



PAGE

Polyacrylamidgelelektrophorese

In der modernen Bioanalytik stellt die Gelelektrophorese immer noch eine Technik dar, die durch keine andere ersetzt werden kann. Vertikale Gele werden dabei i.d.R. aus Acrylamid hergestellt, das durch Bis-acrylamid und nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (Radikalenspender) und TEMED (Katalysator) durch eine radikalische Kettenreaktion ein feines, sehr gleichmäßiges Netzwerk bildet.

Erschwert wird die Anwendung allerdings durch die Eigenschaft des Acrylamid als starkes Nervengift, dessen Cancerogenität und Mutagenität im Tierversuch eindeutig nachgewiesen wurden. Die Resorption von Acrylamid erfolgt bevorzugt über die Haut, wobei v. a. die Aufnahme von Stäuben über Atemwege oder Gesichtsschleimhäute beim Abwiegen des Pulvers ein schwerwiegendes Problem darstellen.

Hier bieten die ROTIPHORESE®-Fertiggellösungen perfekte Abhilfe. Die in Acrylamidgehalt und pH streng kontrollierten Lösungen sind bedeutend weniger gefährlich in der Anwendung, dabei sehr einfach einzusetzen und ermöglichen eine reproduzierbare und hochauflösende Gelelektrophorese. Im Roth-Sortiment finden Sie zudem alle zusätzlich benötigten Reagenzien wie TEMED, APS, SDS oder auch Gelelektrophoresepuffer, die ein perfekt aufeinander abgestimmtes Team bilden (s.u.).

Empfohlene Anwendungen

Trennung von	empfohlene Gelfertiglösung	% C	Acrylamid / Bisacrylamid
Nukleinsäure	Gel 40 (3030)	5	19:1
	NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (A516)	5	19:1
	Sequenziergel Konzentrat 25 % (3043)	5	19:1
Nukleinsäure und Proteine	Gel 40 (A515)	3,3	29:1
	NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (A121)	3,3	29:1
	NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (A124)	3,3	29:1
Proteine	Gel 30 (3029)	2,6	37,5:1
	Gel 40 (T802)	2,6	37,5:1

Technische Info

Gelansätze

Die Technik der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wird sowohl für hochauflösende Nukleinsäuregele (z.B. Sequenziergele) sowie für nahezu alle Proteingele angewandt. Nukleinsäure wird i. d. R. mit einem TBE-Puffersystem aufgetrennt, während Proteine zur gleichmäßigen negativen Ladung mit SDS versetzt und in Tris/Glycin-Puffer aufgetrennt werden (SDS-PAGE). Detaillierte Erklärungen finden Sie z.B. in dem Standard-Werk von Sambrook und Russel, *Molecular Cloning 3rd Edition*, CSHL Press New York, 2004 oder in *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*, Eckert und Kartenbeck, Springer Verlag Heidelberg, 1997.

Die folgenden Tabellen geben Anhaltspunkte für typische Gelmischungen bei SDS-Gelelektrophoresen (A) und der Trennung von Nukleinsäuren (B).

A) SDS-PAGE

Trennbereiche von SDS-Gelen

Acrylamidkonzentration	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Trennbereich (kD)	50-200	30-95	20-80	12-60	10-43

Trenngele (alle Angaben beziehen sich auf 20 ml angesetzte Gellösung)

30 %	Gelkonzentration	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Acrylamid	Aqua dest. (ml)	10,6	9,3	7,9	6,6	4,6
Mix	30 % Acrylamid Mischung (ml)	4	5,3	6,7	8	10
	Tris (1,5 M, pH 8,8) (ml)	5	5	5	5	5
40 %	Gelkonzentration	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Acrylamid	Aqua dest. (ml)	11,6	10,6	9,6	8,6	7,1
Mix	40 % Acrylamid Mischung (ml)	3	4	5	6	7,5
	Tris (1,5 M, pH 8,8) (ml)	5	5	5	5	5

Es wird in dieser Reihenfolge zugegeben:

200 µl 10 %ige SDS Lösung (Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden)

200 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung (frisch angesetzt)

20 µl TEMED (Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden)

Gel sofort gießen und mit Isopropanol überschichten.

Sammelgele (alle Angaben beziehen sich auf 5 % Gele)

30 %	Gelmenge	1 ml	3 ml	5 ml	8 ml	10 ml
Acrylamid	Aqua dest. (ml)	0,68	2,1	3,4	5,5	6,8
Mix	30 % Acrylamid Mischung (ml)	0,17	0,5	0,83	1,3	1,7
	Tris (1,0 M, pH 6,8) (ml)	0,13	0,38	0,63	1	1,25
	SDS (10 %ige Lösung) (µl)	10	30	50	80	100
	APS (10 %ige Lösung*) (µl)	10	30	50	80	100
	TEMED (µl)	1	3	5	8	10

Technische Info

40 %	Gelmenge	1 ml	3 ml	5 ml	8 ml	10 ml
Acrylamid Mix	Aqua dest. (ml)	0,725	2,185	3,645	5,84	6,3
	40 % Acrylamid Mischung (ml)	0,125	0,375	0,625	1	1,25
	Tris (1,0 M, pH 6,8) (ml)	0,13	0,38	0,63	1	1,25
	SDS (10 %ige Lösung) (µl)	10	30	50	80	100
	APS (10 %ige Lösung*) (µl)	10	30	50	80	100
	TEMED (µl)	1	3	5	8	10

* frisch angesetzt!

Vor und nach Zugabe von SDS und TEMED den Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden.
Das Sammelgel sofort gießen und vorsichtig den Kamm einstecken.

B) Trennung von Nukleinsäuren

Denaturierende TBE-Gele zur Einzelstrangdarstellung (z.B. Sequenzgele)

(alle Angaben beziehen sich auf 100 ml Gellösung)

25 % Sequenziergel- konzentrat mit Harnstoff	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
	Sequenziergel Verdünner (ml)*	74	66	58
	25 % Sequenziergelkonzentrat (ml)	16	24	32
30 % Acrylamid Mix (29:1)	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
	Aqua dest. (ad 90 ml) (ml)*	ca. 52	ca. 45	ca. 39
	30 % Acrylamid Mischung (ml)	13,3	20	26,5
	Harnstoff (g)**	42	42	42
40 % Acrylamid Mix (19:1 oder 29:1)	Gelkonzentration	4 %	6 %	8 %
	Aqua dest. (ad 90 ml) (ml)*	ca. 55	ca. 50	ca. 45
	40 % Acrylamid Mischung (ml)	10	15	20
	Harnstoff (g)**	42	42	42

*Wenn Sekundärstrukturen in den DNA-Strängen aufgelöst werden sollen, kann Formamid zugesetzt werden:
25 ml auf 100 ml Gesamtgellösung. Die Wassermenge wird entsprechend reduziert.

**Ergibt Gele mit 42 % Harnstoff (7 M)

Es wird in dieser Reihenfolge zugegeben:

10 ml 10 x TBE-Puffer*** (Ansatz vorsichtig mischen und ev. entgasen)

400 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung (frisch angesetzt)

50 µl TEMED (Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden)

Das Gel sofort gießen und vorsichtig den Kamm einstecken.

***Verwendet man Sequenziergelkonzentrat und Sequenziergelverdünner erhält man so 45 % Harnstoff.

Möchte man 50 % Harnstoffgehalt im Gel erzielen, kann man das fertige Sequenziergel Pufferkonzentrat mit 50 % Harnstoff (Art. Nr. 3050.1) einsetzen.

Technische Info

TBE-Gele zur Elektrophorese von dsNukleinsäure

(alle Angaben beziehen sich auf 100 ml Gellösung)

30 % Acrylamid Mix (29:1)	Gelkonzentration	6 %	10 %	15 %
	Aqua dest. (ml)	69	56	39
	30 % Acrylamid Mischung (ml)	20	33	50
40 % Acrylamid Mix (19:1 oder 29:1)	Gelkonzentration	6 %	10 %	15 %
	Aqua dest. (ml)	74	64	51,5
	40 % Acrylamid Mischung (ml)	15	25	37,5

Es wird in dieser Reihenfolge zugegeben:

10 ml 10 x TBE-Puffer (Ansatz vorsichtig mischen und ev. entgasen)

1 ml 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung (frisch angesetzt)

60 µl TEMED (Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden)

Das Gel sofort gießen und vorsichtig den Kamm einstecken.

Variable Einstellung der Porengröße mit ROTIPHORESE® Gel A und B

Durch Variationen der Gesamtgelkonzentration (% T) und der Vernetzung („crosslinking“) (% C) kann die Porengröße von Acrylamidgelen verändert werden. Sie benötigen dazu die Acrylamid-Stamm-lösungen ROTIPHORESE® Gel A bzw. Gel A-40 und die Bisacrylamid-Stammlösung ROTIPHORESE® Gel B.

Mit ihnen lässt sich das T/C-Verhältnis je nach Bedarf einstellen:

V_t	=	Gesamtvolumen an gewünschter Gellösung (ml)
T	=	Gelkonzentration in % = % Acrylamid + % Bisacrylamid
C	=	Crosslinking in % = (% Bisacrylamid x 100) / T
V_a	=	Volumen Gel A/A-40 in ml
V_b	=	Volumen Gel B in ml
Es gilt für Gel A (30 %ige Lösung):		
V_a	=	$(T \times (100 - C) \times V_t) / 3000$
V_b	=	$(T \times C \times V_t) / 200$ für $T \leq 20$
Es gilt für Gel A-40 (40 %ige Lösung):		
V_a	=	$(T \times (100 - C) \times V_t) / 4000$
V_b	=	$(T \times C \times V_t) / 200$ für $T \leq 25$

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

$$V_a = (10 \times (100 - 2,7) \times 100) / 3000 = \mathbf{32,433 \text{ ml Gel A}}$$

$$V_b = (10 \times 2,7 \times 100) / 200 = \mathbf{13,500 \text{ ml Gel B}}$$

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.

Beispiel, Gel A-40: 100 ml eines Gels mit 10 % T und 2,7 % C berechnen sich wie folgt:

$$V_a = (10 \times (100 - 2,7) \times 100) / 4000 = \mathbf{24,325 \text{ ml Gel A-40}}$$

$$V_b = (10 \times 2,7 \times 100) / 200 = \mathbf{13,500 \text{ ml Gel B}}$$

24,325 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.



Guter Rat ist Roth.

Technische Info

ROTIPHORESE® Gellösungen

Gebrauchsfertige Acrylamid/Bisacrylamid Mischungen

ROTIPHORESE® Gel 30 (37,5:1): 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1.
Best.-Nr. 3029.2 (250 ml), 3029.3 (500 ml), 3029.1 (1 L)

ROTIPHORESE® Gel 40 (19:1): 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1.
Best.-Nr. 3030.2 (250 ml), 3030.1 (1 L)

ROTIPHORESE® Gel 40 (29:1): 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1.
Best.-Nr. A515.2 (250 ml), A515.1 (1 L)

ROTIPHORESE® Gel 40 (37,5:1): 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1.
Best.-Nr. T802.2 (250 ml), T802.1 (1 L)

Mischungsfertige Acrylamid- und Bisacrylamid-Stammlösungen

ROTIPHORESE® Gel A: 30 % Acrylamidlösung. Best.-Nr. 3037.2 (250 ml), 3037.1 (1 L)

ROTIPHORESE® Gel A-40: 40 % Acrylamidlösung. Best.-Nr. 7748.1 (250 ml), 7748.2 (1 L)

ROTIPHORESE® Gel B: 2 % Bisacrylamidlösung. Best.-Nr. 3039.2 (250 ml), 3039.1 (1 L)

Acrylamid/Bisacrylamid Mischungen für die automatische Sequenzierung (fluoreszenzfrei)

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), A124.2 (1 L)

Gebrauchsfertige Sequenziergel-Lösungen

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

ROTIPHORESE® Sequenziergel Konzentrat: 25 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 und 50 % Harnstoff. Best.-Nr. 3043.2 (100 ml), 3043.1 (1 L)

ROTIPHORESE® Sequenziergel-Verdünner: 50 % Harnstoff in Wasser zum Verdünnen des Sequenziergel-Konzentrates. Best.-Nr. 3047.1 (1 L)

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



Technische Info

Zusätzlich erhältliche Reagenzien und Lösungen

Bezeichnung	Best.-Nr.
TEMED	2367
APS	9592
Acrylamid p.a., 4 x krist.	7906
Acrylamid, BioScience, für die Molekularbiologie	0189
Acrylamid, 2x krist.	7871
Bisacrylamid	7867
Tris p.a.	4855
Glycin p.a.	3908
SDS ultra pure	2326
SDS Pellets, ROTIPHORESE®-Grade, für die Elektrophorese	8029
ROTI®Stock 20 % SDS Fertiglösung	1057
Harnstoff	X999
ROTIPHORESE® NF Harnstoff, fluoreszenzfrei	A120
ROTIPHORESE® NF 10xTBE Puffer, fluoreszenzfrei	A118
ROTIPHORESE® 10xTBE Puffer	3061
ROTIPHORESE® 10xSDS PAGE Laufpuffer	3060
ROTI®Load 1, reduzierend, Protein-Gelladepuffer	K929
ROTI®Load 2, nicht reduzierend, Protein-Gelladepuffer	K930
ROTI®Load 3, nicht reduzierend, Protein-Gelladepuffer mit LDS	3359
ROTI®Load DNA (mit Glycerin), 6x konz.	X904
ROTI®Load DNA (mit Ficoll), 6x konz.	X905
ROTI®Load DNASTain 1, gleichzeitige Gelfärbung, für große Fragmente	5783
ROTI®Load DNASTain 2, gleichzeitige Gelfärbung, für mittlere Fragmente	5784
ROTI®Load DNASTain 3, gleichzeitige Gelfärbung, für kleine Fragmente	6472

Zusätzliche Daten, Sicherheitshinweise und Gebindegrößen finden Sie auf der jeweiligen Produktseite im Internet.

gh 02/2020

