

SDS-PAGE

Gießen der Gele: Pipettierschema für 2 Polyacrylamidgele (1,5 x 60 x 80 mm)

| | Trenngel 15 % | Trenngel 12 % | Trenngel 10 % | Trenngel 6.5 % | Sammelgel |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-----------|
| Acrylamid | 6.75 ml | 5.4 ml | 4.5 ml | 2.9 ml | 750 µl |
| Trenngelpuffer | 4.5 ml | 4.5 ml | 4.5 ml | 4.5 ml | |
| Sammelgelpuffer | | | | | 1.7 ml |
| Wasser | 6.75 ml | 8.1 ml | 9.0 ml | 10.6 ml | 4.25 ml |
| APS 10% | 60 µl | 60 µl | 60 µl | 60 µl | 20 µl |
| Temed | 13.5 µl | 13.5 µl | 13.5 µl | 13.5 µl | 12 µl |

- Komponenten für Trenngel mischen
- 8 ml pro Gel in Gekassette gießen
- mit ddH₂O überschichten und ca. 30 min polymerisieren lassen
- ddH₂O abgießen
- Komponenten für Sammelgel mischen
- Sammelgel auf Trenngel gießen
- Taschenkamm einschieben und mindestens 30 min polymerisieren lassen
- Taschen mit ddH₂O auswaschen
- Gele können in Frischhaltefolie verpackt eine Woche im Kühlschrank gelagert werden

Probenaufbereitung:

- Proteinextrakte mit 4x SDS-Probenpuffer versetzen (bei Pflanzenextrakten werden normalerweise zwischen 20 und 50 µg geladen)
- 10 min kochen
- sofort auf Eis stellen

Gelelektrophorese:

- Gele in Kammer stellen, Kammer mit Laufpuffer füllen
- Proteinproben und 3µl Größenstandard auf Gel auftragen
- Proteine bei 80 – 120 V auftrennen

Detektionslimits:

Coomassie R-250: ca. 100 ng Protein

Coomassie G-250: ca. 500 ng

Silver Stain: ca. 50 ng

Lösungen:

| | |
|-----------------------|---|
| Trenngelpuffer (4x) | 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS |
| Sammelgelpuffer (4x) | 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS |
| APS | 10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat in ddH ₂ O, frisch anmachen |
| Laufpuffer | 50 mM Tris/HCl pH 8,3 384 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS |
| SDS-Probenpuffer (4x) | 200 mM Tris/HCl pH 6,8 400 mM DTT 8% (w/v) SDS 0,4 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerin (bei -20°C lagern) |