

Ziel:

Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und anschliessender Silber Färbung.

Versuchsplanung:

Im Versuch wird 1 Gel/Gruppe hergestellt. Als Probe dient ein Zelllysats (PC12-Zellen). Dieses wird in 6 verschiedenen Konzentrationen auf das Gel aufgetragen.

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

Die Geldichte wird nach der zu erwartenden Proteingrösse gewählt. Im nachfolgenden Versuch wird ein 10 %iges (Anteil Acrylamid/Bisacrylamid) Trenngel und ein 5 %iges Sammelgel eingesetzt.

Weiter muss für das Gel ein Beladungsmuster entworfen werden. Von der Zelllysats-Stammlösung 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 ein HM (high molecular marker) eingesetzt. Die Kammgrösse (S, M oder L) richtet sich nach der aufzutragenden Probenmenge sowie nach der Geldicke. Je nach Kammgrösse entstehen unterschiedlich voluminöse Taschen. Anschliessend wird eine Silber-Färbung durchgeführt.

Vorgehen:

1. Geräte bereitstellen bzw. kennen
2. Platten bereitstellen
3. Gele herstellen
4. Proben vorbereiten
5. Marker vorbereiten
6. Gelelektrophorese durchführen
7. Silber Färbung
8. Gel-Foto

1. Geräte bereitstellen bzw. kennen

Für den Versuch werden folgende Geräte verwendet:

- Kühlschrank 4 °C
- Tiefkühler -20 °C
- Magnetrührer
- pH-Meter
- Schüttler
- Thermoblock
- Vortex
- Zentrifuge

2. Platten bereitstellen

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

3. Gele herstellen

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

Trenngel 10%

30% Acrylamid/BIS	5 ml
Wasser deionisiert	6.8 ml
Trenngel-Puffer	3 ml
TEMED	7.5 µl
40% APS (w/v)	50.0 µl
10% SDS (w/v)	150 µl

→ Trenngel abfüllen in Apparatur und polymerisieren lassen.

Sammelgel 5%

30% Acrylamid/BIS	0.8 ml
Wasser deionisiert	3.6 ml
Sammelgel-Puffer	0.5 ml
TEMED	5 µl
40% APS (w/v)	68 µl
10% SDS (w/v)	50 µl

→ Sammelgel abfüllen in Apparatur, Kamm direkt einsetzen und polymerisieren lassen.

4. Proben vorbereiten

Vereinfacht wird eine Zelllysate-Stammlösung (SL), bestehend aus 0.5 ml Zelllysate und 0.25 ml 3x Reducing Buffer hergestellt werden. Von dieser Stammlösung werden dann für die Elektrophorese 5 unterschiedliche Volumina entnommen.

Konzentrat-Nr.	1	2	3	4	5
[μ l]	2	5	10	20	40

Vor dem Auftragen müssen die Proben 5 min bei 95°C aufgeköcht werden (Protein-Denaturierung).

Lagerung: Tiefkühler -20°C

5. Marker vorbereiten

Marker	HM
Markerlösung [μ l]	10
3x Reducing Buffer [μ l]	5

Vor dem Auftragen muss der Marker 5 min bei 95°C aufgeköcht werden (Protein-Denaturierung).

Lagerung: Tiefkühler -20°C

6. Gelelektrophorese durchführen

Den Elektrophorese-Tank mit Laufpuffer auffüllen.

Gele nach Beladungsschema beladen:

Tasche	1	2	3	4	5	6	7
Konzentrat		M	1	2	3	4	5
[μ l]			2	5	10	20	40

Elektrophorese durchführen:

- Sammeln bei 30 mA / Gel
- Trennen bei 40 mA / Gel

Die blaue Farblinie dient zur Orientierung. Sobald diese das Trenngel erreicht, wird die Stromstärke erhöht. Das Auftrennen der Proteine dauert insgesamt ca. 60 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 Pufferlösung. Beim Herausnehmen der Platten Handschuhe anziehen, um Fingerabdrücke auf dem Gel zu vermeiden.

Gele lagern:

- eingepackt in Frischhalte Folie und
- bei 4 °C

7. Silber Färbung

- Fixation über Nacht
- Sensitizing 30 min
- Washing 3 x 5 min
- Silver Reaction 20 min
- Washing 2 x 1 min
- Developing 2-5 min
- Stopping 10 min

Gele lagern:

- in Wasser oder
- eingepackt in Frischhalte Folie

8. Gel Foto

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