

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA Ge™ SDS PAGE Starter Kit Precast Vertical Gels for Electrophoresis

(Kat.-Nr./Cat. No. 43200.01)

SERVA
Electrophoresis

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>

Inhaltsübersicht

1. SERVAGe™ SDS PAGE Starter Kit	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Kitkomponenten	2
1.3. Zusammensetzung der Gele	3
1.4. Lagerbedingungen	4
2. Handhabung der Gelkassetten/Durchführung der Elektrophorese	4
3. Elektrophorese Protokoll	5
3.1. Trennbereich der Gele	5
3.2. Herstellen der Laufpuffer	5
3.3. Probenvorbereitung	5
3.3.1. Empfohlene Probenmenge	6
3.3.2. Gebrauchsanleitung SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker	9
3.4. Elektrophoresebedingungen	7
4. Färbeprotokolle	8
4.1. Färbung mit SERVA Blau R	8
4.1.1. Reagenzien und Lösungen (nicht im Kit enthalten)	8
4.1.2. Durchführung	9
5. Problemlösungen	9
6. Appendix	10
7. Bestellinformationen	11

Ver. 01/07

1. SERVAGe™ SDS PAGE Starter Kit

1.1. Allgemeine Hinweise

Der SERVAGe™ SDS PAGE Starter Kit enthält neben gebrauchsfertigen Tris/Glycin-Gelen alle Reagenzien, die Sie zum Durchführen einer SDS PAGE benötigen. Die enthaltenen SERVAGe™ TG Gele sind gebrauchsfertige Tris/Glycin-Gele für die vertikale Gelelektrophorese und sind für die diskontinuierliche Trennung nach Laemmli (Nature 277, 680 [1970]) geeignet. Die Gele enthalten kein SDS und können daher auch mit anderen (z.B. nativen) Puffern verwendet werden. SERVA bietet homogene und Gradientengele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (T) an.

Vorteile der Gele für den Anwender:

- einfache und schnelle Handhabung
- hohe Auflösung, scharfe Banden, beste Reproduzierbarkeit
- hergestellt mit Chemikalien höchster Qualität
- Gel gegossen in Plastikkassette, unzerbrechlich, sicher versiegelt gegen Auslaufen
- lange Trennstrecke, mit cm-Skala auf Kassette, erleichtert reproduzierbare Läufe
- Kennzeichnung von Anode und Kathode für eine eindeutige Zuordnung
- Werkzeug zum einfachen, sicheren Öffnen der Kassette nach dem Lauf
- passend für viele gängige Elektrophoresekammern (z. B. SERVA BlueVertical 102, Hoefer Mighty Small™ SE 260, Hoefer miniVE™, NOVEX XCell II®, etc.)

Die Fertiggele werden nach eigenem Verfahren der SERVA Electrophoresis GmbH hergestellt und unterliegen einer strikten Qualitätskontrolle. Jeder Produktionscharge wird eine eigene Lot-Nummer zugewiesen. Sollten einmal Fragen auftreten, bitten wir Sie, diese Lot-Nummer zusammen mit der Katalog-Nummer anzugeben.

1.2. Kitkomponenten

SERVAGe™ Tris/Glycin-Gele (Kat.-Nr. wählbar)	4 Stück
Schlüssel zum Öffnen der Kassetten	1 Stück
10x Laemmli Running Buffer (Kat.-Nr. 42556)	400 ml
2x Tris/Glycine-SDS Sample Buffer (Kat.-Nr. 42527)	1 ml
Dithiothreitol (DTT, Kat.-Nr. 20710)	310 mg (für 1ml H ₂ O)
SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker (Kat.-Nr. 39215)	50 µl

Jedes Gel ist einzeln in einem Aluthenbeutel verpackt. Es ist durch eine mit Gelpuffer benetzte Lage Filterpapier gegen Austrocknung geschützt.

Kassette:

Außenmaß	10 cm x 10 cm
Anzahl der Probenaschen	12
Taschenvolumen	35 µl

Gel:

Material	Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid
Maße Trenngel	Länge 7 cm x Breite 8 cm
Schichtdicke	1 mm

Hinweis:

Die für die anschließende Färbung der Gele benötigten Reagenzien sind nicht im Kit enthalten und müssen separat erworben werden.

Ein ausführliches Western Blotting-Protokoll für die SERVAGe™ TG Gele ist auf Anforderung erhältlich:

Tel. 06221/1384044 oder per E-mail: tech.service@serva.de

1.3. Zusammensetzung der Gele

SERVAGe™ TG Gele werden als homogene oder Gradientengele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (T) angeboten. Die Gele enthalten **kein SDS**. Durch die Wahl des entsprechenden Elektrophoresepuffers wird bestimmt, ob native oder denaturierende Bedingungen herrschen. Die Trennbereiche der Gele für denaturierte Proteine sind der Tabelle 3.1. (Seite 8) zu entnehmen.

Acrylamid-Konzentration (T): 8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 %, 4 – 12 %, 8 – 16 %, 4 – 20 %

Quervernetzer-Konz. (C): 2,6 %

Sammelgel: 4 % T, 2,6 % C

Gelpuffer:

Sammelgel 125 mM Tris/HCl, pH 6,8

Trenngel 375 mM Tris/HCl, pH 8,8

1.4. Lagerbedingungen

Kitkomponente	Lagertemperatur
10x Laemmli Running Buffer	+15 °C - +30 °C
SERVA ^{Ge} /™ TG Gele	2 – 8 °C
2x Tris/Glycine-SDS Sample Buffer	2 – 8 °C
Dithiothreitol (DTT)	2 – 8 °C
SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker	-15 °C – 25 °C

Frieren Sie die Gele **nicht** ein und/oder setzen Sie sie **nicht längere Zeit** der **Raumtemperatur** aus. Dies kann den Trenneigenschaften der Gele schaden. Bei Lagerung bei der empfohlenen Temperatur mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

Lagern Sie den SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker 6.5 – 200 kDa, Liquid Mix bitte bei –20 °C. Der Marker kann kurzfristig (wenige Tage) bei 4 °C aufbewahrt werden. Um häufiges Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, sollten eventuell Aliquots eingefroren werden.

2. Handhabung der Gelkassetten/Durchführung der Elektrophorese

Sicherheitshinweis:

Tragen Sie aus Sicherheitsgründen grundsätzlich geeignete Schutzhandschuhe und -kleidung, wenn Sie mit den Gelen und den dazugehörigen Lösungen arbeiten.

1. Gele der Kartonverpackung entnehmen. Gele, die nicht gleich verwendet werden, sofort wieder bei 2 – 8 °C lagern. Aluthenbeutel mit einer Schere an der Oberseite aufschneiden, Gel entnehmen.
2. Gele so in die Elektrophoresekammer einsetzen oder einspannen, dass die ausgeschnittene Seite der Kassette dem Kathodenpuffertank zugewandt ist. Detaillierte Anweisungen sind der Bedienungsanleitung der Elektrophoresekammer zu entnehmen.
3. Elektrophoresepuffer einfüllen, Kamm gleichmäßig aus dem Gel ziehen, mögliche Gelreste oberhalb der Probetaschen entfernen, Geltaschen gut ausspülen, dabei Luftblasen vermeiden bzw. entfernen.
4. Proben auftragen, Geltaschen ohne Proben mit Probenpuffer (1x) beladen.
5. Elektrophoresekammer schließen und mit der Spannungsquelle verbinden. Spannungsquelle einschalten und Elektrophorese starten. Bedingungen: siehe Abschnitt 3.

6. Nach Beendigung der Elektrophorese Spannungsquelle ausschalten, Verbindung zur Elektrophoresekammer unterbrechen, Elektrophoresepuffer entfernen und Kassette entnehmen.
7. Zum Öffnen der Kassette diese senkrecht halten, am besten auf dem Tisch mit der Unterkante aufsetzen. Den beigefügten Schlüssel zum Öffnen mit der mit einem Pfeil gekennzeichneten Ecke des Schlüssels in die rechte obere Führungsschiene der Kassette (Pfeilkennzeichnung) einsetzen und mit einem kurzen Schlag von oben auf den Schlüssel die Kassette aufbrechen. Kassette wenden und Gegenseite wie beschrieben öffnen.
8. Zur Entnahme des Gels Platten vorsichtig lösen, so dass das Gel auf einer der Platten verbleibt.
Das Gel kann nun zur Färbung oder zum Blotten eingesetzt werden.

Die für die anschließende Färbung der Gele benötigten Reagenzien sind nicht im Kit enthalten und müssen separat erworben werden.

Ein ausführliches Western Blotting-Protokoll für die SERVAGe™ TG Gele ist auf Anforderung erhältlich:

Tel. 06221/1384044 oder per E-mail: tech.service@serva.de

3. Elektrophorese-Protokolle

3.1. Trennbereich der Gele

Acrylamidkonzentration (%)	Trennbereich (Mr 10 ³)
8	40 - 250
10	30 - 200
12	20 - 200
14	10 - 100
16	5 - 70
4 - 12	30 - 300
8 - 16	20 - 250
4 - 20	6 - 200

3.2. Herstellen der Laufpuffer

Verdünnen Sie den **10x Laemmli Running Buffer** 1:10 (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 13), der pH-Wert liegt bei 8.8.

3.3. Probenvorbereitung

Der **2x Tris/Glycine-SDS Sample Buffer** (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 13) enthält **kein Reduktionsreagenz**. Sie können durch **Zusatz von 10 mM DTT** bestimmen, ob **reduzierende Bedingungen** herrschen (Konzentration bezieht sich auf den 1x Probenpuffer). Da die Reduktionsreagenzien mit der Zeit oxidieren, sollte dieser Puffer immer **frisch** angesetzt werden.

- **Ansetzen der 2 M DTT-Stocklösung:**
Lösen Sie den Inhalt des DTT-Gefäßes (310 mg) in 1 ml Wasser, deion. Die Stocklösung sollte bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Geben Sie **10 µl der 2 M DTT Stocklösung** zu 1 ml 2x Tris/Glycine-SDS Sample Buffer.
- Mischen Sie Ihre Probe mit dem gleichen Volumen 2x Tris/Glycine-SDS Sample Buffer. Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 35 µl.
- Erhitzen Sie die Proben für 5 Minuten auf 95 °C ; bei Fluoreszenz-markierten Proben für 5 Minuten bei 65 °C erhitzen.
- Spülen Sie die Taschen mit Laufpuffer.
- Tragen Sie die Proben auf und starten Sie die Elektrophorese.

3.3.1. Empfohlene Probenmenge

Menge/Bande	Färbemethode	SERVA Produkt
0,1 - 0,5 µg Protein	SERVA Blau, Coomassie [®] Brilliant Blue	<i>Densi</i> Stain BlueG Soln., SERVA BlueR Staining Kit
10 - 50 ng Protein	Silberfärbung	Silver Staining Kit SDS PAGE

3.3.2. Gebrauchsanleitung SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker

Der SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker ist ein gebrauchsfertiger Proteinmarker für den Einsatz in der SDS PAGE. Er enthält 8 Standardproteine von 6,5 kDa bis 200 kDa in Tris/Glycin-SDS Sample Buffer (mit 10 mM DTT).

- Erwärmen Sie die Proteinmarker-Lösung auf Raumtemperatur, um ausgefallenes SDS wieder in Lösung zu bringen.
Wichtig: Marker **nicht aufkochen**, nur kurz im Wasserbad erwärmen.
Der Protein Marker ist vorreduziert und acyliert. Eventuell auftretende Aggregate (an der Trenngelgrenze) können durch Erwärmen auf 80 °C /Temperatur nicht überschreiten!) für 2-5 min aufgelöst werden.
- Bei **Färbung** des Gels mit **Coomassie™**, **SERVA Blau G** oder **SERVA Blau R** tragen Sie **5 µl** des Proteinstandards pro Tasche auf das Gel auf.
- Für die **Silberfärbung** wird der Proteinmarker **1:5** in 1x Tris/Glycin-SDS PAGE Sample Buffer **verdünnt** und dann **5 µl** pro Tasche aufgetragen.

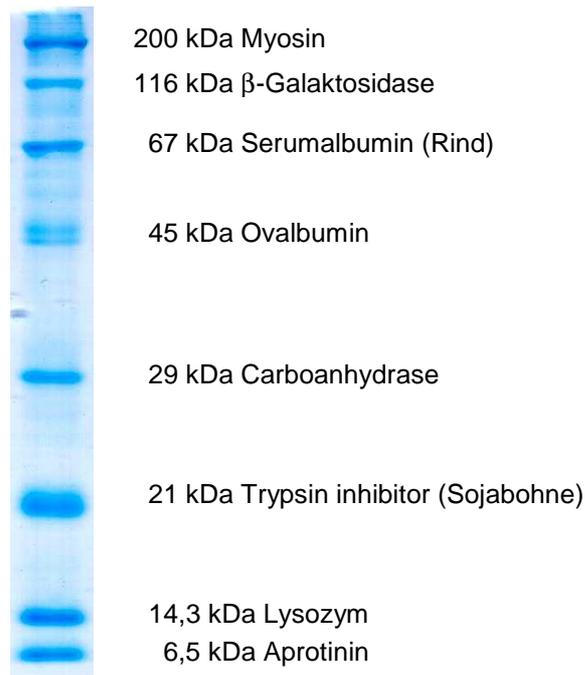


Abbildung 1: Auftrennung von 5 μ l des **SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker** auf einem 12%igen SDS-PAA-Gel.

3.4. Elektrophoresebedingungen

Die Elektrophorese wird unter folgenden Bedingungen betrieben:

Wir empfehlen den **Lauf bei konstantem Strom**:

Zu Beginn Proben für 10 Minuten bei 10 mA/Gel einwandern lassen.

Danach wird **für homogene Gele** eine limitierende Stromstärke von **20 mA/Gel** und für **Gradientengele** eine von **25 mA/Gel** eingestellt.

Die **Spannung** wird dabei während des Laufes **von anfangs ca. 60 V auf ca. 250 V** ansteigen.

Dauer: 70 - 90 Min., (höherprozentige und Gradientengele benötigen ca. 90 Min.)

Alternativ können die Gele aber auch bei einer **konstanten Spannung von 150 V** betrieben werden. Die **Stromstärke** sinkt während des Laufs **von anfangs 20 - 25 mA auf ca. 10 mA**.

Dauer: ca. 90 Min., (höherprozentige und Gradientengele benötigen eine entsprechend längere Laufzeit)

4. Färbeprotokolle

Sicherheitshinweis:

Tragen Sie aus Sicherheitsgründen grundsätzlich geeignete Schutzhandschuhe und -kleidung, wenn Sie mit Fixier- und Färbelösungen arbeiten.

Für beste Ergebnisse verwenden Sie die bedienerfreundlichen Färbekits von SERVA wie SERVA *DensiStain* Blue G Staining Solution (Kat.-Nr. 35078.01), SERVA Blue R Staining Kit (Kat.-Nr. 42531.01) oder den SERVA Silver Staining Kit SDS PAGE (Kat.-Nr. 35076.01) bzw. für native Gele den SERVA Silver Staining Kit Native PAGE (Kat.-Nr. 35077.01).

Sie können auch andere Färbemethoden wie z. B. das in Abschnitt 4.1. beschriebene Färbeprotokoll einsetzen:

4.1. Färbung mit SERVA Blau R

4.1.1. Reagenzien und Lösungen

Stammlösung 1	0,2 % SERVA Blau R (Kat.-Nr. 35051) in 90 % (v/v) Ethanol (Kat.-Nr. 11093) (100 mg SERVA Blau R in 50 ml Ethanol lösen)
Stammlösung 2	20 % (v/v) Essigsäure
Entfärber	20 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure, 1 % (w/v) Glycerin (Kat.-Nr. 23176)
Konservierungslsg.	30 % (v/v) Ethanol, 5 % (w/v) Glycerin

4.1.2. Durchführung

Führen Sie alle Fixierungen und Färbungen auf einem Schüttler bei mäßiger Umdrehungszahl (50 Umdrehungen pro Min.) durch. Die angegebenen Zeiten gelten für die Inkubation bei Raumtemperatur. Kürzere Färbe- und Entfärbezeiten können durch Erhöhung der Temperatur erreicht werden.

Fixierung/Färbung	Fixierung und Färbung erfolgen in einem Schritt. Stammlösungen 1 und 2 werden zu gleichen Teilen gemischt und das Gel 30 Min. und länger darin inkubiert. (Die Färbelösung kann 2 - 3 x wiederverwendet werden.)
Entfärben	Gel nach dem Färbebad eine Minute mit dest. Wasser spülen und anschließend in Entfärber geben. 2 x 60 Minuten entfärben. Wenn der Hintergrund noch nicht klar genug ist, Gel für 20 – 30 Minuten in 40 % Ethanol/10 % Essigsäure/2 % Glycerin entfärben.
Konservieren	Gel über Nacht in Konservierungslösung inkubieren. Das Gel kann anschließend in einem Trocknungsrahmen getrocknet werden.

5. Problemlösungen

Erscheinungsbild	mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
kein Strom	Stromkreis nicht geschlossen	Kontakte/Kabel von Spannungsquelle und Trennkammer überprüfen; Pufferfüllstand prüfen
wenig Strom	Parameter an der Spannungsquelle nicht richtig eingestellt	bei limit. Stromstärke die für die Kammer empfohlene Höchstspannung wählen, bei limit. Spannung Stromstärke maximal wählen
bogenförmige Pufferfront	Überhitzung	Puffer vorkühlen, Kühlung durch Umwälzthermostat oder Stromwerte reduzieren
Pufferfront wandert langsam	Laufpuffer verbraucht	stets frischen Laufpuffer verwenden
Banden sind unscharf	Diffusion nach Auftragen der Proben	Proben zügig auftragen, Elektrophorese sofort starten
	Diffusion nach der Trennung	Gel sofort nach der Elektrophorese in Fixierlösung überführen bzw. sofort färben
	SDS-Qualität im Laufpuffer nicht ausreichend	SDS höherer Qualität einsetzen
Banden ungleichmäßig	Probenvolumina zu gering oder zu unterschiedlich	mindestens 5 µl auftragen, Probenvolumina annähernd gleich groß halten
	Salzgehalt der Proben unterschiedlich	Proben ggf. entsalzen (Dialyse, Gelfiltration)
Streifenbildung	Präzipitat in der Probe	Probe zentrifugieren oder filtrieren
Banden breit, z. T. verschmiert	lipophile Substanzen in der Probe	Substanzen vor der Elektrophorese entfernen, evtl. SDS-Konzentration erhöhen
Bandenanzahl größer als erwartet	Protease-Aktivität	Protease-Inhibitor zusetzen, Zeit zwischen Probenvorbereitung und Lauf minimieren
	unvollständige Reduktion	Reduktionsbedingungen prüfen (evtl. Inkubationszeit verlängern, DTT-Konzentration erhöhen)

6. Appendix

Zusammensetzung der Puffer:

10x Laemmli Running Buffer

Komponenten	Konzentration
Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1 %

2x Tris/Glycine-SDS Sample Buffer

Komponenten	Konzentration
1 M Tris-HCl pH 6.8	0,126 M
10 % (w/v) SDS	4 %
Glycerin	20 %
0,1 % (w/v) Bromphenolblau	0,02 %

7. Bestellinformationen

Fertiggele	Kat-Nr.
SERVAGel™ TG 8 %Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43208.01
SERVAGel™ TG 8 %Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43208.02
SERVAGel™ TG 8 %Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43208.03
SERVAGel™ TG 10 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43210.01
SERVAGel™ TG 10 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43210.02
SERVAGel™ TG 10 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43210.03
SERVAGel™ TG 12 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43212.01
SERVAGel™ TG 12 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43212.02
SERVAGel™ TG 12 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43212.03
SERVAGel™ TG 14 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43214.01
SERVAGel™ TG 14 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43214.02
SERVAGel™ TG 14 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43214.03
SERVAGel™ TG 16 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43216.01
SERVAGel™ TG 16 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43216.02
SERVAGel™ TG 16 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43216.03
SERVAGel™ TG 4 - 20 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43230.01
SERVAGel™ TG 4 - 20 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43230.02
SERVAGel™ TG 4 - 20 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43230.03
SERVAGel™ TG 8 - 16 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43231.01
SERVAGel™ TG 8 - 16 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43231.02
SERVAGel™ TG 8 - 16 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43231.03
SERVAGel™ TG 4 - 12 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43232.01
SERVAGel™ TG 4 - 12 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43232.02
SERVAGel™ TG 4 - 12 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43232.03
Geräte	
BlueVertical Mini Slab Gel System BV 102	BV 102
Blue Power 500 Plus Power Supply	BP-500Plus
BlueBlot Wet 100 Tank Blotter (10 x 10 cm)	BB 100
BlueFlash Semi-Dry Blotter Medium (15 x 15 cm)	BF-M
Proteinmarker	
SERVA Protein Test Mixture 6 for SDS PAGE (6.5 – 94.7 kDa)	39207.01
SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker (6 – 200 kDa)	39215.01
SERVA Prestained SDS PAGE Protein Marker (6 – 200 kDa)	39216.01
SERVA Recombinant SDS PAGE Protein Marker (10 – 150 kDa)	39217.01
SERVA Recombinant SDS PAGE Protein Marker PLUS (10 – 150 kDa)	39218.01
Protein MW Standards for Native PAGE (12 – 450 kDa)	39064.01
Färbereagenzien und -kits:	
SERVA <i>Densi</i> Stain Blue G Staining Solution (2fach konzentriert, 500 ml)	35078.01
SERVA Blue R Staining Kit (2 x 500 ml)	42531.01
SERVA Silver Staining Kit SDS PAGE (25 Minigele)	35076.01
SERVA Silver Staining Kit Native PAGE (25 Minigele)	35077.01
SERVA Blue G	35050
SERVA Blue R	35051
Amido black 10 B (50 g)	12310.01

Färbereagenzien und -kits:	
Ponceau S solution (0,2 %, 500 ml)	33427.01
Silver nitrate	35110
Puffer etc.	
SERVA Tris-Glycine/SDS electrophoresis buffer (10x)	42529
SERVA Tris-Glycine/SDS sample buffer (2x)	42527
SERVA Tris-Glycine native electrophoresis buffer (10x)	42530
SERVA Tris-Glycine native sample buffer (2x)	42528
Laemmli buffer for SDS PAGE (10x)	42556
Puffer etc.	
Towbin buffer 10x, for native PAGE and for Western Blotting	42558
Semi-Dry blotting buffer kit (3 x 500 ml)	42559
Glycine	23390
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	37186
Bromophenol blue, sodium salt	15375
Dithiothreitol	20710
Ethanol, undenatured, absolute	11093
Glycerol	23176
2-Mercaptoethanol	28625
SDS in Pellets	20765
SDS solution, 20 % (w/v)	20767
Trichloroacetic acid, 20 % solution	36913
Membranen	
Immobilin (PVDF), 9 x 12 cm, Porengröße: 0,2 µm (10 Blatt)	42579.01
Immobilin (PVDF), 26,5 cm x 3,75 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42574.01
Fluorobind (PVDF), 10 x 10 cm, Porengröße: 0,2 µm (20 Blatt)	42573.01
Fluorobind (PVDF), 25 cm x 3 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42571.01

Mighty Small™ and miniVE™ sind Warenzeichen Hoefer Inc.

XCell II® and ThermoFlow® Mini-Cell sind Warenzeichen von Novel Experimental Technology.

Coomassie® ist ein Warenzeichen von ICI Ltd.