



## **Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

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 (Radikalenspende) 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.).

### Gebrauchsfertige Acrylamid/Bisacrylamid Mischungen

Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1): 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1.

Best.-Nr. 3029.1 (1 l)

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)

Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1): 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1.

Best.-Nr. T802.1 (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)

### 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)

### Gebrauchsfertige Sequenziergel-Lösungen

Rotiphorese® Sequenziergel Konzentrat: 25 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 und 50 % Harnstoff. Best.-Nr. 3043.1 (1 l)

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

### **Empfohlene Anwendungen**

<b>Trennung von</b>	<b>empfohlene Gelfertiglösung</b>	<b>% C</b>	<b>Acrylamid / Bisacrylamid</b>
<i>Nukleinsäure</i>	Gel 40 (3030.1)	5	19:1
	NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (A516.1)	5	19:1
	Sequenziergel Konzentrat 25 % (3043.1)	5	19:1
<i>Nukleinsäure und Proteine</i>	Gel 40 (A515.1)	3,3	29:1
	NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (A121.1)	3,3	29:1
	NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (A124.1)	3,3	29:1
<i>Proteine</i>	Gel 30 (3029.1)	2,6	37,5:1
	Gel 40 (T802.1)	2,6	37,5:1

### **Ansätze**

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 3<sup>rd</sup> Edition*, CSHL Press New York, 2004 (Best.-Nr. Y398.1) oder in *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*, Eckert und Kartenbeck, Springer Verlag Heidelberg, 1997 (Best.-Nr. L937.1).

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 (%)	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>15</b>
Trennbereich (kD)	50-200	30-95	20-80	12-60	10-43

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

30 %	<b>Gelkonzentration</b>	<b>6 %</b>	<b>8 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>15 %</b>
Acrylamid	Aqua dest. (ml)	10,6	9,3	7,9	6,6	4,6
	30 % Acrylamid Mischung (ml)	4	5,3	6,7	8	10
Mix	Tris (1,5 M, pH 8,8) (ml)	5	5	5	5	5
40 %	<b>Gelkonzentration</b>	<b>6 %</b>	<b>8 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>15 %</b>
Acrylamid	Aqua dest. (ml)	11,6	10,6	9,6	8,6	7,1
	40 % Acrylamid Mischung (ml)	3	4	5	6	7,5
Mix	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 %	<b>Gelmenge</b>	<b>1 ml</b>	<b>3 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>8 ml</b>	<b>10 ml</b>
Acrylamid	Aqua dest. (ml)	0,68	2,1	3,4	5,5	6,8
	30 % Acrylamid Mischung (ml)	0,17	0,5	0,83	1,3	1,7
Mix	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
40 %	<b>Gelmenge</b>	<b>1 ml</b>	<b>3 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>8 ml</b>	<b>10 ml</b>
Acrylamid	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
Mix	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 % Sequenziergelkonzentrat mit Harnstoff	<b>Gelkonzentration</b>	<b>4 %</b>	<b>6 %</b>	<b>8 %</b>
	Sequenziergel Verdünner (ml)*	74	66	58
	25 % Sequenziergelkonzentrat (ml)	16	24	32
30 % Acrylamid Mix (29:1)	<b>Gelkonzentration</b>	<b>4 %</b>	<b>6 %</b>	<b>8 %</b>
	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)	<b>Gelkonzentration</b>	<b>4 %</b>	<b>6 %</b>	<b>8 %</b>
	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.

**TBE-Gele zur Elektrophorese von dsNukleinsäure** (alle Angaben beziehen sich auf 100 ml Gellösung)

30 % Acrylamid Mix (29:1)	<b>Gelkonzentration</b>	<b>6 %</b>	<b>10 %</b>	<b>15 %</b>
	Aqua dest. (ml)	69	56	39
	30 % Acrylamid Mischung (ml)	20	33	50
40 % Acrylamid Mix (19:1 oder 29:1)	<b>Gelkonzentration</b>	<b>6 %</b>	<b>10 %</b>	<b>15 %</b>
	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 (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
<b>Es gilt:</b>			
$V_a$	=	$(T \times (100-C) \times V_t) / 3000$	$V_b = (T \times C \times V_t) / 200$

**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.

### Zusätzlich erhältliche Reagenzien und Lösungen:

Bezeichnung	Best.-Nr.	Maßangabe
TEMED	2367.1	100 ml
APS	9592.1	100 g
Acrylamid p.a., 4 x krist.	7906.2	1 kg
Bisacrylamid	7867.1	50 g
Tris p.a.	4855.2	1 kg
Glycin p.a.	3908.2	1 kg
SDS ultra pure	2326.2	500 g
Harnstoff	X999.2	1 kg
Rotiphorese® NF Harnstoff, fluoreszenzfrei	A120.1	1 kg
Rotiphorese® Sequenziergel Verdünner	3047.1	1 l
Rotiphorese® Sequenziergel Puffer Konzentrat	3050.1	250 ml
Rotiphorese® NF 10xTBE Puffer, fluoreszenzfrei	A118.1	2,5 l
Rotiphorese® 10xTBE Puffer	3061.1	1 l
Rotiphorese® 10xSDS PAGE Laufpuffer	3060.1	1 l
Roti®-Stock 20 % SDS Fertiglösung	1057.1	1 l

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

### 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.de

s.s. 09.2010