low-Melt-Agarose plus Synergel™ zwischen dem Polysaccharid und der DNA eine Reaktion?

A. Nein, Synergel™ und Agarose sind vergleichbar inert.

F. Welcher Prozentsatz Synergel™ ergibt die besten Ergebnisse verglichen mit Agarose?

A. Für die Trennung sehr kleiner DNA-Fragmente wird 2 – 3 % Synergel™ und 0,7 – 1,0 % Agarose empfohlen. Eine Trennung der Fragmente von 25 bp und weniger wurde bestätigt (4 % Synergel™).

F. Kann Synergel™ mit Borat -Puffer eingesetzt werden?

A. Eine borathaltige Agarose-Synergel™-Zusammensetzung als Gellösung besitzt eine höhere Viskosität und sollte etwas heißer gegossen werden. Darüberhinaus gibt es keine Probleme. Benutzen Sie einen 0,5 fach konzentrierten TBE-Puffer gemäß dem Sambrook-Protokoll. Nehmen Sie 0,75 % Synergel™ für ausgezeichnete Ergebnisse im 200 bp Bereich (10 Volt pro cm). Die erhöhte Viskosität besteht aufgrund eines Pseudovernetzungsphänomens, das v.a. beobachtet wird, wenn relative hohe Konzentrationen an Synergel™ benutzt werden.

F. Wie kann ich das Reißen von Geltaschen verhindern, nachdem das Synergel™/Agarose-Gel polymerisierte?

A. Der Kamm verblieb möglicherweise zu lange im erstarrten Gel. Benutzen Sie den Laufpuffer, um das Gel nach dem Gelieren feucht zu halten und ein Entfernen der Kämme zu erleichtern. Vergessen Sie nie, den Kamm nach und vor Gebrauch gründlich zu reinigen.

VI. 2. Gelelution

F. Ist ein Synergel™/Agarose-Gel kräftig genug, damit die Banden ausgeschnitten und eluiert werden können?

A. Ja.

F. Können Proben mit einer phenolhaltigen Lösung extrahiert werden?

A. Ja, auf gleiche Weise wie aus Agarose.

F. Ist eine Elektroelution aus Synergel™/Agarose-Gel möglich?

A. Ja.

F. Löst sich ein Stück Synergel™/Agarose-Gel in Natriumiodid auf, wobei DNA freigesetzt wird, die dann über Glasmilch eluiert werden kann?

A. Ja.

F. Kann man mit Produkten wie "Agarase" bzw. "Gelase" Nukleinsäuren zurückgewinnen?

A. Nein. Es sind Enzyme, die Agarose aber nicht Synergel™ verdauen. Die DNA müsste weiterhin vom Synergel™ befreit werden. Es wird daher empfohlen, entweder über Glasmilch, Elektroelution, Blotting oder phenolische Elution zu eluieren.

VI. 3. Blotting

F. Wie kann ich die Transferergebnisse von genomischer DNA verbessern?

A. Wenn Sie Elektroblotting verwenden, werden Sie eine nahezu vollständige Rückgewinnung erzielen.

F. Synergel™ ist gut geeignet für die Elektrophorese, aber nicht für ein Blotting mancher Nukleinsäuren, z.B. große mRNAs. Warum?

A. Um den Membrantransfer von RNA mit einem hohen Molekulargewicht zu verbessern, empfehlen wir eine leichte alkalische Hydrolyse. Tränken Sie das Gel hierfür in 50 mM NaOH / 10 mM NaCl für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Neutralisieren Sie dann das Gel in 1 M Tris-HCl (pH 7,5) für 30 Minuten. Tränken Sie das Gel in 10-20 x SSC Puffer und transferieren Sie das Gel mittels Kapillarblotting gemäß dem Sambrook-Protokoll.

F. Warum lässt sich genomische DNA aus einem Synergel™/Agarose-Gel durch Kapillarblotting nicht so gut transferieren wie aus reiner Agarose?

A. Obwohl die Synergel™/Agarose-Mischung eine binäre Struktur bildet, können Synergel™-Spuren mit der DNA bezüglich der Bindung am Filter während des Kapillarblottings konkurrieren und die DNA-Transferfähigkeit reduzieren. Elektroblotting wird empfohlen.

VI. 4. Weitere nachfolgende Analysen

F. Beeinträchtigt Synergel™ eine Random-Primer-Reaktion?

A. Es gibt keine Anzeichen hierfür, das Experiment wurde jedoch noch nicht ausgeführt. Mit DNA-Ligierung, Kinase-Phosphorylierung und Restriktionsverdau existieren keine Probleme.

VII. Agarosen von ROTH

ROTI®Garose	Best. Nr.	Anwendung	
Agarose STANDARD	3810	Routinegele, Praktika, einfache Analysen (1-20 kb).	
NEEO Ultra-Qualität	2267	Alle Standard-Anwendungen, qualitative und quantitative Gele, Screening und Blotting.	
Agarose-Tabletten (0,5 g/Tabl.)	HP67	Für hochreproduzierbare Gele oder einfache Anwendungen in Praktikum oder Schule. Alle Standard-Gele (0,5 – 2,5 %).	
GTQ	6352	Gentechnik-Qualität, zur DNA-Elution von Fragmenten ≥500 bp ohne Schmelzen der Agarose.	
Broad Range	T846	Für den gesamten analytischen Hauptbereich (200 bp bis 40 kb), Blotting, Shift Assays. Optimal, wenn im Labor nur wenige Agarosetypen verwendet werden sollen.	
Pulsed Field	3771	Trennung großer Fragmente (über 20 kb), Pulsed-Field-Gel-Elektrophorese (PFGE).	
HR PLUS	HP30	Analyse von Fragmenten zwischen 100 und 3000 bp.	
High Resolution	K297	Analyse von Fragmenten zwischen 50 und 1000 bp.	
Low Melt	6351	Mit niedriger Schmelz- und Geliertemperatur (ST ≤65,5°C, GT ≤28°C). Für Gelelutionen aus geschmolzener Agarose.	
LM / PCR	HP31	Gentechnik-Qualität mit niedriger Schmelz- und Geliertemperatur (ST ≤65°C, GT ≤35°C). Zur DNA-Elution von Fragmenten <1500 bp aus geschmolzener Agarose.	
Super LM	HP45	Mit besonders niedriger Schmelz- und Geliertemperatur. (ST ≤62°C, GT ≤20°C). Für Gelelutionen aus geschmolzener Agarose. Empfohlen für in-Gel-Analysen, Kapillarelektrophorese und Zell- und Gewebskultur.	
MEEO Ultra-Qualität	2268	Mit mittlerer EEO. Für Immun-, Serum und Antikörper-Elektrophorese.	
HEEO Ultra-Qualität	2269	Mit hoher EEO. Für Proteinauftrennung und Gegenstrom-Elektrophorese.	

SYNERGEL™	0184.2	10 g
	0184.1	100 a



Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0 Fax: +49 (0) 721/ 5606-149

Fax: +49 (0) 721/5606-149 info@carlroth.de • www.carlroth.de

sse 06/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428. Geschäftsführer: André Houdelet