

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA IPG *BlueStrips*

(Kat.-Nr. 43001.01, 43002.01, 43003.01, 43004.01, 43005.01, 43011.01, 43012.01, 43013.01, 43014.01, 43015.01, 43021.01, 43022.01, 43023.01, 43024.01, 43025.01)



SERVA Electrophoresis GmbH • Carl-Benz-Str. 7 • D-69115 Heidelberg

Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010

e-mail: info@serva.de • <http://www.serva.de>

Inhaltsverzeichnis

1. SERVA IPG <i>BlueStrips</i>	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lieferumfang	2
1.3. Lagerbedingungen	2
2. Rehydratisierung der IPG <i>BlueStrips</i>	2
2.1. Rehydratisierungs-/Probenpuffer	2
2.2. Durchführung der Rehydratisierung	3
3. Probenauftrag	4
4. Probenkonzentration	4
5. Fokussierung der IPG <i>BlueStrips</i>	5
5.1. Vorbereitung zur Fokussierung in einer IEF-Flachbett-Kammer	5
5.2. Fokussierungsbedingungen	5
6. Reagenzien und Geräte für die 1D/2D-Gelelektrophorese	8
7. Literatur	8

1. SERVA IPG *BlueStrips*

1.1. Allgemeine Hinweise

Die SERVA IPG *BlueStrips* finden Anwendung in der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese und garantieren einen stabilen, reproduzierbaren Gradienten für die Isoelektrische Fokussierung.

Die homogene Acrylamidmatrix mit immobilisiertem pH-Gradienten ist an die Trägerfolie GEL-FIX™ kovalent gebunden. Dies stabilisiert das Gel mechanisch und erleichtert die Handhabung. Zusätzlich schützt eine nichtbindende Abdeckfolie (GEL-FIX for Covers™) das Gel vor Beschädigungen und Verunreinigungen.

SERVA IPG *BlueStrips* sind dehydratisiert und müssen vor der Verwendung mit einem speziellen IEF 2D-Probenpuffer rehydratisiert werden.

Der jeweilige pH -Gradient ist auf den Streifen gedruckt. Die Anodenseite ist mit einem „+“ markiert, die Kathodenseite ist leicht blau gefärbt, dies dient als zusätzliche Orientierungshilfe. Es handelt sich um geringe Mengen des Farbstoffes Bromphenolblau, der während der Fokussierung Richtung Anode wandert und somit den Fortgang der Elektrophorese veranschaulicht.

Jeder Gelstreifen ist mit einer eigenen Lotnummer versehen und damit geeignet für die Dokumentation gemäß GMP/GLP.

Alle Streifen einer Packung sind aus einem Gel hergestellt und garantieren höchste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

1.2. Lieferumfang

Packungsgröße:	12 Gelstreifen SERVA IPG <i>BlueStrips</i>
Gelgröße:	Länge 70 mm, 180 mm, 240 mm Breite 3 mm, Geldicke 0,5 mm
pH-Gradienten:	3-10 ; 3-10 NL* ; 4-7, 6-10, 3-6

* NL = nicht-linear, d.h. im Bereich pH 5-7 zeigt der Gradient ein Plateau mit erhöhter Trennleistung

1.3. Lagerbedingungen

Die empfohlene Lagertemperatur der IPG *BlueStrips* ist - 20 °C. Bei Lagerung bei der empfohlenen Temperatur mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. Rehydratisierung der IPG *BlueStrips*

2.1. Rehydratisierungs- / Probenpuffer

Die optimale Pufferzusammensetzung ist abhängig von der eingesetzten Probe. In Tabelle 1 ist ein für viele Proben geeigneter Puffer angegeben. Als Hilfestellung zur Optimierung schwieriger Proben ist ein Konzentrationsbereich für alle Pufferkomponenten angegeben. Die Streifen werden entweder in einer speziellen Rehydrationskammer (Kat.-Nr. 43091) oder direkt in den IEF-Systemen für die 1D-Elektrophorese der verschiedenen Hersteller rehydratisiert. Hierzu folgen Sie bitte den Anleitungen der Hersteller.

Tabelle 1:

Komponenten	Kat.-Nr.	Konzentrationsbereich	Mengen
Harnstoff *	24524	8 M (8 - 9 M)	4,8 g
CHAPS	17038	1 % (1 – 4 %)	100 mg
DTT	20710	13 mM (13 -100 mM)	20 mg
Servalyt pH** 3-10 (40 %ig)	42940 42948 42913 42944	0,5 % (0,25 – 2 %) (absolute Konz.)	125 µl
Wasser dest.			ad 10 ml

* kann zu 25 % durch Thioharnstoff ersetzt werden

** passend zum pH-Bereich des IPG *BlueStrips*

Hinweis: der Probenpuffer kann in 2,5 ml Portionen bei –20 °C ca. 3 Monate aufbewahrt werden.

2.2. Durchführung der Rehydratisierung

Die Menge an Rehydratisierungspuffer richtet sich nach der Länge der IPG-Streifen:

Streifenlänge (mm)	Volumen/Streifen [µl]
70	130
180	340
240	450

- Die entsprechende Menge 1D Probenpuffer entlang der Kante, etwa in der Länge des Streifens, in die einzelnen Vertiefungen der Rehydrationskammer pipettieren .
- Die flexible Schutzfolie vom Gelstreifen entfernen.

- Den Streifen mit der Gelseite nach unten (Beschriftung lesbar) an einer Seite in den Puffer eintauchen und diesen **luftblasenfrei** über die gesamte Länge des Streifens verteilen, so dass das Gel gleichmäßig benetzt wird. **Der Streifen sollte locker auf der Flüssigkeit liegen und nicht am Boden der Vertiefung anhaften.**
- Wenn der Puffer vom Gelstreifen restlos aufgesogen ist (nach ca. 5-10 Min.), wird mit 1 – 2 ml Siliconöl (SERVA Kat.-Nr. 35132) überschichtet, um die Austrocknung des Streifens zu verhindern.
- Abhängig von der Probe und Pufferzusammensetzung sollte mindestens für 6 Stunden (besser über Nacht) bei Raumtemperatur rehydratisiert werden.

3. Probenauftrag

Es gibt zwei Methoden, die Probe auf den Gelstreifen aufzutragen.

Über die Wahl der Methode entscheiden verschiedene Faktoren, wie z.B. Probenkonzentration, Probeneigenschaften, Streifenlänge, pH-Gradient und das verwendete Nachweissystem (z.B. CoomassieTM-, Silberfärbung).

- **Sample in-gel – Rehydratisierung:**
Probe wird im Rehydratisierungspuffer gelöst und der Gelstreifen darin inkubiert.
- **Cup-loading:**
Streifen wird ohne Probe rehydratisiert und die Probe vor der IEF mit Hilfe eines Silikon-Slots o.ä. auf den Gelstreifen aufgetragen. Der Applikationsort ist abhängig von Gradient und Probe.

4. Probenkonzentration

Die aufzutragende Probenmenge muss für jede Probe individuell optimiert werden. Sie variiert je nach Streifenlänge, Gradient und Auftragsmethode sowie nach dem verwendeten Nachweissystem. Für Silberfärbung oder Färbung mit SYPRO Ruby werden geringere Proteinmengen benötigt als für die Färbung mit Coomassie Blue.

Um eine hohe Auflösung zu erreichen, ist eine Überladung mit der Probe zu vermeiden. Nur in Einzelfällen ist eine Überladung zu erwägen, z.B. um Proteine, die nur in geringer Konzentration vorhanden sind, wiederzufinden.

Richtwerte zur Beladung der verschiedenen Streifenlängen:

IPG Blue Strip –	7 cm Länge: 5 - 100 µg Gesamtprotein
IPG Blue Strip –	18 cm Länge: 50 - 300 µg Gesamtprotein
IPG Blue Strip –	24 cm Länge: 80 - 700 µg Gesamtprotein

Hinweis: Harnstoffhaltige Proben sollten nicht über 30 °C erwärmt werden, um Veränderungen der pls zu vermeiden (pI-Shift durch Carbamylierungen).

5. Fokussierung der IPG *BlueStrips*

5.1. Vorbereitung zur Fokussierung in einer IEF-Flachbett-Kammer

- Kühler auf 20 °C temperieren.
- Die Gelstreifen werden aus der Rehydrationskammer entnommen und parallel, mit der **Gelseite nach oben**, in Abständen von ein bis zwei Millimetern auf die mit Silikonöl benetzte Kühlplatte der IEF-Flachbettkammer gelegt.
- Das mit **+** gekennzeichnete Ende des Streifens wird zur **Anode** ausgerichtet, das **blau gefärbte** Ende zur **Kathode**.
- Zwei Elektrodendochte werden mit dest. Wasser leicht angefeuchtet und an beiden Gel-Enden angelegt.
- Um das Austrocknen der Streifen während der langen Fokussierzeit zu verhindern, gibt man etwas Wasser oder mit Wasser getränkten Zellstoff in die IEF-Kammer (verhindert das Auskristallisieren des Harnstoffs)
- Die Elektroden werden fest auf die Elektrodendochte gedrückt (wenn nötig mit Glasplatten beschwert), die Kammer verschlossen und die Fokussierung gestartet.

Hinweis:

Bei langen Fokussierungszeiten (>8 Std.) und/oder basischen Gradienten ist die oben beschriebene Methode weniger geeignet. Hier ist es ratsam, die Fokussierung unter Öl durchzuführen, um alle störenden Einflüsse wie z.B. CO₂, hohe Luftfeuchtigkeit etc. weitgehend auszuschalten und um die Austrocknung der Streifen zu verhindern. In diesem Fall müssen die IPG-Streifen mit Hilfe eines speziellen Einsatzes auf der Kammer positioniert werden.

5.2. Fokussierungsbedingungen

Die Fokussierungsbedingungen variieren je nach verwendeter Streifenlänge, Gradient, Probenmaterial und vorhandener Geräteausrüstung.

Folgen Sie den Angaben in den zugehörigen Bedienungsanleitungen, sofern Sie spezielle 1D-Elektrophorese-Systeme anderer Hersteller einsetzen. Die folgenden Elektrophorese-Bedingungen sind als Richtlinie zu verstehen bei Einsatz von herkömmlichen IEF-Flachbett-Kammern, wie z.B. der SERVA BlueHorizon™, in Kombination mit Netzgeräten, die mit einer maximalen Spannung von 3000 V betrieben werden, wie z.B. SERVA Blue Power 3000. Für IPG *BlueStrips* von 24 cm Länge wird ein Netzgerät mit einer maximalen Spannung von 6000 V benötigt.

Fokussierungsprogramm für IPG *BlueStrips* – 7 cm Länge

Programmstufe	Spannung [V]	Dauer [h]	Dauer [Vh]
1	150	0,5	75
2	300	0,5	150
3	600	0,5	300
4	1500	1,5	2250
5	3000	2 – 2,5	6000-7500
6 Sicherheitsstufe	300		
gesamt		5 – 5,5	8700-10200

Stromstärke auf 0,025 mA/Streifen, Leistung auf 0,1 W/Streifen limitieren.

IPG *BlueStrips* pH 3-10 / 3-10 NL: Fokussierung bis 8,7 kWh (5 h)

IPG *BlueStrips* pH 4-7/3-6/6-10: Fokussierung bis 10,2 kWh (5,5 h)

Fokussierungsprogramm für IPG *BlueStrips* – 18 cm Länge

Programmstufe	Spannung [V]	Dauer [h]	Dauer [Vh]
1	150	1	150
2	300	1	300
3	600	1	600
4	1500	1	1500
5	3000	12,5-19	37500-57500
6 Sicherheitsstufe	300		
gesamt		16,5-23	40000-60000

Stromstärke auf 0,05 mA/Streifen, Leistung auf 0,2 W/Streifen limitieren.

IPG *BlueStrips* pH 3-10 / 3-10 NL: Fokussierung bis 40 kWh (16,5 h)

IPG *BlueStrips* pH 4-7/3-6/6-10 : Fokussierung bis 60 kWh (23 h)

Alternativ:

Programmstufe	Spannung [V]	Dauer [h]	Dauer [Vh]
1	300	0,25	75
2	600	0,25	150
3	1500	0,25	375
4	3000	0,5	1500
5	6000 (!)	5 - 7	30000-42000
6 Sicherheitsstufe	300		
gesamt		6,25 – 8,25	~ 32100-44100

Stromstärke auf 0,05 mA/Streifen, Leistung auf 0,2 W/Streifen limitieren.

IPG *BlueStrips* pH 3-10 / 3-10 NL: Fokussierung bis 32 kWh (6,25 h)

IPG *BlueStrips* pH 4-7/3-6/6-10 : Fokussierung bis 44 kWh (8,25 h)

Fokussierungsprogramm für IPG *BlueStrips* – 24 cm Länge

Programmstufe	Spannung [V]	Dauer [h]	Dauer [Vh]
1	300	0,5	150
2	600	0,5	300
3	1500	0,5	750
4	3000	16 (über Nacht!)	48000
5	6000 (!)	2 - 5	12000-30000
6 Sicherheitsstufe	300		
gesamt		19,5-22,5	61200-79200

Stromstärke auf 0,1 mA/Streifen, Leistung auf 0,3 W/Streifen limitieren.

IPG *BlueStrips* pH 3-10 / 3-10 NL: Fokussierung bis 60 kVh (19,5 h)

IPG *BlueStrips* pH 4-7/3-6/6-10 : Fokussierung bis 80 kVh (22,5 h)

Hinweis:

Bei nicht programmierbaren Stromgebern limitiert man Stromstärke und Leistung auf den oben angegebenen Wert und stellt die Spannung auf den Maximal-Wert ein. Der Endpunkt der Fokussierung wird über das Volt-Stunden-Produkt festgelegt, so dass die Proben immer ausreichend fokussiert werden.

Die Fokussierungszeiten können variieren, da die vorgegebene Spannung im Programm nicht immer sofort erreicht wird.

Über Nacht sollte mit maximal 3000 V fokussiert werden. Fokussierungen mit höherer Spannung sollten nur tagsüber unter ständiger Beobachtung durchgeführt werden. Sollten die IPG Streifen nach der Elektrophorese zu Kontrollzwecken angefärbt werden, müssen diese vor dem Färbeschritt in **20 % Trichloressigsäure** für 20 Min. fixiert werden.

6. Reagenzien und Geräte für die 1D/2D-Gelelektrophorese

Produkt	Kat.-Nr.
Silicone DC 200 Fluid 10 CST	35132
Urea	24524
Dithiothreitol (DTT)	20710
CHAPS	17038
SERVALYT™ pH 3-10	42940
SERVALYT™ pH 4-7	42948
SERVALYT™ pH 6-9	42913
SERVALYT™ pH 3-6	42944
SERVA Proteome Markers	39220
Trichloroacetic acid, 20 % solution	36913
Triton X-100	39795
Glycerol from plant	23176
SDS solution, 20%	39575
Bromphenol Blue Na-salt	15375
Iodoacetamide	26710
Acrylamid/Bis-Solution 37.5:1 (40 % w/v; 2.6 % C)	10681
TEMED	35925
Ammonium persulfat	13375
Laemmli Buffer 10X for SDS PAGE	42556
Rehydration tray for IPG <i>BlueStrips</i>	43091
BlueHorizon™ Super Cool Flatbed System	BH-2C
BluePower™ 3000 Power Supply	BP-3000
Circulatory Refrigerator Bath WK 230	WK230

7. Literatur

- 1) The Current State of Two-dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients, Görg, C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, W. Weiss, *Electrophoresis* 2000 Apr;21(6):1037-53
- 2) Altland, K., *Electrophoresis* 1986, **7**, 251-259; *Electrophoresis* 1990, **11**, 140-147
- 3) Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Weiss, W., *Electrophoresis* 1998, **19**, 1516-1519