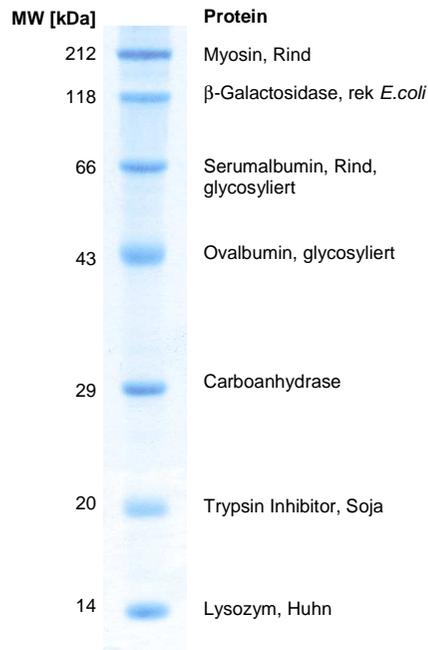




Gebrauchsanweisung

Roti®-Mark STANDARD Protein-Molekulargewichtsmarker für die SDS-PAGE



I. Einleitung

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5
76185 Karlsruhe
Postfach 100121
76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Telefax: +49 (0) 721/ 5606-149
E-Mail: info@carlroth.de
Internet: www.carlroth.de

s.s. 11/2011

Roti®-Mark STANDARD besteht aus sieben natürlich vorkommenden Proteinen. Die Konzentrationen der Einzelproteine sind so eingestellt, dass eine gleichmäßige Färbeintensität mit Coomassie-Färbelösungen erreicht wird. Die Proteine sind vorreduziert, acyliert und in nicht-reduzierendem Lämmli-puffer mit 0,01 % Bromphenolblau gelöst.

Tab.1:

Protein	MW (kDa)	Konz.** (mg/ml)
Myosin, Rind	212	0,2
β-Galactosidase, rek. <i>E. coli</i>	118	0,2
Serumalbumin, Rind, glycos.	66	0,2
Ovalbumin, Huhn, glycosyl.	43	0,25
Carboanhydrase	29*	0,15
Trypsin Inhibitor, Soja	20*	0,2
Lysozym, Huhn	14*	0,2

* Das Verhalten kleiner natürlicher Proteine im elektrischen Feld ist manchmal etwas unberechenbar. Trotz bekannter MW zeigen sich diese Bande häufig etwas tief bei ca. 27/17/12 kDa. Sollten in diesem Größenbereich absolute Größenzahlen benötigt werden, empfehlen wir die Verwendung der rekombinanten Marker Roti®-Mark 10-150 (Best. Nr. T850) or Roti®-Mark 10-150 plus (Best. Nr. X879).

**Es handelt sich um eine typische Konzentration. Die genauen Massen variieren mit den Chargen.

Die Konzentrationsangaben sind nur ungefähre Werte. Die tatsächlichen Konzentrationen können von den in Tabelle 1 angegebenen abweichen, da nach der Konzentrationsbestimmung verschiedene Prozessierungsschritte den Gehalt verringern können. Roti®-Mark STANDARD ist daher für Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen nicht geeignet.

II. Lagerung

- Lagern Sie Roti®-Mark STANDARD bitte bei -20 °C! Der Marker kann kurzfristig (wenige

Tage) bei 4 °C aufbewahrt werden. Um häufiges Einfrieren und Auftauen zu vermeiden sollten Aliquots eingefroren werden.

- Erwärmen Sie Roti®-Mark STANDARD vor Gebrauch bitte langsam, um ausgefallenes SDS wieder in Lösung zu bringen. Roti®-Mark STANDARD ist vorreduziert und alkyliert. Ein Aufkochen vor der Verwendung ist daher im Allgemeinen nicht notwendig, kann aber die Bandenschärfe erhöhen.
- Der Marker sollte nicht längere Zeit bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt gelagert werden!**

III. Gelauftrag

- Empfohlene Auftragsmengen für Minigele: (10 %; 0,75 mm Dicke)
Coomassie-Färbung: ca. 5 µl
Silber-Färbung: ca 1 µl
- Wichtig: Die erforderliche Auftragsmenge variiert mit Geldicke, C/T-Verhältnis, verwendeter Färbung und Zahnbreite des Kammes.
- Die Intensität von Coomassie-Färbungen kann je nach Protokoll sehr unterschiedlich ausfallen. Unter Punkt VI finden Sie zwei Methoden, die eine effiziente Färbung gewährleisten.

IV. Trouble Shooting

Marker-Banden sind nicht oder nur sehr schwach zu sehen

- Achten Sie auf eine korrekte Auftragsmenge. Die empfohlene Menge gilt für Minigele mit 0,75 mm Dicke. Wenn Sie dickere oder größere Gele verwenden, müssen Sie die Auftragsmenge erhöhen.
- Erhöhen Sie die Färbeintensität. Verschiedene Färbemethoden können zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen. Zwei hervor-

ragende Färbemethoden finden Sie unter Punkt VI. Versuchen Sie nicht eine schlechte Färbung durch erhöhten Proteinauftrag auszugleichen. Dies führt zu einem veränderten Laufverhalten der Proteine (sowohl Ihrer Probe als auch des Markers) und unscharfen und dicken Banden.

- Einzelne Banden sind schwach: Die Proteine können unter bestimmten Umständen verklumpen. Resolubilisieren Sie die Marker aliquots durch Erhitzen für 5 min. bei 80 °C. Vorsichtig mischen.

Protein-Banden/Marker-Banden sind verschwommen

- Vermeiden Sie ein Überladen des Gels!
- Achten Sie darauf, dass der Marker nie längere Zeit bei Raumtemperatur gelagert wird. Stellen Sie zur Überbrückung der Zeit zwischen zwei Gelläufen den Marker auf Eis.
- Vermeiden Sie häufiges Einfrieren/Auftauen des Markers.
- Die Langzeitlagerung sollte immer bei -20 °C erfolgen.
- Achten Sie beim Gießen des Gels darauf, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden
- Achten Sie beim Gießen des Gels auf gute Durchmischung der Gellösungen.
- Verwenden Sie nur qualitativ hochwertige Acrylamidlösungen (z.B. Rotiphorese® Gel 30 (Best.Nr.: 3029) oder Gel 40 (Best.-Nr.: 3030)).
- Vermeiden Sie eine Überhitzung des Gels. Reduzieren Sie bei Bedarf die Spannung.
- Überprüfen Sie die Zusammensetzung und den pH-Wert der verwendeten Puffer, entgasen Sie die Puffer.

Zusätzliche Banden

- Die Markerportine wurden für die Coomassie-Färbung optimiert. Bei einer Silberfärbung können schwache zusätzliche Banden sichtbar sein.

- Durch lange Lagerung oder vielfaches Auftauen/Einfrieren können die Proteine zu einem geringen Grad zerfallen, was zu einer zusätzlichen schwachen Bande bei ca. 10 kDa führt.
- Orientieren Sie sich an der verstärkten Bande bei 43 kDa.

V. Bestimmung des apparenten MW eines Proteins

1. Bestimmen Sie die RF-Werte der Markerproteine nach der Elektrophorese.

$$F\text{-Wert} = \frac{\text{Laufstrecke Ihres Proteins}}{\text{Gesamtlaufstrecke}}$$

Start: Sammelgel/Trenngel-Grenze
Lauffront: Bromphenolblau-Bande

2. Tragen Sie die Log MW der Markerproteine (s. Tab.1) gegen deren RF-Werte auf.

3. Bestimmen Sie den RF-Wertes Ihres Proteins. Lesen Sie an Hand Ihrer gezeichneten Kurve den zugehörigen logMW ab. Errechnen Sie über Tabelle 1 und 2 das Molekulargewicht in kDa.

Tab. 2: Log MW der Markerproteine:

Protein	Log MW
Myosin, Rind	5,3010
β-Galactosidase, rek. <i>E. coli</i>	5,0755
Serumalbumin, Rind	4,8195
Ovalbumin, Huhn	4,6335
Carbonic Anhydrase	4,4624
Trypsin Inhibitor, Soja	4,3010
Lysozym, Huhn	4,1613

VI. Coomassie-Färbung

Mit Roti®-Blue (Best.-Nr.: A152):

- Gel nach Gebrauchsanweisung 2 bis 12 h mit Roti®-Blue inkubieren
- Ein Entfärbeschritt ist nicht notwendig

Mit Brilliant Blau G250 (Best.-Nr. 9598):

- Gel 30-60 min in der Fixierungslösung unter leichtem Schütteln inkubieren
- Gel 20-40 min in der Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubieren
- Gel 30 sec. in der Fixierungslösung unter leichtem Schütteln inkubieren
- Gel in der Entfärbelösung so lange unter leichtem Schütteln inkubieren, bis die Hintergrundfärbung entfernt ist und die Proteine gut sichtbar werden.
- Fixierungslösung: 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure
- Färbelösung: 50 ml Lösung I und 50 ml Lösung II direkt vor der Verwendung mischen
Lösung I: 0,2 % Brilliant Blau G250, 90 % Ethanol
Lösung II: 20 % Essigsäure
- Entfärbelösung: 20 % Ethanol, 10 % Essigsäure

VII. Empfohlene Reagenzien

- Brilliant Blau G250, Best.-Nr.: 9598
- Ethanol, p.a., Best.-Nr.: 9065
- Essigsäure, p.a., Best.-Nr.: 3738
- Roti®-Blue; Best.-Nr.: A152

Roti®-Mark STANDARD

T851.3	0,2 ml
T851.1	1 ml
T851.2	4 x 1 ml