

Arbeitsanleitung zur
Färbung mit AzurGel-K

für Gele im Format 10 x 10 x 0,1 cm

Kat. Nr.: GF 10002

- **Grundlage**

Diese Färbemethode für Proteingele basiert auf den besseren Färbe-Eigenschaften des kolloidal gelösten Farbstoffes Coomassie™ Brilliant Blau G 250 in Anwesenheit von anorganischen Säuren und hohen Salzkonzentrationen. Unter diesen Bedingungen bindet der Farbstoff spezifisch an Proteine, die Gelmatrix wird nur minimal gefärbt.

- **Literatur**

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Electrophoresis 9, 255 - 262
Neuhoff V, Stamm R, Eibl, H (1985) Electrophoresis 6, 427 - 448

- **Vorteile**

höhere Empfindlichkeit als herkömmliche Coomassie™ Brilliant Blau R Färbung
Proteinfärbung durch gesamten Gelquerschnitt (bei Gelen bis 1 mm Schichtdicke)
wasserklarer Hintergrund nach der Entfärbung
stabile Fixierung nach der Färbung
geeignet für Tris/Glycin/SDS- und Tris/Tricin-Gele
wenig Wechseln der Lösungen
lösungsmittelfreies Entfärben

- **Spezifikation**

Färbelösung A:	500 ml, enthält Ammoniumsulfat und Phosphorsäure
Färbelösung B:	125 ml, enthält Coomassie™ Brilliant Blau G 250
	Beide Lösungen reichen zur Färbung von ca. 25 Minigelen.
Lagertemperatur:	RT
Haltbarkeit:	ca. 6 Monate, siehe Packung
Nachweisgrenze:	6 ng BSA (bei 5 mm Taschenbreite und 1 mm Geldicke)
Dauer:	~ 12 h, 3 – 4 Schritte
Handhabung:	Das Tragen von Schutzbrille und Handschuhen beim Umgang mit Gelen und Färbelösungen ist obligatorisch.

- **Allgemeine Hinweise**

- **Schüttler**

Führen Sie alle Fixierungen und Färbungen auf einem Schüttler bei mäßiger Umdrehungszahl (50 - 70 Umdrehungen pro Minute) durch.

- **Färbegeschirr**

Verwenden Sie ausschliesslich saubere, dicht zu verschliessende Färbewannen, um Verlust an Methanol durch Verdunstung zu vermeiden.
Achten Sie darauf, daß das Gefäß geeignet ist, 100 ml Färbelösung aufzunehmen und das Gel überall stets mit der jeweiligen Lösung bedeckt ist. Färben Sie nach Möglichkeit nur ein einzelnes Gel je Färbewanne, jedoch nie mehr als zwei Gele pro Färbewanne.

- **Tris/Glycin/SDS-Gele**

1. Färben

Setzen Sie unmittelbar vor der Färbung folgende Färbelösung frisch an:

55 ml	demin. Wasser
20 ml	Methanol
20 ml	Färbelösung A
5 ml	Färbelösung B (vor Gebrauch gut schütteln)

2. Inkubieren Sie das Gel auf einem Schüttler für mehrere Stunden oder über Nacht in dieser Lösung. Nach 3 h sind Banden gut sichtbar, nach 8,5 h ist die vollständige Färbung des Gelquerschnitts erreicht.

Gele mit geringer Acrylamid-Konzentration (< 10 % T) weisen häufig eine höhere Hintergrundfärbung auf, da die kolloiden Partikel in die großen Poren dieser Gele eindringen können.

3. Waschen/Entfärben

Überführen Sie das Gel in eine zweite, saubere Färbeschale und füllen Sie diese mit ca. 200 ml dest. Wasser auf. Schütteln Sie das Gel so lange, bis sein Hintergrund wasserklar ist. Nach ca. 7 Stunden haben Sie eine optimale Entfärbung erreicht, Sie können jedoch (z.B. übers Wochenende) das Gel 3 Tage im Waschwasser belassen, ohne dass die Bandenintensität merklich nachlässt.

Hartnäckige Hintergrundfärbung kann mit 250 ml/l Methanol ausgewaschen werden. Längere Lagerung in dieser Lösung kann zur Verminderung der Bandenintensität führen.

4. Lagern

Wollen Sie das Gel längerfristig in Lösung lagern, überführen Sie es in 200 g/l Ammoniumsulfat. Unter diesen Bedingungen geht der Farbstoff nicht in Lösung, die Banden bleiben gefärbt.

5. Trocknen

Soll das Gel für Dokumentationszwecke aufbewahrt werden, empfiehlt sich die Trocknung mit dem **AnaFix** Geltrocknungskit. Dabei wird das Gel ohne Hitze und damit nahezu ohne Schrumpfeffekt zwischen Cellophanfolien eingebettet. Die dabei verwendete Geltrocknungslösung sorgt für ein Dia-ähnliches, flexibel biegbares Gel, das so dauerhaft in Arbeitsunterlagen (Ordern) abgeheftet werden kann. Die Inkubationsdauer in AnaRapid Geltrocknungslösung sollte nach der Färbung mit AzurGel-K 5 - 15 min nicht überschreiten, da sonst die Entfärbung der Banden einsetzt.

- **Tris/Tricin-Gele**

Im Prinzip wird die Färbung von Tris/Tricin-Gelen wie die der Tris/Glycin-Gele durchgeführt. Für eine verbesserte Färbung von kleinen Proteinen (Peptide < 20 kDa) kann vor der Färbung ein Fixierungsschritt durchgeführt werden.

1. Fixierung

Inkubieren Sie das Gel 15 min bei Raumtemperatur in folgender Lösung:

40 ml/l	demin. Wasser
50 ml/l	Methanol
10 ml/l	Eisessig

2. Färbung

Inkubieren Sie das Gel nach der Fixierung für 15 min in folgender Lösung:

55 ml	demin. Wasser
20 ml	Methanol
20 ml	Färbelösung A

Setzen Sie danach 5 ml Färbelösung B (**vor Gebrauch gut schütteln**) zu und inkubieren Sie das Gel auf einem Schüttler für mehrere Stunden oder über Nacht in dieser Lösung. Nach 3 h sind Banden sichtbar, nach 8,5 h ist die vollständige Färbung des Gelquerschnitts erreicht.

3. Waschen/Entfärbung

Überführen Sie das Gel in eine zweite, saubere Färbeschale und waschen Sie das Gel mit ca. 200 ml demin. Wasser.

Verfahren Sie danach weiter, wie in der Vorschrift für Tris/Glycin Gele beschrieben.

- **Reinigung von Arbeitsgerät**

10 ml HCl 32 %
90 ml Methanol

Diese Lösung kann mehrfach verwendet werden.

- **Problemlösungen**

Problem	Ursache	Massnahme
Färbelösung enthält ausgefallene Farbstoffkomplexe	colloidale Farbpartikel aggregieren	normale Erscheinung
Gel nach der Färbung durchgehend blau	Färbelösung A zu gering dosiert, Farbstoff lag nicht als Colloid vor	Gel in 25 % Methanol entfärben, evtl. Färbung wiederholen
Proteine nach 12 h nur schwach gefärbt	Methanol nicht zugesetzt oder verdampft	Farbstoff sehr stark in colloidalen Zustand, Dauer bis zu vollständigen Färbung des Gels deutlich verlängert
Banden verschiedener Proteine zeigen trotz gleicher Auftragemenge unterschiedliche Absorptionswerte	unterschiedliche Bindungskapazitäten für den Farbstoff	zur Quantifizierung immer definierte Mengen des Proteins von Interesse auftragen