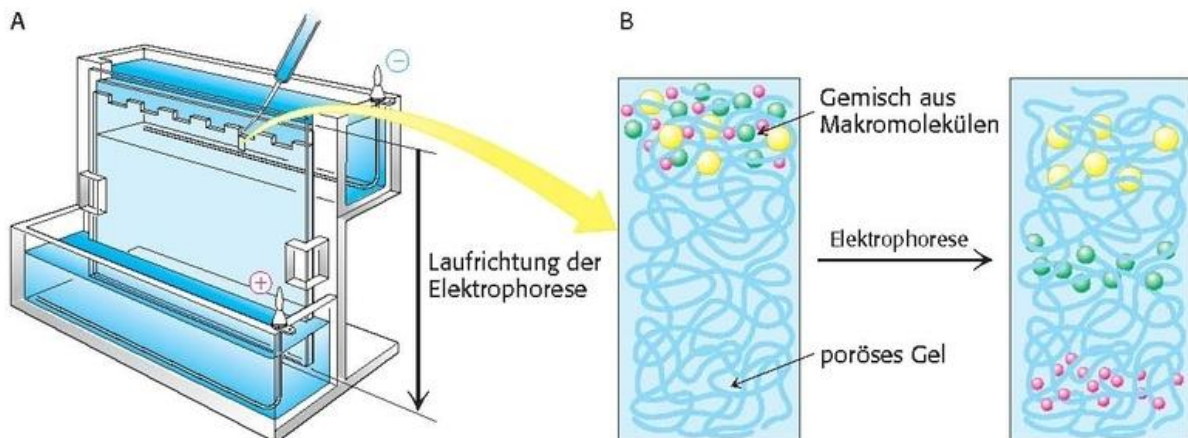


SDS Polyacryamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip:

SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) ist ein amphipatisches, negativ geladenes Molekül, das sich mit seinem hydrophoben Molekülteil an Proteine anlagert. Die Menge des an das Protein angelagerten SDS ist der Größe des Proteins in etwa proportional, so dass das Protein in SDS eine die Größe des Proteins reflektierende Ladung erhält (und die natürliche Ladung des Proteins maskiert wird). Im elektrischen Feld werden die Proteine dann entsprechend ihrer Beweglichkeit aufgetrennt; kleine Proteine laufen schneller als große.



Aus: Berg, Stryer, Tymoczko, Gatto: *Biochemie*, Springer Spektrum © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Entnahme von Speichelproben

Jeder Teilnehmer spült den Mund mit Wasser aus. Nach 5 Minuten wird ca. 1 ml Speichel in ein bereitgestelltes Gefäß abgegeben. 500 µl davon werden in ein Zentrifugengefäß überführt und 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt.

Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Das zu analysierende Proteingemisch (die Speichelprobe) wird 5:1 mit 6xSDS-Probenpuffer gemischt: 50 µl Speichelprobe mit 10 µl SDS-Probenpuffer mischen. Der Probenpuffer enthält SDS (zur Bindung des Proteins), Glycerin (zur Beschwerung der Probe) und einen Farbstoff (zur Verbesserung der Sicht).

Anschließend wird das Gefäß direkt in kochendes Wasser gegeben (oder in den Heizblock) und 5 min gekocht. Das Protein wird durch das Kochen denaturiert und kann dadurch gut das SDS binden.

Beladung eines SDS-Gels

20 µl der Proben werden vorsichtig in die Geltaschen geladen. Die Geltaschen sollen nicht zerstört werden und die Probe soll nicht in benachbarte Taschen gelangen. In eine Tasche wird ein Größenstandard (Marker) aufgetragen. Die Belegung der einzelnen Geltaschen muss notiert werden.

Lauf eines SDS-Gels

Das beladene Gel wird nun einer Spannung (80-160 V) ausgesetzt und ca. 2/3 seiner Länge laufen gelassen. Danach wird der Strom abgeschaltet.

Färben eines SDS-Gels

Die Gelplatten mit einem Spatel auseinanderhebeln und das Gel in die Färbelösung gleiten gelassen. Das Gel wird ca. 30 min in dieser Färbelösung leicht geschwenkt. Vorsicht: die Färbelösung ist stark sauer und intensiv färbend – auch für Haut und Kleidung!

Die Färbelösung abgießen (kann wiederverwendet werden) und Entfärber auf das Gel gießen.

Die Entfärbelösung öfters wechseln, bis die Gelbanden sichtbar werden.

Das entfärbte Gel kann nach einer Fotografie zur Archivierung getrocknet werden.