

Gebrauchsanweisung



ROTI®Mark 10-150

Protein-Molekulargewichtsmarker
für die SDS-PAGE

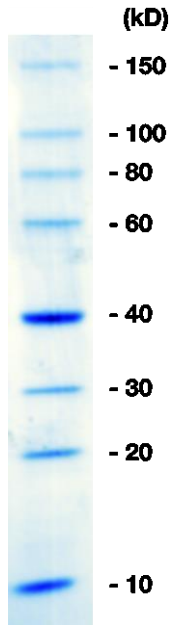


Abbildung: 4-20 % Gradientengel, Tris/SDS

I. Einleitung

ROTI®Mark 10-150 besteht aus einem Set gentechnisch exprimierter Proteine mit definierten, regelmäßigen Molekulargewichten, die sich durch besonders einheitliche Laufeigenschaften auszeichnen (siehe Tab.1). Dies erleichtert Ihnen die optische Abschätzung des apparenten Molekulargewichts Ihres Proteins. Zur einfacheren Orientierung im Gel zeigt die 40 kD-Bande eine stärkere Intensität.

Die Proteinkonzentrationen werden chargenspezifisch auf eine gleiche Intensität nach Coomassie-Färbung eingestellt und weisen eine Konzentration von 50-100 µg/ml pro Bande auf. Das Protein der verstärkten Bande bei 40 kD liegt in einer Konzentration von 150-200 µg/ml vor (chargenabhängig).

ROTI®Mark 10-150 besteht aus **His-getaggen rekombinanten Proteinen**, die durch anti-His Antikörper im Western-Blot-System erkannt werden können. Die Proteine sind vorreduziert, acyliert und in nicht-reduzierendem Lämmli-puffer mit 0,01 % Bromphenolblau gelöst.

Tab.1:

MW (kD)	logMW
150	5,1761
100	5,0000
80	4,9031
60	4,7782
40	4,6021
30	4,4771
20	4,3010
10	4,0000

Unter Punkt V finden Sie ein einfaches Verfahren zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts eines Proteins in der SDS-PAGE durch Vergleich mit den Laufweiten der Markerproteine.

II. Lagerung

- **Der Versand des Markers erfolgt ohne Kühlung oder Trockeneis. Der Marker wird dadurch nicht beeinträchtigt.**
- Lagern Sie ROTI®Mark 10-150 bitte bei -20 °C. Der Marker kann kurzfristig (wenige Tage) bei 4 °C aufbewahrt werden. Um häufiges Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, sollten Aliquots eingefroren werden.
- Erwärmen Sie ROTI®Mark 10-150 vor Gebrauch bitte langsam, um ausgefallenes SDS wieder in Lösung zu bringen. ROTI®Mark 10-150 ist vorreduziert und acyliert und muss daher nicht erhitzt werden.
- **Der Marker sollte nicht über 65°C erhitzt oder längere Zeit bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt gelagert werden!**

III. Gelauftrag

- Empfohlene Auftragsmengen für Minigele (10 %; 0,75 mm Dicke):
Coomassie-Färbung: ca. 5 µl
Silber-Färbung: ca. 1 µl
- **Bitte beachten Sie:** Die erforderliche Auftragsmenge variiert mit der Geldicke, C/T-Verhältnis, verwendeter Färbung und Zahnbreite des Kamms.
- Die Intensität von Coomassie-Färbungen kann je nach Protokoll sehr unterschiedlich ausfallen. Unter Punkt VI finden Sie zwei Methoden, die eine effiziente Färbung gewährleisten.

IV. Trouble Shooting

Marker-Banden sind nicht oder nur sehr schwach zu sehen

- Achten Sie auf eine korrekte Auftragsmenge. Die empfohlene Menge gilt für Minigele mit 0,75 mm Dicke. Wenn Sie dickere oder größere Gele verwenden, müssen Sie die Auftragsmenge erhöhen.
- Die Auftragsmenge von ROTI®Mark wurde optimiert, um besonders scharfe Banden und

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@carlroth.de • www.carlroth.de

ip 07/2021

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

optimales Laufverhalten zu erzielen. Versuchen Sie nicht, eine schlechte Färbung durch erhöhten Proteinauftrag auszugleichen. Dies führt zu einem veränderten Laufverhalten der Proteine (sowohl Ihrer Probe als auch des Markers) und unscharfen und dicken Banden.

- Einzelne Banden sind schwach: Die Proteine können unter bestimmten Umständen verklumpen. Resolubilisieren Sie die Marker-aliquote durch Erhitzen für 5 min bei 65 °C. Vorsichtig mischen.

Marker-Banden sind verschwommen

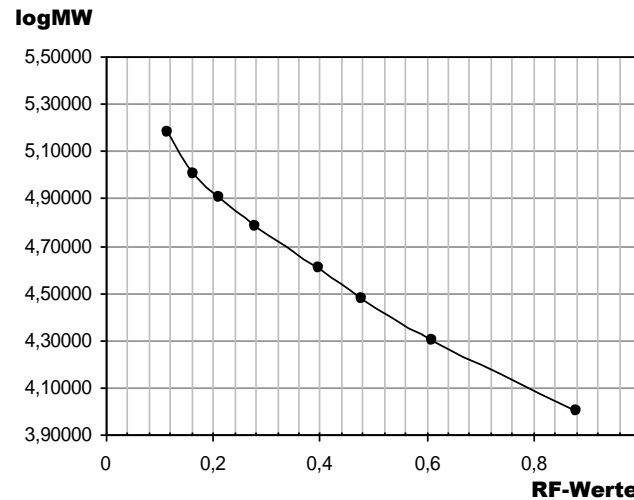
- Vermeiden Sie ein Überladen des Gels!
- Achten Sie darauf, dass der Marker nie längere Zeit bei Raumtemperatur gelagert wird.
- Vermeiden Sie häufiges Einfrieren/Auftauen des Markers.
- Die Langzeitlagerung sollte immer bei -20 °C erfolgen.
- Achten Sie beim Gießen des Gels darauf, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden
- Achten Sie beim Gießen des Gels auf gute Durchmischung der Acrylamidlösung.
- Verwenden Sie nur qualitativ hochwertige Acrylamidlösungen (z.B. ROTIPHORESE® Gel 30, Best. Nr. 3029, oder Gel 40, Best. Nr. 3030).
- Vermeiden Sie eine Überhitzung des Gels. Reduzieren Sie bei Bedarf die Spannung.
- Überprüfen Sie die Zusammensetzung und den pH-Wert der verwendeten Puffer, entgasen Sie die Puffer.

V. Apparentes MW eines Proteins

1. Bestimmen Sie die RF-Werte der Markerproteine nach der Elektrophorese.
Start: Sammelgel/Trenngel-Grenze
Lauffront: Bromphenolblau-Bande

RF-Wert =	$\frac{\text{Laufstrecke Ihres Proteins}}{\text{Gesamtlaufstrecke}}$
-----------	--

2. Tragen Sie in einem Graphen die logMW (aus Tab.1) gegen die RF-Werte der Markerproteine auf (Beispiel siehe Graph).



3. Bestimmen Sie den RF-Wert Ihres Proteins. Lesen Sie anhand Ihrer gezeichneten Kurve den zugehörigen logMW ab. Errechnen Sie über Tabelle 1 das Molekulargewicht in kD.

TIPP:

ROTI®Mark 10-150 besteht aus gentechnisch hergestellten Multimeren eines Proteins und zeigt einheitliche Laufeigenschaften. Im Gegensatz dazu treten bei Markergemischen unterschiedlicher Proteine (z.B. Myosin, β-Galactosidase, BSA, Carboanhydrase, etc.) uneinheitliche Laufeigenschaften auf. Die abgeleiteten Molekulargewichte unbekannter Proteine können daher abhängig vom verwendeten Marker unterschiedlich sein. Eine Angleichung der mit ROTI®Mark 10-150 ermittelten Werte an die traditionellen Marker kann über folgende Formel erreicht werden:

$$MW_{\text{trad}} = MW_{\text{ermittelt}} - 1,4715 \times \ln(MW_{\text{ermittelt}}) + 6,619$$

VI. Coomassie-Färbung

Mit ROTI®Blue (Best.-Nr. A152):

- Gel nach Gebrauchsanweisung 2 bis 12 h mit ROTI®Blue inkubieren
- Ein Entfärbeschritt ist nicht notwendig

Mit Brilliant Blau G250 (Best.-Nr. 9598):

- Gel 30-60 min in der Fixierungslösung unter leichtem Schütteln inkubieren
- Gel 20-40 min in der Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubieren
- Gel 30 sec in der Fixierungslösung unter leichtem Schütteln inkubieren
- Gel in der Entfärbelösung so lange unter leichtem Schütteln inkubieren, bis die Hintergrundfärbung entfernt ist und die Proteine gut sichtbar werden.
- Fixierungslösung:
40 % Ethanol, 10 % Essigsäure
- Färbelösung:
50 ml Lösung I und 50 ml Lösung II direkt vor der Verwendung mischen
Lösung I: 0,2 % Brilliant Blau G250, 90 % Ethanol
Lösung II: 20 % Essigsäure
- Entfärbelösung:
20 % Ethanol, 10 % Essigsäure

VII. Empfohlene Reagenzien

- Brilliant Blau G250, Best.-Nr. 9598
- Ethanol, p.a., Best.-Nr. 9065
- Essigsäure, p.a., Best.-Nr. 3738
- ROTI®Blue; Best.-Nr. A152

⚠ Achtung H319 P305+P351+P338-P337+P313

ROTI®Mark 10-150

T850.2	100 µl
T850.1	500 µl