
Электрофоретическая ячейка

**MINI-
PROTEAN** ®

Руководство по
эксплуатации

BIO-RAD

For Technical Service Call Your Local Bio-Rad Office or in the U.S. Call 1-800-4BIORAD (1-800-424-6723)

Оглавление

| | Стр. |
|-----------------|--|
| Раздел 1 | Общая информация..... 1 |
| 1.1 | Введение..... 3 |
| 1.2 | Комплектующие..... 4 |
| 1.3 | Спецификации..... 6 |
| 1.4 | Химическая Совместимость..... 6 |
| 1.5 | Безопасность..... 7 |
| Раздел 2 | Установка и Основные Действия..... 7 |
| 2.1. | Подготовка Кассеты 7 |
| 2.2 | Подготовка Mini-Protean 3 и Загрузка образца..... 11 |
| 2.3 | Гель Электрофорез 14 |
| Раздел 3 | Теория Разделения и Оптимизация..... 15 |
| 3.1 | Введение 15 |
| 3.2 | Система SDS- PAGE (Laemmli)..... 16 |
| 3.3 | Нативный PAGE..... 17 |
| Раздел 4 | Подготовка Реактивов и Готовые Растворы 18 |
| 4.1 | Объемы, требуемые на гель 18 |
| 4.2 | СИСТЕМА SDS- PAGE (Laemmli) Буфер 19 |
| 4.3 | Прерываемый Нативный PAGE (Ornstein-Davis)..... 21 |
| 4.4 | Непрерываемый Нативный PAGE (Ornstein-Davis)..... 23 |
| Раздел 5 | Ссылки..... 25 |
| Раздел 6 | Обслуживание 25 |
| Раздел 7 | 26 |
| Раздел 8 | Информация о продукте и Вспомогательные материалы 29 |
| Раздел 9 | Гарантийная информация..... 31 |

Раздел 1

Общая Информация

1.1 Введение

Электрофорезная камера MINI-PROTEAN 3 работает как с гелями, приготовленными вручную, так и с уже готовыми гелями. Система MINI-PROTEAN 3 включает в себя заливочный столик и стеклянные пластины, с присоединенными спейсерами, которые упрощают ручную заливку и устраняют протекание в процессе заливки. Ячейка позволяет пропустить один-два геля в один прием, а малая камера совместима с другими электродными модулями компании "Био рад", предназначенными для блоттинга, 2D-электрофореза и элюирования.

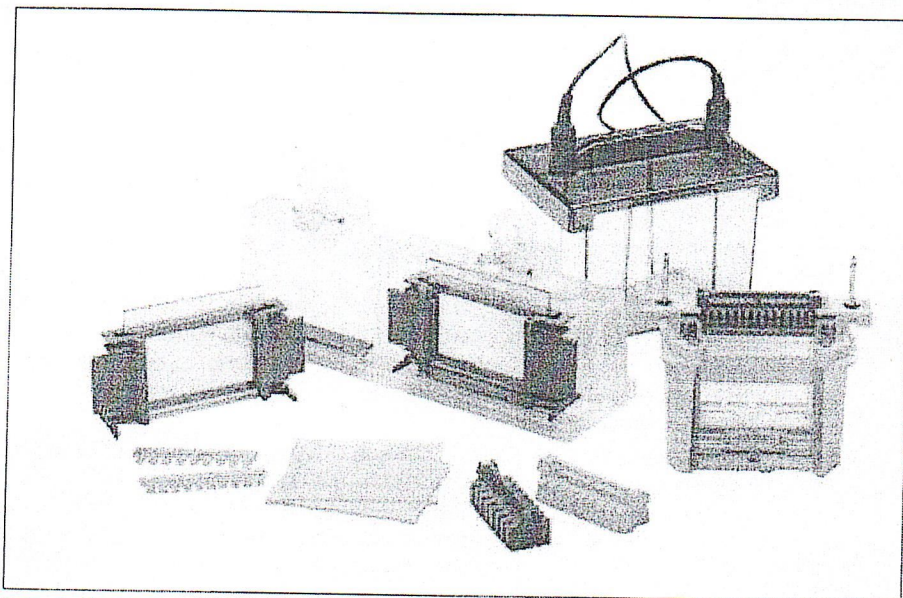


Рис. 1. Комплект MINI-PROTEAN.

1.2 Компоненты

Для лучшего выполнения работы при помощи MINI-PROTEAN 3, ознакомьтесь с компонентами, собрав и разобрав ячейку еще до использования (Рисунки 1 и 2).

| | |
|-----------------------------------|---|
| Спейсер | Спейсер - более высокая стеклянная пластинка со спейсерами. Спейсеры существуют разной толщины - 0.5 мм, 0.75 мм, 1.0 мм и 1.5 мм, эти толщины отмечены непосредственно на каждом спейсере |
| Короткая Пластинка | Короткая Пластинка - короче, это плоская стеклянная пластинка, которая объединяется со спейсером, образуя кассету-сэндвич |
| Заливочная Рамка | Заливочная Рамка, помещенная в столик, равномерно выравнивается и обеспечивает надежное соединение Спейсера и Пластинки вместе, что формирует кассету-сэндвич |
| Кассетное устройство | Одна Заливочная Рамка, Спейсер и Короткая Заливочная Пластинка формируют после полимеризации геля кассету |
| Заливочный столик | Заливочный столик удерживает кассету в процессе заливки геля. Он имеет специальные зажимы, которые скрепляют кассету |
| Гребенки | Гребенки предоставляются на выбор |
| Сэндвич-кассета | Одна пластинка со спейсером и одна короткая пластинка с заполимеризовавшимся гелем образуют Сэндвич-кассету после заливки |
| Литая Буферная перегородка | Оносоставная буферная перегородка используется при выполнении только одного геля |
| Фиксирующая рамка | Фиксирующая рамка удерживает вместе Электродное устройство и сэндвич-кассету. Ее зажимы и прижимные бегунки удерживают сэндвич-кассету напротив U-образной прокладки на Электродном устройстве, образуя внутреннюю Буферную Камеру |
| Внутренняя буферная Камера | Электродное устройство и две сэндвич-кассеты или одна сэндвич-кассета вместе с буферной перегородкой, фиксирующая рамка образуют Внутреннюю Камеру |
| Камера и Крышка | Камера и Крышка объединяются, чтобы полностью отделить внутреннюю камеру в процессе электрофореза. Крышка не может быть удалена без прерывания электрической схемы. Мини Резервуар и Крышка также совместимы с другими модулями электродов производства "Био-Рад" для блоттинга, первого пробега в 2D-электрофорезе и элюирования |

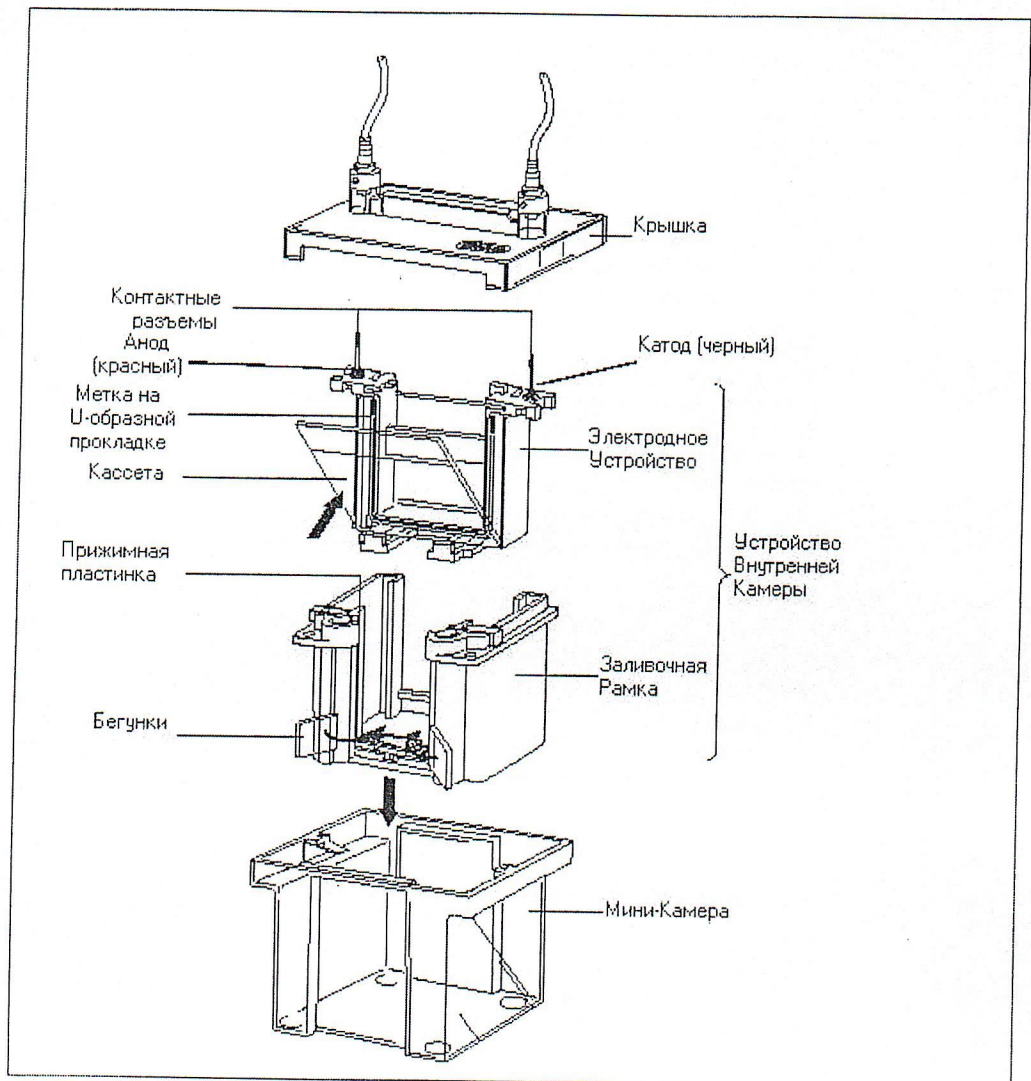


Рис. 2. Сборка Mini-Protean 3.

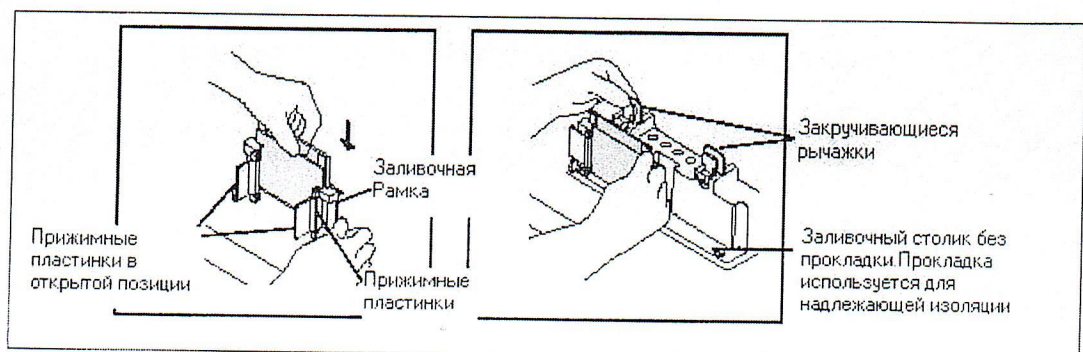


Рис. 3. Сборка заливочной рамки Mini-Protean 3 и заливочного столика.

1.3 Спецификации

| | |
|--|--|
| Заливочный столик | Поликарбонат |
| Штырек, Удерживающее Кольцо, и Пружина | Сталь |
| Заливочная рамка* | Полисульфон |
| Серая Прокладка | Силикон (серый) |
| Фиксирующая Рамка ** | Заполненный стеклом жидкокристаллический полимер (Vectra™) |
| Зажимная Пластика и Бегунки | Поликарбонат |
| Электродная Установка | Заполненный стеклом жидкокристаллический полимер |
| Электроды | Платиновые провода диаметром 0.01 дюймов |
| Прокладка, внутренняя сердцевина электрода (зеленый) | Силикон |
| Мини Резервуар и Крышка | Литой Поликарбонат + Delrin™ |
| Руководства по установке образцов | Поликарбонат |
| Гребенки | Поликарбонат |

| # ячейки | Ширина | 0.5 mm | 0.75 mm | 1.0 mm | 1.5 mm |
|-------------|---------|--------|---------|--------|--------|
| 5 | 12.7 mm | — | 70 µl | 105 µl | 160 µl |
| 9 | 5.08 mm | — | 33 µl | 44 µl | 66 µl |
| 10 | 5.08 mm | 22 µl | 33 µl | 44 µl | 66 µl |
| 15 | 3.35 mm | 13 µl | 20 µl | 26 µl | 40 µl |
| IPG | 76.2 mm | — | — | 420 µl | 730 µl |
| Prep/2-D | | | | | |
| Референсная | 3.1 mm | — | 13 µl | 17 µl | 30 µl |
| С образцом | 71.7 mm | — | 310 µl | 400 µl | 680 µl |

| | |
|--|--|
| Общий Размер электрофорезной камеры | 16 см (L) x 12 см (W) x 18 см (H) |
| Размер Геля | 8 см (W) x 7.3 см (H) |
| Внутренняя Пластика | 10.1 см (W) x 7.3 см (H) |
| Внешняя Пластика | 10.1 см (W) x 8.3 см (H) |
| Совместимость Готового Геля | Готовые Гели |
| Предел Напряжения | 600 VDC и 15 ватт |
| Вес | 2.0 кг |

1.4 Химическая Совместимость Mini-Protean 3 с различными лабораторными реактивами.

Комплектные детали Mini-Protean 3 не совместимы с ацетоном, этанолом или бутанолом. Использование органических растворителей оставляет недействующими все гарантийные обязательства. Пожалуйста, звоните 1-800-4-BIORAD или в Ваш местный офис представительства "Био-Рад" для технической информации относительно дополнительной химической совместимости. Mini-Protean 3 3 гребенки не совместимы со 100 % TEMED при его многократном воздействии. Обработка гребенок TEMED перед заливкой уничтожит структурную целостность гребенок через какое-то время.

* Американский Патент 6 162 342

** Американский Патент 5 632 877

† Американский Патент 5 656 145

1.5 Безопасность

Электропитание к MINI-PROTEAN 3 подводится внешним источником питания постоянного тока (в комплект не включен). Вывод этого электропитания должен быть изолирован от заземления и иметь независимую оплетку. Все источники питания Био-Рад выполняют это важное требование по безопасности. Независимо от используемого электропитания, установленные максимумы рабочих параметров для MINI-PROTEAN 3 следующие:

- 600 В максимальное напряжение (постоянный ток)
- 15 Ватт максимальный мощность
- 50 °С максимальное ограничение окружающей температуры

Ток к электрофоретической ячейке подводит модуль через крышку установки, которая обеспечивает пользователю безопасное подключение. Ток к электрофоретической ячейке нарушается, когда крышка удалена. Всегда отключайте электропитание перед удалением крышки. **Не пытайтесь использовать ячейку без крышки.**

Важно: Данное изделие Био-Рад разработано и сертифицировано в соответствии со стандартами безопасности *EN61010-1. Сертифицированные изделия безопасны в использовании, когда эксплуатируются в соответствии с Руководством пользователя. Данный прибор никогда не должен быть модифицирован или изменен. Любое изменение ведет к прекращению действия гарантийных обязательств (свидетельство EN61010-1) и создает потенциальную опасность.

"Био-Рад" не несет ответственности за любые повреждения, вызванные использованием этого прибора в других целях, кроме тех, для которых он предназначен, или модифицированием прибора, выполненными не Био-Рад или его уполномоченными агентами.

* EN61010-1 - международное принятое требование по электробезопасности для лабораторных приборов.

Раздел 2

Установка и Основные действия

2.1 Подготовка Кассеты

Ручная Заливка Геля

1. Стекланная Кассета и Сборка Заливочного столика

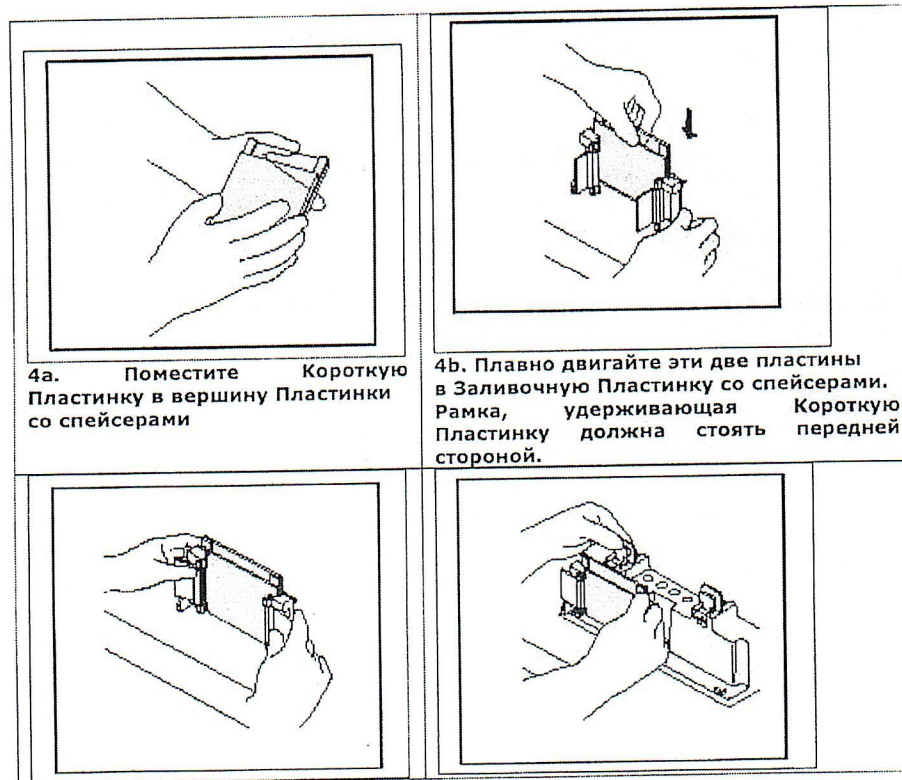
Обратите внимание: Удостоверьтесь, что Заливочный столик, Заливочная рамка, и стеклянные пластины чистые и сухие прежде, чем собирать Заливочную установку. В процессе правильного использования, остатки пыли могут все же накапливаться за бегунками Заливочной рамки в точках поворота. Эту пыль следует удалять перед каждым использованием

- а. Разместить Рамку Заливки вертикально с бегунками в открытой позиции и развернутой вперед по отношению к плоской поверхности.

- b. Выбрать Пластинку со спейсерами необходимой толщины геля и поместить сверху Короткую Пластину (см. Рисунок 4а).
- c. Ориентировать Пластинку со спейсерами так, чтобы маркировка была сверху. Плавно двигайте две стеклянных пластины в Рамку заливки, следя за тем, чтобы Короткая Пластина оставалась ориентированной вперед по отношению к Рамке (сторона с бегунками) (см. Рисунок 4b).

Обратите внимание: Удостоверьтесь, что обе пластины заполнены до уровня нанесения маркировки на Пластинке со спейсерами и правильно ориентированы. Утечка может произойти, если пластины расположены с нарушением границ или ориентированы неправильно.

- d. Когда стеклянные пластины установлены, задействуйте бегунки, чтобы зафиксировать кассеты в Рамке Заливки (см. Рисунок 4c). Проверьте, чтобы обе пластины были выравнены в основании.
- e. Задействуйте пружинистые литые рычажки и поместите кассетное устройство на прокладку Заливочного Столика серого цвета. Удостоверьтесь, чтобы горизонтальные ребра на спинке Заливочной Рамки были выравнены по отношению к Заливочному столику, а стеклянные пластинки оставались перпендикулярными уровню поверхности. Рычажок прижимает Пластинку со спейсерами вниз к серой каучуковой прокладке (см. Рисунок 4d).
- f. Повторить шаги а-е для второго геля.



| | |
|--|--|
| 4с. Блокируйте бегунки, чтобы обеспечить удерживание Пластинки | 4д. Зафиксируйте положение Заливочной Рамке Заливки в Заливочном столике. Зафиксируйте, используя пружинистый литой рычажок. |
|--|--|

Рис. 4. Установка Заливочного Столика и Рамки MINI-PROTEAN 3.

2. Заливка Геля

а) Прерываемый Полиакриламидный Гель

- i. Поместить гребенку полностью в собранную кассету. Пометьте стеклянную пластинку на 1 см ниже зубчиков гребенки. Это - уровень, по которому заливается разрешающий гель. Удалите гребенку.
- ii. Подготовить раствор мономерного разрешающего геля, смешав все реактивы кроме APS и TEMED. (СМ Раздел 4) Дегазировать готовый раствор под вакуумом в течение не менее 15 минут. Не используйте для этого аспиратор воды слива.
- iii. Добавить ASP и TEMED к дегазированному раствору мономерного разрешающего геля, и налить до метки, используя стеклянную или одноразовую пластмассовую пипетку. Лейте раствор непрерывно, чтобы избежать его смешивания с воздухом
- iv. Немедленно покройте раствор мономера водой или изоамиловым спиртом

Обратите внимание: Если используется вода, добавляйте ее медленно и равномерно, чтобы предотвратить смешивание. **Не используйте бутанол или изобутанол.**

- v. Оставить гель до полной полимеризации на время от 45 минут до 1 часа. Сполосните поверхность геля дистиллированной водой. Не оставляйте спирт на геле в течение времени больше, чем 1 час, это ведет к обезвоживанию поверхности геля.

Обратите внимание: На этом этапе раствор разрешающего геля может быть оставлен при комнатной температуре на ночь. Добавьте 5ml разбавленного в соотношении 1:4 раствора 1.5MTris-HCl, pH 8.8 (для Системы Laemmli) к гелю, чтобы сохранить его от пересыхания. При использовании другой буферной системы, добавьте 5 мл 1x раствора буфера на поверхность геля.

- vi. Приготовьте концентрирующий раствор мономерного геля. Смешайте для этого все реактивы, кроме APS и TEMED. Дегазируйте раствор под вакуумом в течение не менее 15 минут.
- vii. Перед заливкой концентрирующего геля вложите кусочек фильтровальной бумаги, чтобы высушить область между стеклянными пластинками и выше разрешающего геля. Позаботьтесь о том, чтобы не коснуться поверхности геля.
- viii. Добавьте APS и TEMED к дегазированному концентрирующему раствору мономерного геля, лейте раствор между стеклянными пластинками.
- ix. Продолжайте лить до тех пор, пока не будут достигнуты вершины коротких пластинок.
- x. Вставьте необходимую гребенку между спейсерами, начиная сверху Пластины со спейсерами, удостоверьтесь, что кончик каждой гребенки направляется между спейсерами. Проще всего вставлять гребенки, начиная от угла и так далее по очереди, пока гребенки полностью не вставлены. Поместите гребенки в кассету, совмещая ребро гребенки с вершиной Короткой Пластины.
- xi. Оставьте концентрирующий гель полимеризоваться на 30-45 минут.
- xii. Аккуратно удалите гребенку, и полностью ополосните ячейки дистиллированной водой или буфером для нанесения.
- xiii. Ополаскивайте Заливочную Рамку и Столик дистиллированной, деионизированной водой каждый раз после использования.

б) Непрерываемый Полиакриламидный Гель

- i. Подготовьте раствор мономера, смешав все реактивы кроме ASP и TEMED. Дегазируйте раствор под вакуумом в течение 15 минут (СМ Разделу 4).
- ii. Добавьте ASP и TEMED к дегазированному раствору мономера, лейте раствор между стеклянными пластинками. Продолжайте лить, пока не будет достигнута вершина Короткой Пластины.

- iii. Вставьте нужную гребенку между спейсерами, удостоверившись также, что кончики каждой гребенки направляются между спейсерами. Проще всего вставлять гребенки, начиная от угла и так далее по очереди, пока гребенки полностью не вставлены. Поместить гребенки в кассету, совмещая ребро гребенки с вершиной Короткой Пластинки.
- iv. Оставьте гель до полной полимеризации в течение от 45 минут до 1 часа.
- v. Осторожно удалите гребенку, и полностью ополосните ячейки дистиллированной водой или буфером для нанесения.
- vi. Ополоскивайте Заливочную Рамку и Столик дистиллированной, деионизированной водой каждый раз после использования.

Готовый Гель

1. Подготовка Кассеты с Готовым Гелем

Обратите внимание: Гарантия на MINI-PROTEAN 3 действует только при работе с Готовыми Гелями Био-Рад.

- a. Удалить Готовый Гель из упаковки.
- b. Осторожно удалите гребенку, полностью ополосните ячейки дистиллированной водой или буфером нанесения.
- c. Вскройте Кассету Готового Геля лезвием по пунктирной линии внизу.
- d. Отделите пленку внизу Кассеты Готового Геля, чтобы приоткрыть край геля.
- e. Повторите то же самое для второго Готового Геля.

Обратите внимание: Если должен быть выполнен только один гель, используйте буферную перегородку для электрофореза.

2.2 Устройство Электрофорезного Модуля и Загрузка Образцов Mini-Protean 3

Устройство электрофорезного модуля Mini-Protean 3

1. Удалите Кассету с Гелем из Заливочного столика. Вращайте бегунки Заливочной рамки по направлению вовнутрь, постепенно ослабляя Кассету с Гелем (см. Рисунок 5a).

2. Поместите Кассету в слоты внизу с каждой стороны Электродной Установки. Убедитесь, что Короткая Пластина Кассеты стоит внутренней стороной вперед по отношению к метке на U-образной прокладке (см. Рисунок 5b).
3. Приподнимите Кассету к месту напротив зеленых прокладок и плавно переместите ее в Заливочную Рамку (см. Рисунок 5c).
4. Надавливайте на Электродное Устройство, пока рычажки бегунков Заливочной рамки полностью не закроются так, чтобы получилась Внутренняя Камера и была обеспечена надлежащая изоляция короткой пластины напротив метки на U-образной прокладке (см. Рисунок 5d). Короткая пластина должна находиться напротив метки на прокладке.

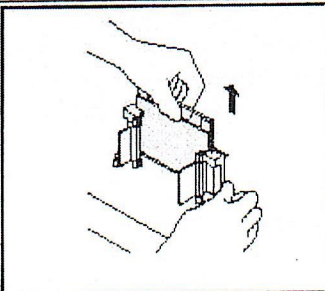
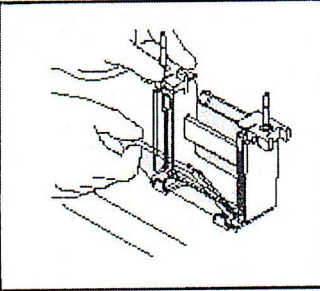
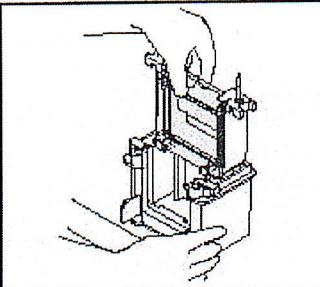
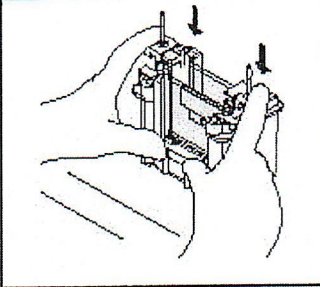
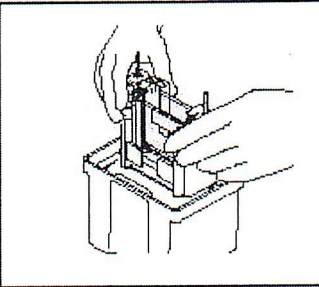
| | |
|--|--|
|  |  |
| <p>5a. Удалите Сэндвич-Кассету из Заливочной Рамки</p> | <p>5b. Поместите Кассету в Электродное Устройство. Установите Короткую Платину по направлению вовнутрь.</p> |
|  |  |
| <p>5c. Плавно двигайте Кассету и Электродное Устройство в Фиксирующую Рамку</p> | <p>5d. Придавите Электродное Устройство пока рычажки бегунков Заливочной рамки полностью не закроются.</p> |
|  | |
| <p>5e. Опустите Внутреннюю Камеру в Мини-Камеру.</p> | |

Рис. 5. Сборка Mini-Protean 3 .

Обратите внимание: Осторожно нажимайте на вершину Электродного Устройства до полного закрытия Заливочной рамки, бегунки при этом направляют вершину Короткой Пластины на каждой Кассете к месту напротив резиновой прокладки соответствующим образом и предотвращают тем самым утечку.

5. Опустить устройство Внутренней камеры в Камеру. Заполните Внутреннюю камеру ~125 мл буфера нанесения, пока уровень не достигнет половины между верхними частями высокой и короткой стеклянных пластинок Кассеты.

Обратите внимание: Не переполняйте Внутреннюю Камеру. Избыток буфера вызовет протечку буфера в нижнюю Камеру, которая может привести к потере буфера и прерыванию электрофорезного процесса.

6. Добавить ~200 мл буфера нанесения в Камеру (нижняя буферная камера).

Загрузка Образцов

1. Загрузить образцы в ячейки при помощи Гамильтоновского шприца или пипетки, используя специальные наконечники для загрузки гелей.
2. При использовании специального Приспособления для загрузки образцов, патентованного компанией Био-Рад, поместите его между двумя гелями в Электродном Устройстве. Эти приспособления для загрузки образцов доступны для 9, 10, 12, и 15-ти ячейечном формате.

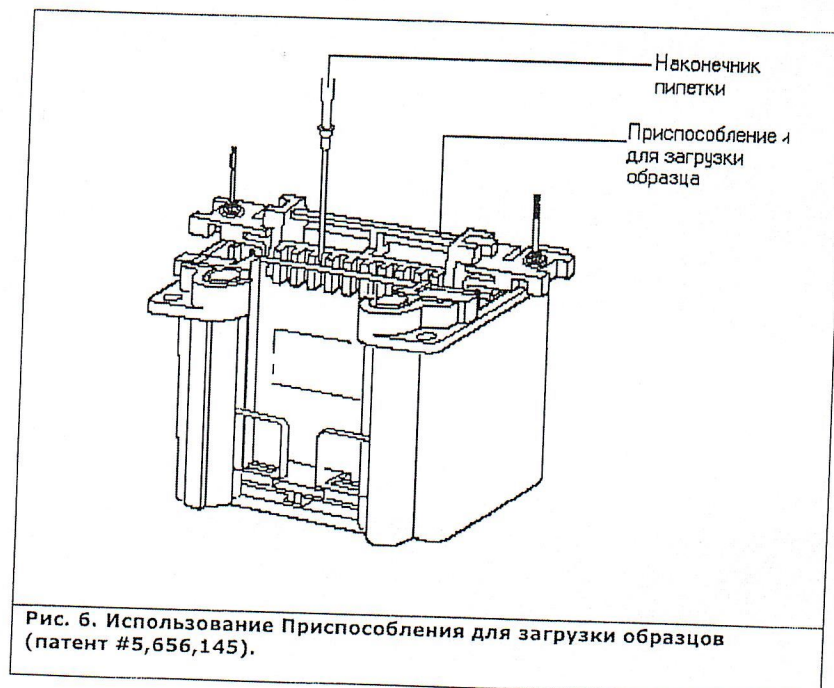


Рис. 6. Использование Приспособления для загрузки образцов (патент #5,656,145).

3. Используйте Приспособление для загрузки образцов, чтобы точно определить местонахождение ячеек с образцами. Вставьте Гамильтоновский шприц или наконечник пипетки в слоты Приспособления и заполните соответствующие ячейки.

Обратите внимание: Загружайте образцы медленно, чтобы позволить им равномерно распределяться по дну. Будьте осторожны, чтобы не проколоть дно ячейки иглой шприца или наконечником пипетки.

2.3 Гель Электрофорез

Камера

1. Поместите крышку на Камеру. Удостоверьтесь, что цвета разъемов и гнезд соответствуют друг другу. Правильная ориентация достигается совмещением гнезд на крышке с разъемами на электродном устройстве. Специальные клапаны препятствуют их неправильному положению.

Условия Мощности

1. Вставьте электрические провода в соответствующий источник электропитания, соблюдая полярность.
2. Включите электропитание и начните электрофорез; постоянные 200 Вт рекомендуются для SDS-PAGE, а также и для применения большинства нативных гелей. Время выполнения – приблизительно 35 минут при 200 Вт для системы SDS-PAGE.

Удаление Геля

1. После того, как Электрофорез проведен, выключите электропитание и разъедините электрические провода.
2. Удалите крышку Камеры, и осторожно выньте Внутреннюю камеру. Вылейте буфер.

Обратите внимание: Всегда желательно выливать буфер перед открытием бегунков, чтобы избежать проливания буфера.

3. Откройте бегунки Заливочной рамки. Вытащите Электродное устройство из Заливочной рамки и удалите Кассету с гелем.
4. Удалите гели из Кассеты, аккуратно отделяя две пластины Кассеты. Используйте для этого клиновидное, пластмассовое Приспособление для удаления геля (зеленого цвета), оно предназначено, чтобы помочь по отдельности отделить Пластины.

Обратите внимание: Для того, чтобы удалить гель из Готовой Кассеты, сначала отрежьте пленку рядом с Готовой Кассетой, где внутренняя стеклянная пластинка сходится с внешней пластмассовой пластинкой.

5. Проведите острым краем Приспособления для удаления геля или лезвием по каждому спейсеру, чтобы отделить гель от спейсеров. Удалите гель, инвертируя гель и пластинку в фиксирующем или любом другом подходящем растворе, осторожно встряхивая, пока гель не отделится от Пластинки.
6. Ополосните Электродное Устройство Mini-Protean 3, Заливочную рамку и Камеру дистиллированной, деионизированной водой после использования.

Раздел 3

Теория Разделения и Оптимизация

3.1 Введение

Гель-Электрофорез разделяет молекулы в сложных смесях, в соответствии с их размером и зарядом. В течение электрофоретического процесса возникает сложное взаимодействие между исследуемыми образцами, матричным буфером и электрическим током, приводящее к разделению индивидуальных молекул на полосы. Следовательно, переменные, которые рассматриваются при помощи Электрофореза, имеют параметры пор геля, буферной системы, и, собственно, свойства самого соединения, представляющего интерес.

Размер Пор Геля

Поры в Геле создаются путем сшивания Полиакриламида с Бис-акриламидом, образуя, таким образом, сетку пор или матрицу. Эта структура позволяет проводить молекулярное отсеивание молекул сквозь матрицу геля. Размер пор Геля - это функция используемой концентрации мономера акриламида (%T). Условно, Полиакриламидные Гели характеризуются %T, который является процентом по весу от всего мономера, участвующего в сшивании. %T дает значение относительного размера пор геля. Обычно, размер пор уменьшается с увеличением %T.

%T рассчитывается по уравнению:

$$\%T = \frac{g \text{ acrylamide} + g \text{ crosslinker}}{\text{total volume (ml)}} \times 100\%$$

%C - отношение сшивателя к мономеру акриламида в растворе мономера.

%C рассчитывается с использованием следующего уравнения:

$$\%C = \frac{g \text{ crosslinker}}{g \text{ acrylamide} + g \text{ crosslinker}} \times 100\%$$

Традиционно используются для аналитических гелей значение 2.67 % C.

Гели могут быть приготовлены как при постоянном значении процента по всем гелям, так и с градиентом %T по гелям. Типичные

составы - от 7.5 % до 20 % для постоянного процентного соотношения геля или при ранжировании градиентов в пределах от 4-15 % к 10-20 %.

В качестве оптимального значения %T мономера для качественного разделения используется общая концентрация. Оптимальное значение %T будет меняться в зависимости от молекулярного веса соединения, представляющего интерес.

В качестве значения размера пор, обеспечивающих оптимальное разрешение для белков, эмпирически принимают такой размер, который обеспечивает значение относительной подвижности (Rf) между 0.55-0.6.

Значение Rf для специфических белков рассчитывается следующим образом:

$$R_f = \frac{\text{Расстояние, пройденное белком}}{\text{Расстояние, пройденное ионным фронтом}}$$

Буферная Система

Буферная система определяется требованиями мощности, и непосредственно влияет на разделение. Буферная система представляет собой Буфер, используемый в геле и буфер нанесения. Существуют непрерываемые и прерываемые буферные системы.

Непрерываемые Буферные Системы

В непрерываемых буферах в системе при постоянных pH и концентрации присутствуют буферные ионы одного рода. Обычно гель готовится при одном постоянном значении %T, и образец загружается непосредственно в ту часть геля, где будет происходить разделение. Частично ширина полосы определяется высотой загрузки образца в ячейке, для достижения лучших результатов загружайте их так, чтобы образцы были сконцентрированы и небольших объемов.

Прерываемые Буферные Системы

В прерываемых буферных системах, как в геле, так и в электродной камере присутствуют различные буферные ионы. Если используются разные буфера в геле и в электродном растворе, при добавлении геля нанесения к разрешающему гелю, образцы сжимаются в тонкую стартовую полосу, и индивидуальные белки, хорошо растворяются и разделяются. Первоначально прерываемые буферные системы были изобретены для неденатурированных или нативных белков; однако наиболее популярная прерываемая система - буферная система SDS-PAGE Laemmli. Состав этой системы приведен в Разделе 4.1.

Буферная Система SDS-PAGE (Laemmli)

Буферная система Laemmli - это прерываемая буферная система, которая содержит SDS. В данной системе, содержащей также Додецил Сульфат Натрия SDS и Тиол-редуцирующий агент, типа 2-Меркаптоэтанола(ME), белки денатурируются при нагревании.

Получающиеся полипептиды приобретают форму, подобную пруту, и однородное отношение заряда к массе, пропорциональное их молекулярным весам. Белки разделяются, согласно их молекулярному весу, что делает эту систему чрезвычайно полезной при определении молекулярного веса.

Нативный PAGE

Нативный PAGE - методика разделения биологически активных белков. В отличие от системы SDS-PAGE, подвижности белков в системе Нативного PAGE зависят как от размера, так и от заряда. В данном случае не существует общей электрофорезной буферной системы, которая бы оптимально разделяла все белки в нативном геле. Ключевые параметры для разделения белков в Системе Нативного PAGE - pI белка, представляющего интерес, и pH электрофорезного буфера.

pH и pI

pH Электрофорезного буфера должен оставаться в пределах диапазона pH , при которых белок остается устойчивым и сохраняет биологическую активность. Кроме того, pH буфера должен передавать достаточный заряд белку для движения в геле. Изменения в pH повлияют как на заряд, так и на размер (гидродинамический объем) белка, а также повлияют на величину пробега. Например, буфер, со значением pH больше, чем pI белка, будет сообщать ему отрицательный заряд, белок при этом будет мигрировать к положительному электроду (аноду).

Наоборот, буфер с pH ниже, чем pI белка сообщит ему положительный заряд, и белок будет перемещаться к отрицательному электроду (катоду). В случае, когда pH равняется pI , на белке не будет никакого заряда, и он вообще не будет перемещаться в электрическом поле.

Подвижности белков лучше всего модифицируются изменением pH буфера. Буферы, со значениями pH близкими к pI , обеспечивают лучшую разрешающую способность. Однако для них время пробега может быть длиннее. Наоборот, использование буфера со значением pH далеким от pI приводит к более быстрому пробегу, разрешающая способность при этом может быть потеряна.

Выбор pH становится балансом между разделением и скоростью.

Как выбрать систему нативного PAGE

1. Прерываемые Буферные Системы (Ornstein-Davis2)

Прерываемые буферные системы должны быть, прежде всего, проверенными. Подробные протоколы приведены в Разделе 4.2.

Преимуществом прерываемой системы является использование концентрирующего геля для накопления растворенных исследуемых образцов. Однако явления накопления могут также вызвать агрегацию части белков и повлиять на разрешающую способность. Если возникает

агрегация, то следует использовать непрерываемую буферную систему.

Обратите внимание: рН, достигаемый в разрешающем геле в системе Омштейна-Дэвиса имеет значение 9.5, это значение может находиться вне диапазона стабильности для некоторых белков, вызывая их денатурацию. Также, рI анализируемого белка может быть слишком близко или чуть выше рН буфера Омштейна-Дэвиса (9.5), что может привести к очень низкому или положительному заряду, который может существенно уменьшить или даже воспрепятствовать движению к аноду. Альтернативные прерываемые системы могут быть найдены в статье Chrambach и Jovin.3

Обратите внимание: Желательно знать рI анализируемого белка перед выбором буферной системы.

2. Непрерываемые Буферные Системы

Непрерываемые буферные системы становятся востребованными в случаях, когда прерываемые системы не могут использоваться из-за накапливающейся агрегации белков. В непрерываемой системе во внутренней и внешней электродных камерах используется тот же буфер, что и в геле. До тех пор пока не происходит концентрирование, белки перемещаются в полосах, по крайней мере, настолько же широко, насколько по высоте загружен в ячейку образец.

Следовательно, объем образца должен быть минимизирован. Подвижность белков в непрерываемой системе в значительной степени диктуется рН, чем прохождением сквозь полиакриламидный гель. По этой причине, 6%-ый Полиакриламидный Гель рекомендуется в большинстве случаев.

Для очень больших белков, можно использовать 4%-ый или 5%-ый гели. McLellan описывает различные непрерываемые буферные системы для значений рН 3.8-10.2.

Детальные протоколы приведены в Разделе 4.3.

Раздел 4

Подготовка Реактива и Готовые Растворы

4.1 Объемы, требуемые на Гель

Перечисленные ниже объемы должны полностью заполнять кассету. Объемы должны быть скорректированы, в зависимости от комплекта (с/без гребенками, с/без заливки геля, и т.д.).

| Толщина Геля (мм) | Объем (мл) |
|-------------------|------------|
| 0.5 | 2.8 |
| 0.75 | 4.2 |
| 1.0 | 5.6 |
| 1.5 | 8.4 |

Обратите внимание: 10 мл мономерного раствора достаточно для двух гелей любой толщины.

4.2 SDS-PAGE (Laemmli) 1 Буферная Система

Готовые Растворы и Буфера

- Акриламид/Бисакриламид (30 % Т, 2.67 % С)
 - 87.6 г Акриламида (29.2 г/на 100мл)
 - 2.4 г N'N'- бис-метилен-акриламида (0.8 г/ на 100 мл)

Доведите объем до 300 мл, используя деионизированную воду. Профильтруйте раствор и храните его при 4 °С в темноте (максимум 30 дней)

Или используйте:

 - Готовую смесь Акриламида/Бисакриламида в соотношении 37.5:1(30%Т, 2.67 % С) (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0125, 150 г)
 - 30%-ые Растворы Акриламида/ Бисакриламида, в соотношении 37.5:1 (30%Т, 2.67 % С) (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0158, 500 мл)
 - (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0159, 2 x 500 мл)
- 10 % (w/v) SDS

Растворите 10 г SDS в 90 мл воды, аккуратно перемешивая, доведите деионизированной водой объем до 100 мл. В качестве альтернативы может использоваться готовый 10%-ный раствор SDS (250 мл) (номер по каталогу Bio-Rad 161-0416).
- 1.5 М Tris-HCl, pH 8.8
 - 27.23 г Tris основной (18.15 г/ на 100 мл)
 - 80 мл деионизированной воды

Откорректируйте pH до 8.8, используя 6 N HCl. Доведите объем до 150 мл деионизированной водой и храните при 4 °С.

Также может использоваться 1.5 М Tris-HCl, pH 8.8 (1 L) готовый буфер (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0798).
- 0.5 М Tris-HCl, pH 6.8
 - 6 г Tris (осн.)
 - 60 мл деионизированной воды

Откорректируйте pH до 6.8, используя 6 N HCl. Доведите объем до 100 мл деионизированной водой и храните в 4 °C.

В качестве альтернативы может применяться готовый буфер 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (1 L) (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0799).

5. Буфер для образцов (буфер с пониженным содержанием SDS)

3.55 мл деионизированной воды
1.25 мл 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
2.5 мл Глицерин
2.0 мл 10 % (w/v) SDS
0.2 мл 0.5 % (w/v) Бромфенолового синего
9.5 мл Общий Объем

Храните при комнатной температуре.

Применение: Добавьте 50 µl Меркаптоэтанола к 950 µl стандартного буфера до использования. Растворите образец в соотношении не менее 1:2 в стандартном буфере и нагрейте его до 95 °C в течение 4 минут.

6. 10x Электродный Буфер, pH 8.3 (1 L)

30.3 г Tris (осн.)
144.0 г Глицин
10.0 г SDS

Растворите компоненты в деионизированной воде и доведите общий объем буфера до 1 000 мл. Не корректируйте pH ни кислотой, ни основанием. Храните при 4 °C. Если происходит осаждение, подогрейте буфер до комнатной температуры прежде, чем использовать.

В качестве альтернативы может использоваться следующий Электрофорезный буфер (10xСток) Tris/Глицин/ SDS, 5 L (Номер каталога Био-Рад 161-0772).

Применение: Растворите 50 мл 10xСтока в 450 мл деионизированной воды для каждого проведения Электрофореза. Перед использованием полностью перемешайте.

7. 10%-ый APS (обновляйте его ежедневно)

100 мг Персульфата Аммония, растворенного в 1 мл деионизированной воды.

Состав Геля (10 мл)

1. Приготовьте раствор мономера, смешав для этого все реагенты, кроме TEMED и 10%-ого ASP.

Дегазируйте смесь в течение 15 минут.

| Percent Gel | DDI H ₂ O (ml) | 30% Degassed Acrylamide/Bis (ml) | *Gel Buffer (ml) | 10% w/v SDS (ml) |
|-------------|------------------------------|--|---------------------|---------------------|
| 4% | 6.1 | 1.3 | 2.5 | 0.1 |
| 5% | 5.7 | 1.7 | 2.5 | 0.1 |
| 6% | 5.4 | 2.0 | 2.5 | 0.1 |
| 7% | 5.1 | 2.3 | 2.5 | 0.1 |
| 8% | 4.7 | 2.7 | 2.5 | 0.1 |
| 9% | 4.4 | 3.0 | 2.5 | 0.1 |
| 10% | 4.1 | 3.3 | 2.5 | 0.1 |
| 11% | 3.7 | 3.7 | 2.5 | 0.1 |
| 12% | 3.4 | 4.0 | 2.5 | 0.1 |
| 13% | 3.1 | 4.3 | 2.5 | 0.1 |
| 14% | 2.7 | 4.7 | 2.5 | 0.1 |
| 15% | 2.4 | 5.0 | 2.5 | 0.1 |
| 16% | 2.1 | 5.3 | 2.5 | 0.1 |
| 17% | 1.7 | 5.7 | 2.5 | 0.1 |

* Разрешающий Буфер - 1.5 М Tris-HCl, pH 8.8

* Концентрирующий Буфер - 0.5 М Tris-HCl, pH 6.8

2. На 10 мл Раствора мономера добавьте непосредственно перед заливкой геля:

В Разрешающий Гель: 50 μ l 10%-ого APS и 5 μ l TEMED

В Концентрирующий Гель: 50 μ l 10%-ого APS и 10 μ l TEMED
Аккуратно взболтайте, чтобы инициировать полимеризацию.

Обратите внимание: Приготовьте любой необходимый Вам объем Раствора мономера, используя кратную 10 мл пропись. Объемы APS и TEMED должны быть также соответственно откорректированы.

Предупреждение: концентрация катализатора очень важна! Вид неразделившейся полоски и неполное формирование ячейки могут являться результатом неравильной концентрации катализатора.

4.3 Прерываемый Нативный PAGE (Ornstein-Дэвис) 2

Готовые Растворы и Буфера

1. Акриламид/ Бисакриламида (30 % Т, 2.67 % С)

87.6г Акриламида (29.2 г/ на 100 мл)

2.4 г N'N'- Бис-метилден-акриламида (0.8 г/ на 100 мл)

Доведите общий объем до 300 мл, используя для этого деионизированную воду. Профильтруйте готовый буфер и храните его при 4 °C в темноте (максимум 30 дней).

Или используйте

Готовую смесь Акриламида/ Бисакриламида в соотношении 37.5:1 (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0125, 150 г)

30%-ые Растворы Акриламида/ Бисакриламида в соотношении 37.5:1 (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0158, 500 мл)

(номер по каталогу "Био-Рад" 161-0159, 2 x 500 мл)

2. 1.5 М Tris-HCl, pH 8.8

27.23 г Tris (осн.) (18.15 г/ на 100 мл)

80 мл деионизированной воды

Доведите pH до 8.8, используя 6 N HCl. Общий объем должен быть 150 мл, используйте деионизированную воду и храните буфер при 4 °C. В качестве альтернативы может использоваться 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (1 L) готовый буфер (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0798).

3. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

6 г Tris (осн.)

60 мл деионизированной воды

Откорректируйте pH до 6.8 6N HCl. Доведите общий объем буфера до 100 мл деионизированной водой и храните его при 4 °C. Или используйте готовый буфер 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (1 L) (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0799).

4. Стандартный Буфер

5.55 мл деионизированной воды

1.25 мл 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

3.0 мл Глицерина

0.2 мл 0.5 % (w/v) Бромфенолового синего

Общий объем 10.0 мл

Храните при комнатной температуре.

Применение: Растворите образец в стандартном буфере в соотношении не менее 1:2 и подогрейте эту смесь до 95 °C в течение 4 минут.

5. (10xСтоковый) Электродный Буфер, pH 8.3

30.3 г Tris (осн.) (15 г/л)

144.0 г Глицин (72 г/л)

Доведите общий объем деионизированной водой до 1 000 мл. Не корректируйте pH. Или используйте Электрофорезный буфер 10x Tris/Глицин, 1 L (номер каталога Bio-Rad 161-0734).

Применение: Растворите 50 мл (10xСтока) в 450 мл деионизированной воды для каждого выполнения Электрофореза.

Состав Геля (10 мл)

1. Подготовьте раствор мономера, смешав для этого все реактивы, кроме TEMED и 10%-ого ASP.

Дегазируйте смесь в течение 15 минут.

| Percent Gel | DDI H ₂ O (ml) | 30% Degassed Acrylamide/Bis (ml) | *Gel Buffer (ml) |
|-------------|---------------------------|----------------------------------|------------------|
| 4% | 6.2 | 1.3 | 2.5 |
| 5% | 5.8 | 1.7 | 2.5 |
| 6% | 5.5 | 2.0 | 2.5 |
| 7% | 5.2 | 2.3 | 2.5 |
| 8% | 4.8 | 2.7 | 2.5 |
| 9% | 4.5 | 3.0 | 2.5 |
| 10% | 4.2 | 3.3 | 2.5 |

* Разрешающий Буфер - 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

* Концентрирующий Буфер - 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

2. Непосредственно до того, как наливать гель, добавьте 50 мл APS и TEMED (5 µl для Разрешающего Буфера; 10 µl TEMED для концентрирующего Буфера)

Аккуратно взболтайте, чтобы инициировать полимеризацию.

Обратите внимание: Подготовьте любой нужный объем Раствора мономера, используя кратность прописи на 10 мл. Объемы ASP и TEMED должны быть откорректированы соответственно.

4.4 Непрерывный Нативный PAGE

Стоковые Растворы и Буфера

1. Акриламид/ Бисакриламид (30 % T, 2.67 % C)
87.6г Акриламида (29.2 г/на 100 мл)
2.4 г N'N'-Бис-метилена-акриламида (0.8 г/на 100 мл)

Доведите объем до 300 мл, используя деионизированную воду. Профильтруйте буфер и храните его при 4 °C в темноте (максимум 30 дней).

Или используйте

Готовую смесь (номер по каталогу "Био-Рад" 161-0125, 150 g)

30%-ые Растворы Акриламида/ Бисакриламида, в соотношении 37.5:1 ("Био-Рад" номер по каталогу 161-0158, 500 мл)

("Био-Рад" номер по каталогу 161-0159, 2 x 500 мл)

2. Стандартный Буфер
1.0 мл Электрофорезного Буфера
3.0 мл Глицерин
0.2 мл 0.5 % Бромфенолового Синий
5.8 мл Деионизированной воды
10.0мл Общий объем

1. Непрерываемые Буфера (McLellan) 4

McLellan описывает различные Непрерываемые буферные системы от pH 3.8 к pH 10.2. Используйте таблицу ниже, чтобы подготовить (5xСток) непрерывный Электрофорезный буфер, неденатурирующий PAGE. Добавьте оба компонента и кислый, и основной к 1 литру воды. Не корректируйте pH. Если конечное значение pH лежит за рамками диапазона устойчивости белка,

откажитесь от использования данного буфера и переделайте его.

| pH | Basic Component | 5x Solution | Acidic Component | 5x Solution |
|------|-------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 3.8 | Beta-Alanine (89.09 MW) | 13.36 g/l. | Lactic Acid 85% Solution | 7.45 ml/l. |
| 4.4 | Beta-Alanine (89.09 MW) | 35.64 g/l. | Acetic Acid 17.4 M | 11.5 ml/l. |
| 4.8 | GABA (103.1 MW) | 41.24 g/l. | Acetic Acid 17.4 M | 5.75 ml/l. |
| 6.1 | Histidine (155.2 MW) | 23.28 g/l. | MES (195.2 MW) | 29.5 g/l. |
| 6.6 | Histidine (155.2 MW) | 19.4 g/l. | MOPS (209.3 MW) | 31.4 g/l. |
| 7.4 | Imidazole (68.08 MW) | 14.64 g/l. | HEPES (238.33 MW) | 41.7 g/l. |
| 8.1 | Tris (121.14 MW) | 19.38 g/l. | EPPS (252.2 MW) | 37.85 g/l. |
| 8.7 | Tris (121.14 MW) | 30.29 g/l. | Boric Acid (61.83 MW) | 7.73 g/l. |
| 9.4 | Tris (121.14 MW) | 36.34 g/l. | CAPS (221.3 MW) | 44.26 g/l. |
| 10.2 | Ammonia (14.8 M) | 12.5 ml/l. | CAPS (221.3 MW) | 22.13 g/l. |

Растворите 200 мл 5хбуфера в 800 мл деионизированной воды, чтобы приготовить 1х Электрофорезный буфер.

| pH | Basic Component | Acidic Component |
|------|--------------------|-------------------|
| 3.8 | 30 mM Beta-Alanine | 20 mM Lactic Acid |
| 4.4 | 80 mM Beta-Alanine | 40 mM Acetic Acid |
| 4.8 | 80 mM GABA | 20 mM Acetic Acid |
| 6.1 | 30 mM Histidine | 30 mM MES |
| 6.6 | 25 mM Histidine | 30 mM MOPS |
| 7.4 | 43 mM Imidazole | 35 mM HEPES |
| 8.1 | 32 mM Tris | 30 mM EPPS |
| 8.7 | 50 mM Tris | 25 mM Boric Acid |
| 9.4 | 60 mM Tris | 40 mM CAPS |
| 10.2 | 37 mM Ammonia | 20 mM CAPS |

Состав Геля (10 мл)

1. Подготовить раствор мономера, смешав все реактивы, кроме TEMED и 10%-ого ASP.

Дегазируйте смесь в течение 15 минут.

| Percent Gel | DDH ₂ O (ml) | 30% Degassed Acrylamide/Bis (ml) | Continuous Buffer (ml) |
|-------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------|
| 4% | 6.7 | 1.3 | 2.0 |
| 5% | 6.3 | 1.7 | 2.0 |
| 6% | 6.05 | 2.0 | 2.0 |

Обратите внимание: Приготовьте любой требуемый объем Раствор мономера, используя кратную 10 мл пропись.

2. Непосредственно перед тем, как наливать гель, добавьте:

Для 10 мл Растворы мономера:

50 μ l 10%-ого APS

10 μ l TEMED

Осторожно взболтайте, чтобы инициировать полимеризацию.

Обратите внимание: При pH ниже 6, TEMED становится менее эффективным катализатором. Увеличьте концентрацию TEMED, чтобы заполимеризовать гели со значениями pH, располагающимися между 4 и 6.

Раздел 5

Ссылки

1. Laemmli, U. K., *Nature*, **227**, 680 (1970).
2. Ornstein, L. and Davis, B. J., *Anal. NY Acad. Sci.*, **121**, 321 (1964).
3. Chrambach, A. and Jovin, T. M., *Electrophoresis*, **4**, 190-204 (1984).
4. McLellan, T., *Analytical Biochemistry*, **126**, 94-99 (1982).

Раздел 6

Обслуживание

Корпус и крышка Mini-Protean 3 ополосните полностью дистиллированной водой после каждого использования.

Заливочный столик и Заливочную рамку также ополаскивайте полностью дистиллированной водой после каждого использования.

Стеклопластиковые пластинки и гребенки моются лабораторным моющим средством, затем полностью ополаскиваются дистиллированной водой.

Не оставляйте Пластинки со спейсерами в сильно основных Растворах, типа > 100 mM NaOH более, чем на 24 часа. В сульфохромовой кислоте, используемой в качестве чистящего раствора для стекла, не более, чем на 2-3 часа. Длительное замачивание ставит под угрозу целостность камеры

Раздел 7 Руководство по выявлению неисправностей

| | Проблема | Возможная причина | Устранение |
|---|---|--|--|
| 1 | "Эффект улыбки" - копирование полосы, восходящее с двух сторон геля | а. Отцентрируйте буфер нанесения | а. Буфер не достаточно хорошо перемешан. Переделать Буфер, особое внимание на стадии приготовления 5x или 10x стоков. |
| | | б. Чрезмерные мощности | б. Уменьшить настройки мощности с 200 V до 150 V или заполнить нижнюю камеру до вершины Короткой Пластины в пределах 1 см |
| 2 | Вертикальный пронос белка. | а. Перегрузка образцов | а. Растворите образец, отдельно удалите перегруженный образец, удалите преобладающий белок в образце, или уменьшите напряжение примерно до 25 %, чтобы минимизировать эффект. |
| | | б. Осаждение образца | б. Отцентрифугируйте образец перед добавлением SDS или уменьшите %T разрешающего геля * |
| | | | с. Соотношение SDS и белка должно быть таким, чтобы покрывалась каждая молекула белка SDS, обычно оно 1.4:1. Это может требовать большего количества SDS для некоторых мембранных образцы белка. Например, SDS в образце может быть увеличен до 4 % и/или в концентрирующем буфере, увеличен до 0.4 %. |
| 3 | Боковое распределение полосы | а. Диффузия из ячеек до подключения к источнику электропитания | а. Сократите время между непосредственной загрузкой образца и включения источника питания. |
| | | б. Ионная сила образца меньше, чем ионная сила геля | б. Используйте тот же самый буфер для образца, что и в геле. |
| 4 | Искаженные полосы | а. Недостаточная полимеризация вокруг ячейки с образцом | а. Полностью дегазируйте раствор геля нанесения перед Заливкой; Увеличьте концентрацию Персульфата Аммония и TEMED до 25% для геля нанесения или снизьте %T, оставьте ту же концентрацию APS и удвойте концентрацию TEMED. |
| | | б. Соли в образце | б. Удалите соли путем диализа или с помощью опреснительной колонки, Колонок Micro Bio Spin, и т.д. с. Шероховатая поверхность |

| | | | |
|----|--|---|--|
| | | | геля. с. Уменьшите степень полимеризации. Нанесите гель очень аккуратно. |
| 5 | Полоски собираются внизу | а. Ионная сила образца выше, чем в окружающем геле | а. Опресните образец и окружающий гель рядом с ним |
| 6 | Разделение занимает чрезмерно много времени | а. Буфер нанесения слишком концентрированный | а. Проверьте буферный протокол, сократите буфер, сконцентрируйте в случае необходимости |
| | | б. Избыток соли в образце | б. Опресните образец. |
| 7 | Разделение происходит слишком быстро, недостаточное разрешение | а. Буферы нанесения или в Камере слишком разбавленные | а. Проверьте буферный протокол, сконцентрируйте его в случае необходимости. |
| | | б. Напряжение слишком высокое | б. Уменьшите напряжение на 25-50 %. |
| 8 | Наблюдаются дублирующиеся копии там, где ожидалось единичные | а. Часть белка, возможно, была переокислена в процессе разделения или недостаточно восстановлены при подготовке | а. Приготовьте свежий Стандартный буфер, увеличьте концентрацию 2-Меркаптоэтанола, замените DTT на BME |
| 9 | Наблюдается меньше полос, чем ожидалось, одна полоса перегружена | а. Белок (ки) перемещаются во фронте вместе с красителем | а. Увеличьте T% разрешающего геля |
| | | б. Разрушение белка | б. Используйте ингибиторы протеазы, например. PMSF, и т.д. |
| 10 | Протечка верхней буферной камеры | а. Камера переполнена | а. Поддерживайте уровень буфера ниже вершины Пластинки со спейсерами |
| | | б. Неправильная сборка | б. Убедитесь, что электродная прокладка чистая, без порезов и покрыта буфером. Убедитесь также, что Короткая Пластинка находится под меткой на прокладке, не на ее вершине и не придавливается электродной Установкой при закрытии бегунков Рамки. |
| 11 | Утечка в процессе Заливки геля | а. Стеклопластины с отбитыми краями | а. Проследите, чтобы стеклопластины были без повреждений. |
| | | б. Пластинка со спейсерами и Короткая Пластинка | б. Убедитесь, чтобы кассета была выровнена. Пластинка не выравнивается правильно. |
| | | с. Прокладка Заливочного столика протекает | с. Замените прокладку Заливочного столика. |
| 12 | Плохое окончание формирования ячейки | а. Неправильный катализатор | а. Подготовьте свежий раствор катализатора, или увеличьте концентрацию катализатора в геле нанесения 0.06% APS и 0.12 % TEMED. |
| | | б. Раствор мономера дегазирован не полностью. Кислород ингибирует полимеризацию | б. Дегазируйте раствор мономера непосредственно перед Заливкой Концентрирующего геля. |
| 13 | Избыток акриламида за Перегородкой | а. Неправильно подобрана концентрация катализатора | а. Подготовьте свежий раствор катализатора или |

| | | | |
|----|---|-----------------------|---|
| | | | увеличьте концентрацию катализатора в геле концентрирования до 0.06 % APS и 0.12 % TEMED. |
| 14 | Бегунки на Фиксирующей Рамке плохо закрываются или издают неприятный звук | а. Накопление порошка | а. Сполоскивайте или вытирайте порошок с Заливочной Рамки перед каждым использованием |

*Полиакриламидные гели описываются двумя характеристиками:

- 1) Полная концентрация мономера, (%T) и
- 2) Концентрация сшивающего мономера

$$\frac{g \text{ acrylamide} + g \text{ bis-acrylamide}}{\text{Total Volume}} \times 100\%$$

Раздел 8

Информация о Продукте и Аксессуары MINI-PROTEAN 3

| Каталог | Описание Номера |
|----------|---|
| 165-3301 | Mini-Protean 3 Электрофорезная Система , 10 ячеек, 0.75 толщины, полная система включает 2 гребенки, 5 наборов стеклянных пластин, заливочный столик, 2 Заливочных рамки, устройство для загрузки образцов, 2 приспособления для удаления геля, и Электрофорезный Модуль |
| 165-3302 | MINI-PROTEAN 3 Электрофорезный Модуль для применения Готового к Заливке Геля включает Электродную Установку, Заливочную Рамку, Камеру, Крышку с силовыми кабелями, буферную Перегородку, 2 Приспособления для удаления геля |
| 165-3375 | Mini-Protean 3 Комплект для Обновления включает Заливочную Рамку Mini-Protean 3 и Электродное Устройство |
| 165-3314 | MINI-PROTEAN 3Cell/PowerPac 300 , 100/120 V |
| 165-3315 | MINI-PROTEAN 3Cell/PowerPac 300 , 220/240 V |
| 165-3316 | MINI-PROTEAN 3Cell/PowerPac Junior , 100-240 V |
| 165-3317 | MINI-PROTEAN 3 Ячейки и Mini Trans-Blot® модуль |

Заливочный модуль

Каждый Заливочный модуль включает 2 гребенки, 5 наборов стеклянных пластин, Заливочный Столик, 2 рамки для Заливки, и соответствующее Приспособление для загрузки образцов.

| | Спейсер, 0.5 мм | Спейсер, 0.75 мм | Спейсер, 1.0 мм | Спейсер, 1.5 мм |
|------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 5-луночная гребенка | NA | 165-3327 | 165-3332 | 165-3338 |
| 9-луночная гребенка | NA | 165-3328 | 165-3333 | 165-3339 |
| 10-луночная гребенка | 165-3325 | 165-3329 | 165-3334 | 165-3340 |
| 15-луночная гребенка | 165-3326 | 165-3330 | 165-3335 | 165-3341 |
| Подготовительная/2D гребенка | NA | 165-3331 | 165-3336 | 165-3342 |
| IPG гребенка | NA | NA | 165-3337 | 165-3343 |

| Каталог | Описание Номера |
|---------|-----------------|
|---------|-----------------|

Ручные Вспомогательные приспособления для Заливки Геля и Сменные части

| | |
|----------|-------------------------------------|
| 165-3303 | MINI-PROTEAN 3 Заливочный столик, 1 |
|----------|-------------------------------------|

| | |
|----------|--|
| 165-3304 | MINI-PROTEAN 3 Заливочная Рамка , 1 |
| 165-3305 | MINI-PROTEAN 3 Прокладки для Заливочного столика (замена), 2 |
| 165-3308 | MINI-PROTEAN 3 Короткие Пластины, 5 |
| 165-3309 | MINI-PROTEAN 3 Пластинка со спейсерами на 0.5 мм, 5 |
| 165-3310 | MINI-PROTEAN 3 Пластинка со спейсерами на 0.75 мм, 5 |
| 165-3311 | MINI-PROTEAN 3 Пластинка со спейсерами на 1.0 мм, 5 |
| 165-3312 | MINI-PROTEAN 3 Пластинка со спейсерами на 1.5 мм, 5 |

Каталог Описание Номера

Другие Сменные части

| | |
|-------------|--|
| 165-3306 | MINI-PROTEAN 3 Заливочная рамка, 1 |
| 165-3307 | MINI-PROTEAN 3 Электродное устройство , 1 |
| 165-3201 | Приспособление для загрузки образца, 9-луночное (цвет красный), 1 |
| 165-3146 | Приспособление для загрузки образца, 10-луночное (цвет желтый), 1 |
| 165-3203 | Приспособление для загрузки образца, 12-луночное (цвет зеленый), 1 |
| 165-3132 | Приспособление для загрузки образца, 15-луночное (цвет синий), 1 |
| 165-3130 | Перегородка, 2 |
| 165-3320 | MINI-PROTEAN 3 Приспособление для удаления геля, 5 |
| 165-3149 | Замена Прокладки для Электродного устройства, 2 |
| 165-3157 | Прокладки, для готовых карбогидратных гелей, 2 |
| 161-0990 | Пустая Кассета, Готовый Гель на 1.0 мм, 10 |
| 165-2975 | Буферная Камера и Крышка, замена |
| 165-2948 | Замена Силовых кабелей |
| 165-2949 | Крышка Ячейки с Силовыми кабелями |
| 900-7680-8 | Замены Платиновых Проводов, катод, 8 дюймов |
| 900-7680-13 | Замены Платиновых Проводов, анод, 13 дюймов |

Гребенки

| | Спейсер, 0.5 мм | Спейсер, 0.75 мм | Спейсер, 1.0 мм | Спейсер, 1.5 мм |
|------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 5-луночная гребенка | NA | 165-3352 | 165-3357 | 165-3363 |
| 9-луночная гребенка | NA | 165-3353 | 165-3358 | 165-3364 |
| 10-луночная гребенка | 165-3350 | 165-3354 | 165-3359 | 165-3365 |
| 15-луночная гребенка | 165-3351 | 165-3355 | 165-3360 | 165-3366 |
| Подготовительная/2D гребенка | NA | 165-3356 | 165-3361 | 165-3367 |
| IPG гребенка | NA | NA | 165-3362 | 165-3368 |