

ROTIPHORESE® Sequenzier-Gelsystem und Sequenzier-Konzentrate

A431, 3043, 3047, 3050

Seit Ende der 1970iger Jahre ist die DNA-Sequenzierung eine der wichtigsten Methoden der Life Science Wissenschaften und leitete 1995 die Ära der Genomforschung ein. Das bekannteste Sequenzier-Verfahren ist die auf der basenspezifischen chemischen Spaltung beruhende Methode von Allan Maxam und Walter Gilbert¹, die aber recht aufwendig ist und schnell durch die einfachere Kettenabbruch-Synthese nach Frederick Sanger und Alan Coulson² abgelöst wurde. Sanger erhielt für seine Arbeiten zur DNA-Sequenzierung zusammen mit Gilbert 1980 den Nobelpreis für Chemie. Bis vor einem Jahrzehnt meist durch Radioisotope markiert, wird heute die überwiegende Zahl der Sequenzen durch Fluoreszenzsignale ermittelt. Seit dem Jahre 2000 wird auch die neuere Pyrosequenzierung³ zunehmend angewandt (Erzeugung eines Lichtblitzes durch Luziferase-Reaktion bei Einbau eines komplementären Nukleotids), durch die z.B. auch stark komprimierende Sequenzen einwandfrei ermittelt werden können.

¹Maxam, A. & Gilbert, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:560-4.

²Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463-7.

³Nyrén P. (1987) *Anal Biochem.* 167:235-8.

1) Reagenzien

Gebrauchsfertiges Sequenzier-Gelsystem und -Konzentrate

ROTIPHORESE® DNA Sequenziersystem (1 l Sequenziergel Konzentrat, 1 l Sequenziergel Verdünner, 250 ml Sequenziergel Puffer) Best.-Nr. A431.1 (1 Kit)

ROTIPHORESE® Sequenzier-Gelkonzentrat: 25 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 und 50 % Harnstoff. Best.-Nr. 3043.1 (1 l)

ROTIPHORESE® Sequenziergel-Verdünner: 50 % Harnstoff. Best.-Nr. 3047.1 (1 l)

ROTIPHORESE® Sequenziergel Puffer-Konzentrat: 10x TBE in 50 % Harnstoff. Best.-Nr. 3050.1 (250 ml)

Fluoreszenzfreie Reagenzien für automatische Sequenzierungen

ROTIPHORESE® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (19:1): Gebrauchsfertige 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1. Best.-Nr. A516.1 (250 ml)

ROTIPHORESE® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (29:1): Gebrauchsfertige 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1. Best.-Nr. A121.1 (250 ml)

ROTIPHORESE® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1): Gebrauchsfertige 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1. Best.-Nr. A124.1 (250 ml)

ROTIPHORESE® NF Harnstoff, fluoreszenzfrei. Best.-Nr. A120.1 (1 kg)

ROTIPHORESE® NF 10xTBE Puffer. Best.-Nr. A118.1 (2,5 l)

Reagenzien für händische Sequenzierungen

ROTIPHORESE® Gel 40 (19:1): 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1. Best.-Nr. 3030.1 (1 l)

ROTIPHORESE® Gel 40 (29:1): 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1. Best.-Nr. A515.1 (1 l)

Harnstoff. Best.-Nr. X999.2 (1 kg)

10xTBE Puffer Stocklösung. Best.-Nr. 3061.1 (1 l)

Mischungsfertige Acrylamid- und Bisacrylamidlösungen

ROTIPHORESE® Gel A: 30 %ige Acrylamidlösung. Best.-Nr. 3037.1 (1 l)
 ROTIPHORESE® Gel B: 2 %ige Bisacrylamidlösung. Best.-Nr. 3039.1 (1 l)

Reagenzien für die Polymerisierung

TEMED. Best.-Nr. 2367.1 (100 ml)

APS. Best.-Nr. 9592.1 (100 g)

Weitere Informationen und andere Gebindegrößen finden Sie auf der jeweiligen Produktseite im Internet!

2) Anwendung:

(alle Angaben beziehen sich auf 100 ml Gelmixtur)

A) Unter Verwendung des ROTIPHORESE®-Sequenzier-Gelsystems

Sequenziergelkonzentrat: 25 % Acrylamid / Bisacrylamid in 50 % Harnstoff

Sequenziergel Verdünner: 50 % Harnstoff

Sequenziergel-Pufferkonzentrat: 10x TBA in 50 % Harnstoff

Für Gele mit 50 % (0,83 M) Harnstoff:

Sequenzier- Gelsystem	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
	Sequenziergel-Verdünner (ml)	74	66	58
	Sequenzier-Gelkonzentrat (ml)	16	24	32
	Sequenziergel-Pufferkonzentrat (ml)	10	10	10

Für Gele mit 45 % (7,5 M) Harnstoff:

Sequenzier- Gelsystem	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
	Sequenziergel-Verdünner (ml)	74	66	58
	Sequenzier-Gelkonzentrat (ml)	16	24	32
	10x TBE-Puffer Stocklösung (ml)	10	10	10

oder

Sequenzier- Gelsystem	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
	Sequenziergel-Verdünner (ml)	64	56	48
	Sequenzier-Gelkonzentrat (ml)	16	24	32
	Sequenziergel-Pufferkonzentrat (ml)	10	10	10
	Aqua dest. (ml)	10	10	10

Für Gele mit 40 % (6,7 M) Harnstoff:

Sequenzier- Gelsystem	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
	Sequenziergel-Verdünner (ml)	54	46	38
	Sequenzier-Gelkonzentrat (ml)	16	24	32
	Sequenziergel-Pufferkonzentrat (ml)	10	10	10
	Aqua dest. (ml)	20	20	20

Polymerisierung:

Es wird in dieser Reihenfolge zugegeben (pro 100 ml Lösung):

500 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung (frisch angesetzt)

50 µl TEMED

Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden.

Das Gel sofort gießen und vorsichtig den Kamm einstecken.

B) Unter Verwendung der ROTIPHORESE®-Gelfertiglösungen

ROTIPHORESE®-Gellösung 40: 40 %ige Mischung Acrylamid / Bisacrylamid 19:1 oder 29:1 **ohne Harnstoff**

Sequenziergel Verdünner: 50 % Harnstoff

Sequenziergel-Pufferkonzentrat: 10x TBA in 50 % Harnstoff

Für Gele mit 50 % (8.3 M) Harnstoff:

40 % Acrylamid Mix (ROTIPHORESE®)	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
Gellösung	Aqua dest. (ml)	0	x	x
19:1 oder 29:1)	ROTIPHORESE® Gellösung 40 (ml)	10	x	x
	Sequenziergel Verdünner (ml)	80	x	x
	Sequenziergel-Pufferkonzentrat (ml)	10	x	x

oder

40 % Acrylamid Mix (ROTIPHORESE®)	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
Gellösung	Aqua dest. (ad 100 ml) (ml)	ca. 50	ca. 45	ca. 40
19:1 oder 29:1)	ROTIPHORESE® Gellösung 40 (ml)	10	15	20
	Harnstoff (g)	50	50	50
	10x TBE-Puffer Stocklösung (ml)	10	10	10

Wenn Sekundärstrukturen in den DNA-Strängen aufgelöst werden sollen, kann Formamid zugesetzt werden:

25 ml auf 100 ml Gesamtgellösung. Die Wassermenge wird entsprechend reduziert.

Für Gele mit 45 % (7.5 M) Harnstoff:

40 % Acrylamid Mix (ROTIPHORESE®)	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
Gellösung	Aqua dest. (ml)	5	0	x
19:1 oder 29:1)	ROTIPHORESE® Gellösung 40 (ml)	10	15	x
	Sequenziergel Verdünner (ml)	75	75	x
	Sequenziergel-Pufferkonzentrat (ml)	10	10	x

oder

40 % Acrylamid Mix (ROTIPHORESE®)	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
Gellösung	Aqua dest. (ad 100 ml) (ml)	ca. 54	ca. 49	ca. 44
19:1 oder 29:1)	ROTIPHORESE® Gellösung 40 (ml)	10	15	20
	Harnstoff (g)	45	45	45
	10x TBE-Puffer Stocklösung (ml)	10	10	10

Wenn Sekundärstrukturen in den DNA-Strängen aufgelöst werden sollen, kann Formamid zugesetzt werden:

25 ml auf 100 ml Gesamtgellösung. Die Wassermenge wird entsprechend reduziert.

Für Gele mit 40 % (6,7 M) Harnstoff:

40 % Acrylamid Mix (ROTIPHORESE®)	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
Gellösung	Aqua dest. (ml)	10	5	0
19:1 oder 29:1)	ROTIPHORESE® Gellösung 40 (ml)	10	15	20
	Sequenziergel Verdünner (ml)	70	70	70
	Sequenziergel-Pufferkonzentrat (ml)	10	10	10

oder

40 % Acrylamid Mix (ROTIPHORESE® Gellösung 19:1 oder 29:1)	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
	Aqua dest. (ad 100 ml) (ml)	ca. 58	ca. 53	ca. 48
	ROTIPHORESE® Gellösung 40 (ml)	10	15	20
	Harnstoff (g)	40	40	40
	10x TBE-Puffer Stocklösung (ml)	10	10	10

Wenn Sekundärstrukturen in den DNA-Strängen aufgelöst werden sollen, kann Formamid zugesetzt werden:

25 ml auf 100 ml Gesamtgellösung. Die Wassermenge wird entsprechend reduziert.

Beim Einsatz einer 30 %igen Gellösung muss der Ansatz mit zugegebenem festem Harnstoff gewählt werden.

Die Menge der ROTIPHORESE® Gellösung erhöht sich um 1/3 (auf 13,3, 20 bzw. 26,5 %), die Wassermenge reduziert sich entsprechend.

Polymerisierung:

Es wird in dieser Reihenfolge zugegeben (pro 100 ml Lösung):

500 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung (frisch angesetzt)

50 µl TEMED

Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden.

Das Gel sofort gießen und vorsichtig den Kamm einstecken.

3) Variable Einstellung der Porengröße mit ROTIPHORESE® Gel A und B

Durch Variationen der Gesamtgelkonzentration (% T) und der Vernetzung (engl: crosslinking) (% C) kann die Porengröße von Acrylamidgelen variiert werden. Mit ROTIPHORESE® Gel A und B können nach folgender Berechnung Gele mit jedem gewünschten T/C-Verhältnis hergestellt werden:

V_t	=	Gesamtvolumen an gewünschter Gellösung (ml)
T	=	Gelkonzentration in % = % Acrylamid + % Bisacrylamid
C	=	Crosslinking in % = (% Bisacrylamid x 100) / T
V_a	=	Volumen Gel A in ml
V_b	=	Volumen Gel B in ml
Es gilt:		
V_a	=	$(T \times (100-C) \times V_t) / 3000$
V_b	=	$(T \times C \times V_t) / 200$

Beispiel: 100 ml eines Gels mit 10 % T und 2,7 % C berechnen sich wie folgt:

$$V_a = (10 \times (100-2,7) \times 100) / 3000 = 32,43 \text{ ml Gel A}$$

$$V_b = (10 \times 2,7 \times 100) / 200 = 13,5 \text{ ml Gel B}$$

32,43 ml Gel A und 13,5 ml Gel B werden mit dem normalerweise verwendeten Puffer auf 100 ml aufgefüllt, entgast, mit APS und TEMED versetzt, gemischt und zum Gießen des Gels verwendet.

4.) Gefahren- und Sicherheitshinweise

Bitte beachten Sie die Angaben auf dem Kennzeichnungsetikett und dem Sicherheitsdatenblatt.

Sequenziergele und -konzentrate:

  **Gefahr** H302-H315-H319-H317-H340-H350-H360FD-H372

ROTIPHORESE®DNA-Sequenziersystem	Glas	1 Kit (2x 1L, 1x 250ml)	A431
ROTIPHORESE®Sequenziergel-Konzentrat	Glas	1 L	3043.1
	Glas	100 ml	3043.2
ROTIPHORESE®Sequenziergel-Verdünner	Glas	1 L	3047.1
ROTIPHORESE®Sequenziergel Puffer-Konzentrat	Glas	250 ml	3050.1

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
 Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
 Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
 Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
 info@carloth.de • www.carloth.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