

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA^{Ge}/™N Native Gel Starter Kit Starter Kit für native Electrophorese

(Kat.-Nr. 43204.01)



Carl-Benz-Str. 7, D-69115 Heidelberg
phone +49-6221-138400, fax +49-6221-1384010

Inhaltsübersicht

1.	SERVA^{Ge}TMN Native Gel Starter Kit	4
1.1.	Einleitung	4
1.1.1.	Native Gelelektrophorese	4
1.1.2.	<i>Blue Native</i> Elektrophorese	4
1.1.3.	<i>Clear Native</i> Elektrophorese	4
1.2.	Allgemeine Hinweise	5
1.3.	Kitkomponenten	5
1.4.	Zusammensetzung der Gele	7
1.5.	Lagerbedingungen	7
2.	Handhabung der Gelkassetten/Durchführung der Elektrophorese	7
3.	Elektrophorese Protokoll	9
3.1.	<i>Blue Native</i> Elektrophorese (BN)	9
3.1.1.	Herstellen der Laufpuffer für BN	9
3.1.2.	Probenvorbereitung für BN	9
3.2.	<i>Clear Native</i> Elektrophorese (CN)	9
3.2.1.	Herstellen der Laufpuffer für CN	9
3.2.2.	Probenvorbereitung für CN	9
3.3.	Elektrophoresebedingungen	9
4.	Färbeprotokolle	11
4.1.	Färbung mit SERVA Blau R	11
4.1.1.	Reagenzien und Lösungen	11
4.1.2.	Durchführung	11
5.	Appendix	12
6.	Bestellinformationen	14

1. SERVA Ge/™N Native Gel Starter Kit

1.1. Einleitung

1.1.1. Native Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteingemischen wird sehr häufig die SDS-PAGE eingesetzt. Da hierbei die Proteine denaturiert werden, ist die Analyse von Multiproteinkomplexen nicht möglich.

Zur Trennung von Proteinen unter nativen Bedingungen gibt es unterschiedliche Methoden, z. B. *Blue Native* oder *Clear Native* Gelelektrophorese.

1.1.2. *Blue Native* Elektrophorese

Bei der *Blue Native* Gelelektrophorese wird das denaturierende Detergenz SDS im Laufpuffer durch Coomassie Brilliant Blue G250 oder SERVA Blue G ersetzt. Dieser Farbstoff ist ebenfalls negativ geladen. Durch Bindung an die Proteine bilden sich negativ geladene Farbstoff-Protein-Komplexe. Die native Struktur der Proteine bleibt erhalten, da der Farbstoff nicht als Detergenz wirkt. Die Farbstoff-Protein-Komplexe wandern bei physiologischem pH unabhängig von ihrem pI zur Anode. Da sich die Protein-Farbstoff-Komplexe aufgrund der negativen Ladungen gegenseitig abstoßen, ergibt sich eine hohe Trennschärfe.

1.1.3. *Clear Native* Elektrophorese

Die *Clear Native* Gelelektrophorese wird ohne Verwendung eines Farbstoffs durchgeführt. Die Wanderungseigenschaften der Proteine im Gel sind deshalb u.a. auch von der Proteineigenladung abhängig. Diese Methode erlaubt die Trennung von Proteinen mit pI < 7 bei physiologischem pH, wenn bei nachfolgenden Analysen Störungen durch Farbstoffe auftreten können.

1.2. Allgemeine Hinweise

Der SERVA^{Ge}TMN Native Gel Starter Kit enthält neben den gebrauchsfertigen Gelen auch Elektrophorese-Anoden- und Kathodenpuffer, sowie zwei verschiedene Probenpuffer zur Durchführung einer *Blue Native* (BN) oder *Clear Native* (CN) Gelelektrophorese. Die enthaltenen SERVA^{Ge}TM N Gele sind gebrauchsfertig für die vertikale native Gelelektrophorese.

Vorteile der Gele für den Anwender:

- einfache und schnelle Handhabung
- hohe Auflösung, scharfe Banden, beste Reproduzierbarkeit
- hergestellt mit Chemikalien höchster Qualität
- Gele werden in unzerbrechliche, gegen Auslaufen sicher versiegelte Plastikkassetten gegossen
- Einzel in Aluthenbeutel verpackte und gegen Austrocknung geschützte Gele
- 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. Hoefer Mighty SmallTM SE 260, Hoefer miniVETM, 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.

1.3. Kitkomponenten

SERVA ^{Ge} TM N 3-12, Vertical Native Gel 3-12%	2 Stück
SERVA ^{Ge} TM N 4-16, Vertical Native Gel 4-16%	2 Stück
Schlüssel zum Öffnen der Kassetten	1 Stück
Applikationshilfe (Application Aid) für 10 Probentaschen	2 Stück
Applikationshilfe (Application Aid) für 12 Probentaschen	2 Stück
10x Native Anode Buffer for BN/CN	250 ml
10x Native Cathode Buffer for BN/CN	250 ml
SERVA Marker Mix for Blue/Clear Native PAGE	50 µl
2x Sample Buffer Blue Native	2 ml
2x Sample Buffer Clear Native	2 ml
1% SERVA Blue G solution for BN	5 ml

Kassette:

Außenmaß	10 cm x 10 cm
Anzahl der Probentaschen	10 / 12 / 15
Taschenvolumen	50 µl / 35 µl / 20 µl

Gel:

Material	Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid
Schichtdicke	1 mm

Hinweis:

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

1.4. Zusammensetzung der Gele

Acrylamid-Konzentration (T): 3-12 %/4-16 %

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

1.5. Lagerbedingungen

Kitkomponente	Lagertemperatur
10x Native Anode and Cathode Buffer for BN/CN	+15 °C – +30 °C
SERVAGe™N Native Gele	+2 °C – +8 °C
2x Sample Buffer Blue Native	-25 °C – -15°C
2x Sample Buffer Clear Native	-25 °C – -15°C
SERVA Marker Mix for Blue/Clear Native PAGE	-25 °C – -15°C
1% SERVA Blue G solution for BN	+15 °C – +30 °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.

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. Zur Besseren Sichtbarkeit der Probetaschen kann die *Application Aid* mit Hilfe eines Tropfen Wassers durch Adhäsion an der Außenseite der Kasette auf Höhe des Kamms befestigt werden. Je nach Anzahl der Probetaschen (10 oder 12) wird die passende *Application Aid* gewählt.
4. Kathodenpuffer in die innere Pufferkammer einfüllen, Kamm gleichmäßig aus dem Gel ziehen, mögliche Gelreste oberhalb der Probetaschen entfernen, **Geltaschen gut ausspülen**, dabei Luftblasen vermeiden bzw. entfernen. Anodenpuffer in die äußere Pufferkammer füllen.
5. Proben auftragen, Geltaschen ohne Proben mit Probenpuffer (1x) beladen. Entfernen der *Application Aid*, die anschließend wieder verwendet werden kann.
6. Elektrophoresekammer schließen und mit der Spannungsquelle verbinden. Spannungsquelle einschalten und Elektrophorese starten.

Bedingungen: siehe Abschnitt 3.

7. Nach Beendigung der Elektrophorese Spannungsquelle ausschalten, Verbindung zur Elektrophoresekammer unterbrechen, Elektrophoresepuffer entfernen und Kasette entnehmen.
8. Zum Öffnen der Kasette 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 Kasette (Pfeilkennzeichnung) einsetzen und mit einem kurzen Schlag von oben auf den Schlüssel die Kasette aufbrechen. Kasette wenden und Gegenseite wie beschrieben öffnen.
9. 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.

3. Elektrophorese-Protokolle

3.1. *Blue Native* Elektrophorese (BN)

3.1.1. Herstellen der Laufpuffer für BN- Elektrophorese

Verdünnen Sie den **10x Anodenpuffer** 1:10 (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 12).

Verdünnen Sie den **10x Kathodenpuffer** 1:10 (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 12) und geben Sie anschließend **1%ige SERVA Blue G-Lösung** mit einer Endkonzentration von 0,002 % (w/v) zu (1 ml auf 500 ml 1x Kathodenpuffer).

3.1.2. Probenvorbereitung für BN

- Mischen Sie Ihre Probe zu gleichen Volumenteilen mit **2x Probenpuffer für BN** (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 12). Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 50 µl. **Proben nicht erhitzen!**
- Spülen Sie die Taschen mit 1x Kathodenpuffer.
- Tragen Sie die Proben auf und starten Sie die Elektrophorese.

3.2. *Clear Native* Elektrophorese (CN)

3.2.1. Herstellen der Laufpuffer für CN- Elektrophorese

Verdünnen Sie den **10x Anodenpuffer** 1:10 (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 12).

Verdünnen Sie den **10x Kathodenpuffer** 1:10 (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 12).

3.2.2. Probenvorbereitung für CN

- Mischen Sie Ihre Probe zu gleichen Volumenteilen mit **2x Probenpuffer für CN** (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 12). Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 50 µl. **Proben nicht erhitzen!**
- Spülen Sie die Taschen mit 1x Kathodenpuffer.
- Tragen Sie die Proben auf und starten Sie die Elektrophorese.

3.3. Elektrophoresebedingungen

Die BN- und CN-Elektrophorese wird unter folgenden Bedingungen betrieben:

Spannung:

10 min $U = 50 \text{ V} = \text{konst.}$

ca. 120 min $U = 200 \text{ V} = \text{konst.}$

Die Stromstärke wird dabei während des Laufes von anfangs ca. 15 mA/Gel bei 200 V auf ca. 5 mA absinken.

Hinweis: Bei der BN-Elektrophorese ist es besonders für nachfolgende Blotting-Anwendungen wichtig, dass der blaugefärbte 1x Kathodenpuffer nach 2/3 des Elektrophorese-Laufes gegen ungefärbten 1x Kathodenpuffer getauscht wird.

Dauer: Da das Laufverhalten abhängig von der jeweiligen Probe variiert, ist kein Standardprotokoll verfügbar, sondern muss vom Anwender optimiert werden.

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 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

Fixierer	20 % (w/v) Trichloressigsäure (Kat.-Nr. 36913)
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:	Fixieren sie das Gel in 20 % (w/v) Trichloressigsäure für 30 Min., dann vor dem Färben für 1 Min. in H ₂ O dest. waschen.
Färbung	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. Appendix

Zusammensetzung der Puffer:

10x Native Cathode Buffer for BN/CN: 500 mM Tricine (Serva Kat.-Nr. 37195)
150 mM BisTris (Serva Kat.-Nr. 15107)

10x Native Anode Buffer for BN/CN: 500 mM BisTris – HCl pH 7.0

2x Sample Buffer Blue Native:

1 M 6-Aminocaprinsäure (Serva Kat.-Nr. 12548)
100 mM BisTris-HCl pH 7.0
100 mM NaCl (Serva Kat.-Nr. 30183)
20 % Glycerin (Serva Kat.-Nr. 23176)
0,1 % Serva Blue G250 (Serva Kat.-Nr. 35050)
(+Detergenz, abhängig von Probe)

2x Sample Buffer Clear Native:

100 mM NaCl (Serva Kat.-Nr. 30183)
100 mM Imidazol (Serva Kat.-Nr. 26081)
4 mM 6-Aminocaprinsäure (Serva Kat.-Nr. 12548)
2 mM EDTA
0,02 % Ponceau S (Serva Kat.-Nr. 33429)
20 % Glycerin (Serva Kat.-Nr. 23395)

PRODUKTBESCHREIBUNG

Gebrauchsfertiger Proteinstandard für die Blue Native (BN) und die Clear Native (CN) Elektrophorese bestehend aus 6 verschiedenen Proteinen mit gut abgestimmten Molekulargewichten von 21 bis 720 kDa.

Anwendung: Blau Native - und Clear Native Gelelektrophorese

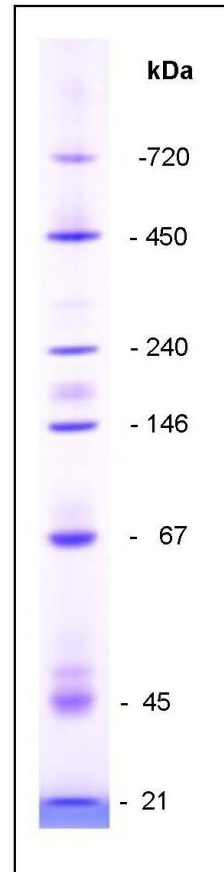
Eigenschaften

- MW-Bereich: 720 kDa – 21 kDa
- Anzahl der Banden: 7
 - Ferritin: 720 / 450 kDa
 - Phycoerthrin B: 240 kDa
 - Lactat Dehydrogensase: 146 kDa
 - Albumin (BSA): 67 kDa
 - Albumin (Ei): 45 kDa
 - Trypsin Inhibitor: 21 kDa
- Gebrauchsfertige Lösung

Lagerung -15°C bis -25 °C
In kleine Aliquots abfüllen, um wiederholte Auftau- Einfrier-Zyklen zu vermeiden.

**Gebrauchs-
anweisung** Empfohlenes Auftragsvolumen:

- 5 – 10 µl/Spur
(Gelformat 10 x 8 cm, Dicke: 0,75 oder 1 mm)
- 10 – 15 µl/Spur
(Gelformat 30 x 20 cm, Dicke: 1 oder 1.5 mm)



6. Bestellinformationen

Produkt	Kat-Nr.
Fertiggele	
SERVAGel™ TM 3-12, Vertical Native Gel 3-12 % 12 wells	43250
SERVAGel™ TM 3-12, Vertical Native Gel 3-12 % 10 wells	43251
SERVAGel™ TM 4-16, Vertical Native Gel 4-16 % 12 wells	43253
SERVAGel™ TM 4-16, Vertical Native Gel 4-16 % 10 wells	43252
SERVAGel™ TM TG PRiME 8, 12 sample wells	43260
SERVAGel™ TM TG PRiME 8, 10 sample wells	43261
SERVAGel™ TM TG PRiME 10, 12 sample wells	43263
SERVAGel™ TM TG PRiME 10, 10 sample wells	43264
SERVAGel™ TM TG PRiME 12, 12 sample wells	43266
SERVAGel™ TM TG PRiME 12, 10 sample wells	43267
SERVAGel™ TM TG PRiME 12, 2D sample well	43268
SERVAGel™ TM TG PRiME 14, 12 sample wells	43269
SERVAGel™ TM TG PRiME 14, 10 sample wells	43270
SERVAGel™ TM TG PRiME 14, 2D sample well	43271
SERVAGel™ TM TG PRiME 4-12, 12 sample wells	43273
SERVAGel™ TM TG PRiME 4-12, 10 sample wells	43274
SERVAGel™ TM TG PRiME 4-20, 12 sample wells	43276
SERVAGel™ TM TG PRiME 4-20, 10 sample wells	43277
SERVAGel™ TM TG PRiME 8-16, 12 sample wells	43279
SERVAGel™ TM TG PRiME 8-16, 10 sample wells	43280
SERVAGel™ TM Neutral HSE, 12 sample wells	43245
SERVAGel™ TM Neutral HSE, 10 sample wells	43246
SERVAGel™ TM Neutral HSE, 2D sample well	43247
SERVAGel™ TM Neutral pH 7.4, 12 sample wells	43220
SERVAGel™ TM Neutral pH 7.4, 10 sample wells	43222
Geräte	
BlueVertical™ PRiME™ Mini Slab Gel System	BV 104
Blue Power™ 600 PRiME Power Supply	BP-500x4
BlueBlot Semi-Dry Blotter SD11 (11 cm x 11 cm)	BB-SD11
Proteinmarker	
SERVA Marker Mix for Blue/Clear Native PAGE	39213.01
Färbereagenzien und -kits:	
Quick Coomassie® Stain	35081.01
SERVA Blue R Staining Kit (2 x 500 ml)	42531.01
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
Ponceau S solution (0,2 %, 500 ml)	33427.01
Silver nitrate	35110

Produkt	Kat-Nr.
Puffer etc.	
10x Native Anode Buffer for BN/CN	42535.01
10x Native Cathode Buffer for BN/CN	42536.01
2x Sample Buffer Blue Native	42533.01
2x Sample Buffer Clear Native	42534.01
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
Ethanol, undenatured, absolute	11093
Glycerol	23176
Trichloroacetic acid, 20 % solution	36913
SERVA Blue G Solution for BN, 1 %	42538.01
Membranen	
Fluorobind (PVDF), 25 cm x 3 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42571.01
PVDF 0,2 Transfermembran; 30 cm x 3 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42515.01
PVDF 0,45 Transfermembran; 30 cm x 3 m, Porengröße: 0,45 µm (1 Rolle)	42514.01

Mighty Small™ and miniVE™ sind Warenzeichen Hoefer Inc.
Coomassie® ist ein Warenzeichen von ICI Ltd.

