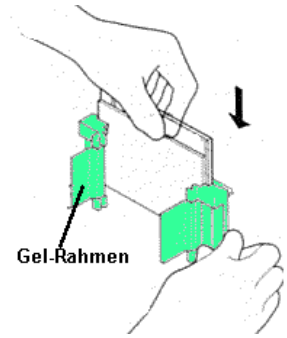


A) Gießen der 7 x 10 cm Minigele

- Reinige die Glasplatte mit integriertem Spacer und eine plane Glasplatte mit Ethanol und einem weichen Papiertuch.
- Setze beide Glasplatten (kurze Platte und Platte mit Spacer) so zusammen, dass zwischen den Platten ein flacher Hohlraum entsteht.



- Spanne beide Platten als Gelkassette in den grünen Gelrahmen, so dass die kürzere Platte - wie auf dem Bild zu sehen - nach vorne zeigt, dafür muss der Hebel des Gel-Rahmens nach außen gedrückt werden.
- Setze anschließend den Gelrahmen in den Gießstand ein, indem die Klammer am oberen Rand der Apparatur gedrückt wird. Durch die Klammer werden die Platten gegen die untere graue Gummileiste gedrückt und die Gelkammer nach unten abgedichtet.
- Pipettiere nun die Lösungen für das Trenngel in einem Becherglas zusammen (zunächst ohne TEMED und APS!)

Ansätze für jeweils 4 Gele	15 % Gele	13 % Gele	10 % Gele	8 % Gele	5 % Gele
deion. Wasser	7,3 ml	8,6 ml	10,6 ml	12,0 ml	14,0 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	10,0 ml	8,7 ml	6,7 ml	5,3 ml	3,3 ml
1,5 mol/l Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS-Lösung	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Ansätze für jeweils 2 Gele	15 % Gele	13 % Gele	10 % Gele	8 % Gele	5 % Gele
deion. Wasser	3,65 ml	4,3 ml	5,3 ml	6,0 ml	7,0 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	5,0 ml	4,35 ml	3,35 ml	2,65 ml	1,65 ml
1,5 mol/l Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
10 % SDS-Lösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

- Mische die Lösungen sorgfältig durch mehrmaliges luftblasenfreies Aufziehen der Mixtur mit Hilfe einer Einmal-Plastikpipette.
- Entgase die Gel-Lösung für 10 min im Exsikkator mit angelegtem Unterdruck (Membranpumpe).
- Addiere zu der Trenngel-Lösung **10 µl (4 Gele)** bzw. **5 µl (2 Gele)** TEMED (Originallösung) und **200 µl (4 Gele)** bzw. **100 µl (2 Gele)** einer 10 %igen Ammoniumpersulfat-Lösung (APS), keine Luftblasen in die Lösung einblasen!
- Mische die Lösungen vorsichtig durch mehrmaliges luftblasenfreies Aufziehen der Mixtur mit Hilfe einer Einmal-Plastikpipette.
- Fülle dann mit Hilfe der Einmal-Plastikpipette die Gellösung **zügig** und **luftblasenfrei** zwischen die Glasplatten der Gelkammer, bis die Lösung etwa 1 cm unter dem Niveau liegt, bei dem die Zähne des Probenkammes liegen würden (ggf. vorher markieren!).

- Überschichte nun die Gellösung zwischen den Glasplatten vorsichtig mit wassergesättigtem Butanol (obere Phase aus dem Vorratsgefäß benutzen!).
- Lasse die Einmal-Pipette in dem Becherglas mit dem Rest der Gellösung stehen (Polymerisationsanzeiger!) und bewege die Gelkassetten nicht mehr. Die Polymerisationszeit beträgt etwa 30 min.

Inzwischen:

- Pipettiere nun die Lösungen für das 5 %ige Sammelgel (*stacking gel*) in einem Becherglas zusammen (zunächst ohne TEMED und APS!)

	für jeweils 4 Gele	für jeweils 2 Gele
deion. Wasser	5,7 ml	2,85 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	1,7 ml	0,85 ml
0,5 mol/l Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml	1,25 ml
10 % SDS-Lösung	100 µl	50 µl

- Mische die Lösungen sorgfältig durch mehrmaliges luftblasenfreies Aufziehen der Mixtur mit Hilfe einer Einmal-Plastikpipette.
- Entgase die Gel-Lösung für 10 min im Exsikkator mit angelegtem Unterdruck (Membranpumpe).

Derweil:

- Transportiere die Gelkammern mit den auspolymerisierten Trenngelen im Gießstand waagrecht (Alkohol sollte nicht auslaufen!) zum Waschbecken und gieße den Alkohol ins Waschbecken, ohne, dass er über die Gelapparatur kleckert.
- Spüle die Geloberfläche gründlich mit A. dest. aus dem VE-Wasserhahn. Spüle auch die Außenseiten der Gelkassetten, so dass kein Alkohol zurückbleibt.
- Lasse das Wasser zwischen den Glasplatten ablaufen.
- Tupfe die Gelkassetten mit Haushaltstüchern halbwegs trocken und entferne mit Hilfe von Filterpapierstreifen vorsichtig jeden Rest Feuchtigkeit aus dem Raum zwischen den Glasplatten und auf der Oberfläche des Trenngels (Achtung, Oberfläche des Trenngels nicht zerstören!).
- Wenn alle Gele hergerichtet sind: Addiere zu der entgasten Sammelgel-Lösung **5 µl (4 Gele)** bzw. **2,5 µl (2 Gele)** TEMED (Originallösung) und **100 µl (4 Gele)** bzw. **50 µl (2 Gele)** einer 10 %igen Ammoniumpersulfat-Lösung (APS), keine Luftblasen in die Lösung einblasen!
- Fülle die Gellösung mit der Einmal-Plastikpipette bis zum oberen Rand zwischen die Glasplatten (ohne Luftblasen zu erzeugen!)
- Führe vorsichtig im leichten Winkel die Zähne des Probenkammes zwischen die Glasplatten und schiebe den Kamm langsam und gleichmäßig in seine Endposition. Stelle sicher, nicht mit den Fingern mit der überlaufenden Gellösung in Kontakt zu kommen.
- Kontrolliere, dass sich unter und zwischen den Zähnen des Kammes keine Luftblasen gefangen haben.
- Saug übergelaufene Gellösung vorsichtig mit einem Kleenex auf (sofort in den Müll!)

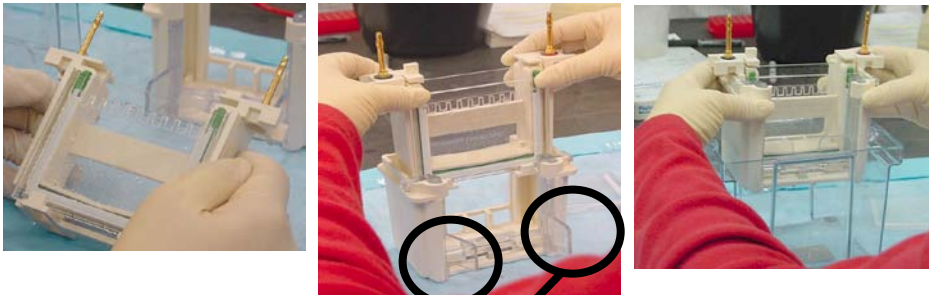
- Lasse die Einmal-Pipette in dem Becherglas mit dem Rest der Gellösung stehen (Polymerisationsanzeiger!) und bewege die Gelkassetten nicht mehr. Die Polymerisationszeit beträgt etwa 30 min.

→ fertige Gele können max. eine Woche aufgehoben werden: Lege dafür die Gelkassette mit dem Gel mit feuchten Tüchern in eine Plastiktüte und bewahre sie im Kühlschrank bei 4 °C auf.

B) Beladung der Gele mit Proben und Elektrophorese

Am Ende der Polymerisationszeit der *stacking*-Gele:

- Ziehe vorsichtig die Kämme zwischen den Glasplatten heraus und baue die Trennkammer mit den Gelkassetten zusammen (Dichtungen der Gelhalterungen mit Laufpuffer anfeuchten, kurze Scheibe zeigt zur Mitte der Apparatur).



Flügel nach innen schließen

- Setze die Trennkammer in den Puffertank ein. Fülle das innere Pufferreservoir so mit 1 x Laufpuffer, dass dieser über die kürzeren (inneren) Glasplatten in die Probenaschen im *stacking*-Gel einlaufen kann.

1x Laufpuffer ansetzen:

Stammlösung ist 5x konzentriert

500 ml 1x konzentrierter Laufpuffer werden benötigt (pro Kammer)

→ 100 ml 5x Laufpuffer + 400 ml A.dest.

Laufpuffer muss gerührt werden!

- Spüle jede der Probenaschen des *stacking*-Gels mit Hilfe einer Hamilton-Spritze mit Laufpuffer aus.

- Kontrolliere das innere Pufferreservoir auf Dichtigkeit!

- Befülle die Probenaschen des *stacking*-Gels mit Proteinstandards und Proben.

- Stelle dafür 2 Bechergläser mit A. dest., zum Spülen der Hamiltonspritze zwischen den einzelnen Probenaufgaben, bereit. Spüle die Spritze seriell in beiden Spülgläsern aus, bevor die nächste Probe aufgezogen wird.

- Trage von der Mischung der Standard-Proteine (z.B. Roti T851) 5 µl auf.

- Fülle das äußere Pufferreservoir mit 1 x Laufpuffer.

- Setze den Elektrodendeckel auf den Puffertank und verbinde die Anschlüsse mit dem Netzgerät (Polung beachten: **schwarz zu schwarz** und **rot zu rot!**).

- Lasse die Proben zunächst für etwa 15 min bei 90 V in das Stacking-Gel einlaufen und sich an der Trenngelgrenze fokussieren. Schalte dann für die Proteintrennung die Spannung für ca. 2 h auf 120 V.

Lösungen:

1,5 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 8,8 (Trenngelpuffer)

Tris (free base)	54,5 g	<ul style="list-style-type: none">• in 250 ml A. dest lösen• pH 8,8 mit konzentrierter HCl (Vorsicht, raucht!) einstellen• mit A. dest auf 300 ml auffüllen• bei 4 °C im Kühlschrank lagern
------------------	--------	--

0,5 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 6,8 (Sammelgelpuffer)

Tris (free base)	6,0 g	<ul style="list-style-type: none">• in 80 ml A. dest lösen• pH 6,8 mit konzentrierter HCl (Vorsicht, raucht!) einstellen• mit A. dest auf 100 ml auffüllen• bei 4 °C im Kühlschrank lagern
------------------	-------	---

10 % APS (Ammoniumpersulfat)

APS	1 g	<ul style="list-style-type: none">• ad 10 ml mit A. dest• á 300 µl aliquottieren• bei -20 °C lagern
-----	-----	---

5 x Laufpuffer (5 l) (End-Konz. des 1 x Puffers: 25 mmol/l Tris, 250 mmol/l Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3)

Tris (free base)	75,5 g	<ul style="list-style-type: none">• Tris und Glycin in 2 l A. dest. lösen, pH ist o.k.• SDS-Lösung zugeben• mit A. dest. auf 5 l auffüllen• bei 4 °C im Kühlraum lagern• vor Gebrauch 1 : 5 mit A. dest. verdünnen
Glycine	470 g	
10 % SDS-Lösung	250 ml	

2 x Probenpuffer (100 ml) (End-Konz. des 1 x Puffers (Achtung: nur jeweils die Hälfte der angegebenen Konzentrationen in der fertigen Mischung aus Probenpuffer und Probelösung!): 50 mmol/l Tris, 1 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 4 % β-Mercaptoethanol, 40 % Glycerin, pH 6,8)

Tris (free base)	1,2 g	<ul style="list-style-type: none">• löse Tris in 20 ml A. bidest• stelle den pH mit konz. HCl (Vorsicht, raucht!) auf 6,8 ein• addiere Glycerin, β-Mercaptoethanol, die SDS-Lösung und das Bromphenolblau, mische, fülle mit A. dest. auf 100 ml Gesamtvolumen auf, lagere im Kühlschrank bei 4 °C <p>Mische Standards und Proben mit dem 2 x Probenpuffer in gleichen Volumina!</p>
Glycerin	40 ml	
β-Mercaptoethanol	8 ml	
10 % SDS-Lösung	20 ml	
Bromphenolblau	400 mg	