

Probenvorbereitung für die 1D-Gelelektrophorese

Master-Anweisung, letzte Bearb: Jan 2016

Nach der Proteinpräparation wird jeder Extrakt aliquottiert und mit demselben Volumen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, gut durchmischt (kurz vortexen) und bei -80 °C eingefroren.

In den Resten der Extrakte wird mit Hilfe der Bradford (1976) -Methode die Proteinkonzentration in mg/ml bestimmt. Die End-Konzentration der Proteine in den eingefrorenen Proben ist dann genau halb so hoch wie dieser Wert (1 + 1 Verdünnung mit Probenpuffer).

Um die Gelbeladung mit exakt gleichen Proteinmengen zu gewährleisten, sucht man zunächst die Probe mit der geringsten Proteinkonzentration aus. Da die Geltaschen mit maximal 25 µl Probenvolumen beladen werden sollten, damit seitliches Überschwappen in Nachbartaschen vermieden wird, wird für alle anderen Proben dasjenige Volumen ausgerechnet, das in die Probentaschen eingefüllt werden muss, um dieselbe Gesamtmenge Protein zu erreichen wie mittels 25 µl der geringst-konzentrierten Probe. Alternativ kann für alle Proben eine einheitliche Proteinmenge festgelegt werden (z.B. 15 µg), wenn alle Probenkonzentrationen dieses erlauben.

Für die geringst-konzentrierte Probe wird zunächst die Proteinmenge in 25 µl Volumen ausgerechnet. Dazu wird die Proteinkonzentration der eingefrorenen Probe (also die nach der Verdünnung mit Probenpuffer) durch 1000 geteilt und mit 25 multipliziert. Das Ergebnis ergibt den Proteingehalt in 25 µl dieser Probe (in mg).

Beispiel:

Proteinkonz. im Extrakt (aus Bradford-Eichkurve):	0,9 mg/ml
Proteinkonz. nach Zugabe von Probenpuffer:	0,45 mg/ml
Proteingehalt in 25 µl dieser Probe: $0,01125 \text{ mg} =$	11,25 µg

Nun müssen für alle anderen Proben diejenigen Volumina errechnet werden, die diesen Proteingehalt haben. Dazu wird der gewünschte Proteingehalt (in mg) durch die Konzentration der Probe (in mg/ml) geteilt. Das Ergebnis ist das in die Tasche des Gels einzufüllende Volumen (in ml). Um dieses Volumen etwas anschaulicher zu machen, wird das Ergebnis mit 1000 multipliziert, um die Volumenangabe in µl zu erhalten.

Beispiel:

Proteinkonz. einer Probe nach Zugabe von Probenpuffer:	0,65 mg/ml
In die Geltasche zu füllendes Volumen (für 11,25 µg Protein):	17,3 µl

Zeichne für jedes Gel ein Beladungsschema, z.B.:

Spur	1	Spur 2	Spur 3	Spur 4	Spur 5	Spur 6	Spur 7	Spur 8	Spur 9	Spur 10
<input type="checkbox"/>										
Standard	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Standard	
a µl	b µl	c µl	d µl	e µl	f µl	g µl	h µl	i µl	j µl	

Vorbereitung der Proben:

- Taue ein Probengefäß mit Standard-Protein auf.
- Erhitze die Proben (gegeben falls auch den Standard) 1 min bei 95 °C im Wasserkocher in einem Schwimmprobenhalter. (Achtung!: Wenn die Aliquots große Volumina haben, durchstich den Deckel des Probengefäßes vorher mit einer Nadel, um das Explodieren des Gefäßes und eventuellen Probenverlust zu vermeiden.)
- Kühle die Proben anschließend für ca. 3 min im Kühlschrank ab
- Vortexe die Proben und stelle sie anschließend in die Zentrifuge und lasse den Rotor kurz anlaufen, um das gesamte Probenvolumen im Gefäßboden zu sammeln.
- Stelle die Proben und die Standards auf Eis, bis die Gelbeladung erfolgt.

Standardproteine im Roti® -Mark Standard T851

Myosin, Rind	212 kDa
β-Galactosidase, rek <i>E. coli</i>	118 kDa
Serumalbumin, Rind (glykosyl.)	66 kDa
Ovalbumin, Huhn (glykosyl.)	43 kDa
Carboanhydrase	29 kDa
Trypsin Inhibitor, Soja	20 kDa
Lysozym, Huhn	14 kDa

Benutze 5 µl/Geltasche!