

SDS-PAGE Protokoll

Ziel:

Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und anschliessender Coomassie Färbung sowie Silber Färbung.

Versuchsplanung:

Im Versuch werden 2 Gele parallel hergestellt. Jedes Gel wird bis auf die Färbung gleich behandelt. Als Probe dient ein Zelllysat (PC12-Zellen). Dieses wird in 6 verschiedenen Konzentrationen auf das Gel aufgetragen.

Bei jeder SDS-PAGE müssen Geldicke, Probenmenge und Kammgrösse bestimmt werden.

Die Geldicke wird nach der zu erwartenden Proteingrösse gewählt. Im nachfolgenden Versuch wird ein 12.5 %iges (Anteil Acrylamid/Bisacrylamid) Trenngel und ein 4 %iges Sammelgel eingesetzt.

Weiter muss für das Gel ein Beladungsmuster entworfen werden. Von der Zelllysat-Stammloesung werden 6 unterschiedliche Volumina entnommen und auf das Gel geladen. Jedes Gel muss zusätzlich eine Markerspur enthalten. Der Marker wird je nach der zu erwartenden Proteingrösse gewählt. Im Versuch wird sowohl ein HM (high molecular marker) als auch ein LM (low molecular marker) eingesetzt, um einen möglichst grossen Protein-Bereich abdecken zu können. Bei der Coomassie Färbung werden als Marker HM C / LM C und bei der Silber Färbung die Marker HM S / LM S eingesetzt. Die Marker der Silber Färbung sind 5fach verdünnter als die der Coomassie Färbung, da die Silber Färbung 5 mal sensitiver ist als die Coomassie Färbung. Von den Markern werden jeweils 10 μ l aufgetragen.

Die Kammgrösse (S, M oder L) richtet sich nach der aufzutragenden Probenmenge sowie nach der Geldicke. Je nach Kammgrösse entstehen unterschiedlich voluminöse Taschen.

Vorgehen:

1. Geräte bereitstellen
2. Loesungen herstellen
3. Gelelektrophorese durchfuehren
4. Coomassie Färbung
5. Silber Färbung

1. Geraete bereitstellen

Fuer den Versuch werden folgende Geraete verwendet:

- Kuehlschrank 4 °C
- Tiefkuehler –20 °C
- Magnetruhrer
- pH-Meter
- Schuettler
- Thermoblock
- Vortex
- Zentrifuge

2. Loesungen herstellen

Folgende Loesungen werden im Versuch gebraucht:

Puffer

- Trenngelpuffer
- Sammelgelpuffer
- Laufpuffer
- 3x reduzierender Proben Puffer

Konzentrate

Coomassie Faerbung

- Faerbungsloesung
- Entfaerbungsloesung

Silber Faerbung

- Fixation-Loesung
- Sensitizing-Loesung
- Silver Reaction-Loesung
- Developing-Loesung
- Stopping-Loesung

Es werden jeweils Stock-Loesungen hergestellt.

2.1 Puffer

2.1.1 Trenngelpuffer (Lower Gel Buffer)

pH: 8.8

Menge: 100 ml

Substanzen:

- 1.5 M Tris
- 0.4% SDS
- Wasser deionisiert

Durchfuehrung:

1. 18.17 g Tris und 0.40 g SDS in ca. 90 ml deionisiertem Wasser auflösen
2. pH kontrollieren
3. pH mit 1M NaOH / 1M HCl einstellen
4. mit deionisiertem Wasser auf 100ml ergaenzen

Lagerung:

- Kuehlschrank 4°C

2.1.2 Sammelgelpuffer (Upper Gel Buffer)

pH: 6.7

Menge: 100ml

Substanzen:

- 0.5 M Tris
- 0.4% SDS
- Wasser deionisiert

Durchfuehrung:

1. 6.05 g Tris und 0.40 g SDS in ca. 90 ml destilliertem Wasser auflösen
2. pH kontrollieren
3. pH mit 1 M NaOH / 1 M HCl einstellen
4. mit deionisiertem Wasser auf 100 ml ergaenzen

Lagerung:

- Kuehlschrank 4°C

2.1.3 10x Laufpuffer (Electrophoresis Buffer)

pH: 8.3

Menge: 1000 ml

Substanzen:

- 0.25 M Tris
- 2 M Glycin
- 1% SDS
- Wasser destilliert

Durchfuehrung:

10x Laufpuffer herstellen

1. 30.28 g Tris abwaegen
2. 150.14 g Glycin zugeben
3. 10.0 g SDS zugeben
4. in ca. 950 ml destilliertem Wasser auflösen
5. pH kontrollieren
6. pH mit 1 M NaOH / 1 M HCl einstellen
7. mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml ergaenzen

10x Laufpuffer zu 1x Laufpuffer verduennen

8. 100 ml 1x Laufpuffer mit 900 ml deionisiertem Wasser mischen

Lagerung:

- Kuehlschrank 4°C

2.1.4 3x reduzierender Proben Puffer (Reducing Buffer)

pH: 6.75

Menge: 1000 ml

Substanzen:

- 65 mM Tris
- 20% (v/v) Glycerin
- 10% (v/v) beta-Mercaptoethanol
- 4% SDS
- Bromphenolblau
- Wasser deionisiert

Durchfuehrung:

1. 7.87 g Tris abwaegen
2. 20.0 g Glycerin zugeben
3. 10.0 g beta-Mercaptoethanol zugeben
4. 4.0 g SDS zugeben
5. in ca. 950 ml deionisiertem Wasser auflösen
6. pH kontrollieren
7. pH mit 1 M NaOH / 1 M HCl einstellen
8. 1 Spatelspitze Bromphenolblau zugeben
9. mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml ergaenzen

Lagerung:

- Tiefkuehler -20 °C

2.2 Konzentrate

Substanzen:

- BSA
- Wasser deionisiert
- 3x RB (Reducing Buffer)

Durchfuehrung:

Insgesamt werden 6 verschiedene Zelllysate-Konzentrate, nach folgendem Schema, hergestellt.

Tab. 1: Schema Zelllysate-Konzentrate

Konzentrat-Nr.	1	2	3	4	5	6
Zelllysate [µl]	10	20	30	40	60	80
3x Reducing Buffer [µl]	5	10	15	20	30	40
Auftrage-Volumen [µl]	15	30	45	60	90	120

Tab. 2: Schema Marker

Marker	LM C	HM C	LM S	HM S
Markerloesung [µl]	10	10	10	10
3x Reducing Buffer [µl]	5	5	5	5
Auftrage-Volumen [µl]	10	10	10	10

Zusatz:

Vereinfacht koennte eine Zelllysate-Stammloesung (SL), bestehend aus 240 µl Zelllysate und 120 µl 3x Reducing Buffer hergestellt werden. Von dieser Stammloesung koennen dann 6 unterschiedliche Volumina entnommen werden.

Tab. 3: Schema Zelllysate-Stammloesung

Konzentrat-Nr.	1	2	3	4	5	6
Volumen [µl]	5	10	15	20	30	40

Lagerung:

- Tiefkuehler -20 °C

2.3 Coomassie Faerbung

2.3.1 Faerbeloesung

Substanzen:

- Coomassie brilliant blue G250
- Coomassie brilliant blue R250
- Methanol

- Wasser Millipore
- Essigsaeure, konzentriert

Durchfuehrung:

1. 1 g Coomassie brilliant blue G250 in 200 ml Methanol loesen
2. 1 g Coomassie brilliant blue R250 in 200 ml Wasser Millipore loesen
3. beide Loesungen mischen
4. 40 ml Essigsaeure, konzentriert zugeben
5. durch Faltenfilter filtrieren

Lagerung:

- Raumtemperatur

2.3.2 Entfaerbeloesung

Substanzen:

- Essigsaeure
- Methanol
- Wasser Millipore

Durchfuehrung:

1. 150 ml Essigsaeure und 500 ml Methanol mischen
2. Volumen der Loesung mit Wasser Millipore auf 2000 ml ergaenzen

Lagerung:

- Raumtemperatur

2.4 Silber Faerbung

Silberfaerbungs-Kit

Von jeder Loesung werden 250 ml hergestellt. Die Loesungen koennen nach Gebrauch wieder in die Flasche zurueckgeschuettet werden. Frisch hergestellte Loesungen (nicht laenger als 24h) ergeben die besten Resultate.

Silver Staining Protocol for Proteins

2.4.1 Fixation

30 Minuten

Substanzen:

- Ethanol
- Eisessig
- Wasser destilliert

Durchfuehrung:

1. 100 ml Ethanol und 25 ml Eisessig mischen
2. mit destilliertem Wasser auf 250 ml ergaenzen

Lagerung:

- Raumtemperatur

2.4.2 Sensitizing

30 Minuten

Substanzen:

- Ethanol
- Glutardialdehyd (25% w/v)
- Natriumthiosulfat (5% w/v)
- Natriumacetat (17 g)
- Wasser destilliert

Durchfuehrung:

1. 75 ml Ethanol, 1.25 ml Glutardialdehyd und 10ml Natriumthiosulfat mischen
2. 17 g Natriumacetat (1 Paekchen) zugeben
3. mit destilliertem Wasser auf 250 ml ergaenzen

Lagerung:

- Raumtemperatur

2.4.3 Washing

3 x 5 Minuten

Substanzen:

- Wasser destilliert

2.4.4 Silver Reaction

20 Minuten

Substanzen:

- Silbernitratloesung (2.5% w/v)
- Formaldehyd (37% w/v)
- Wasser destilliert

Durchfuehrung:

1. 25 ml Silbernitratloesung und 0.1 ml Formaldehyd mischen
2. mit destilliertem Wasser auf 250 ml ergaenzen

Lagerung:

- Raumtemperatur, unter Lichtausschluss

2.4.5 Washing

2 x 1 Minute

Substanzen:

- Wasser destilliert

2.4.6 Developing

2 x 5 Minuten

Substanzen:

- Natriumcarbonat (6.25 g)
- Formaldehyd (37% w/v)
- Wasser destilliert

Durchfuehrung:

1. 6.25 g Natriumcarbonat (1 Paeckchen)
2. 0.05 ml Formaldehyd zugeben
3. mit destilliertem Wasser auf 250 ml ergaenzen

Lagerung:

- Raumtemperatur

2.4.7 Stopping

10 Minuten

Substanzen:

- EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.65 g)
- Wasser destilliert

Durchfuehrung:

1. 3.65 g EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 Paeckchen)
2. mit destilliertem Wasser auf 250 ml ergaenzen

Lagerung:

- Raumtemperatur

3. Gelelektrophorese durchfuehren

3.1 Platten bereitstellen

- Glasplatten und Plastikteile desinfizieren.
- Glasplatten, durch Spacer getrennt, zusammenschrauben und in die Apparatur einspannen.
- Durch Einfuellen von Wasser kontrollieren, ob die Apparatur dicht ist.

3.2 Gele herstellen

3.2.1 Trenngel 12.5%

Tab. 4: Zusammensetzung Trenngel

	15.0 ml
30% Acrylamid/BIS	6.25 ml
Wasser deionisiert	3.75 ml
Trenngelpuffer	5.00 ml
TEMED	30.0 μ l
40% APS (w/v)	30.0 μ l

3.2.2 Sammelgel 4%

Tab. 5: Zusammensetzung Sammelgel

	10.0 ml
30% Acrylamid/BIS	1.33 ml
Wasser deionisiert	5.67 ml
Sammelgelpuffer	3.00 ml
TEMED	20.0 μ l
40% APS (w/v)	20.0 μ l

Beim Herstellen der Gele unbedingt Handschuhe tragen, da Acrylamid/BIS neurotoxisch ist.

3.3 Gele abfuellen

- Trenngel abfuellen und polymerisieren lassen
- Sammelgel abfuellen
- Kamm direkt in Sammelgel einsetzen
- Sammelgel polymerisieren lassen

3.4 Gelplatten einspannen

Nach Abfuellen der Gele werden diese in die Klemm-Halterung, welche spaeter in den Elektrophorese-Tank eingesetzt wird, eingespannt.

3.5 Laufpuffer einfuellen

Nach Einsetzen der Klemm-Halterung in den Elektrophorese-Tank wird dieser mit Laufpuffer aufgefuellt.

3.6 Gele nach Beladungsschema beladen

Tab. 6: Beladungsschema

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Konzentrat		LM	HM	1	2	3	4	5	6	

3.7 Elektrophorese

- Sammeln bei 20 mA / Gel
- Trennen bei 40 mA / Gel

Die blaue Farblinie dient zur Orientierung. Sobald diese das Trenngel erreicht, wird die Stromstaerke erhoehrt. Das Auftrennen der Proteine dauert insgesamt ca. 90 Minuten. Es ist darauf zu achten, dass der Strom rechtzeitig abgestellt wird. Wird die Auftrennung nicht rechtzeitig gestoppt, laufen die Proteine nach unten in die Pufferloesung. Beim Herausnehmen der Platten Handschuhe tragen, um Fingerabdruেকে auf dem Gel zu vermeiden.

3.8 Gele entnehmen

Die Gele werden aus der Halterung entnommen und entsprechend gelagert:

- eingepackt in Frischhalte Folie
- bei 4 °C

4. Faerbung

4.1 Coomassie Faerbung

1. Gel 30 Minuten in der Faerbeloesung inkubieren
2. Gel 30 Minuten in Entfaerbeloesung entfaerben

4.2 Silber Faerbung

siehe Silver Staining Protokoll

5. Gel Foto

Ein Digital-Gel Analyzer (GelDoc) ermoeglicht die Gelanalyse. Das Gel wird auf eine Transilluminator-Platte gelegt und von unten mit Weisslicht durchleuchtet. Aus dem Bild koennen qualitative und quantitative Informationen gewonnen werden.