

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA Ge™ IEF 3-10 Gel Precast Vertical Gels for Isoelectric Focusing

(Kat.-Nr. 43240, 43242)



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. SERVAGe™ IEF 3-10	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lagerbedingungen	3
2. Handhabung der Gelkassetten/Durchführung der Elektrophorese	4
3. Standard-IEF Protokoll	5
3.1. Herstellung der Laufpuffer	5
3.1.1. Kathodenpuffer	5
3.1.2. Anodenpuffer	5
3.2. Probenvorbereitung für die IEF	5
3.3. Elektrophoresebedingungen	5
4. NEPHGE Protokoll	6
4.1. Herstellen der Laufpuffer	6
4.2. Vorbereitung der NEPHGE	6
4.3. NEPHGE Bedingungen	8
5. Färbung mit SERVA Violet 17	7
5.1. Reagenzien und Lösungen	7
5.2. Durchführung	7
6. Appendix	8
7. Bestellinformationen	9

1. SERVAGe™ IEF 3-10

1.1. Allgemeine Hinweise

SERVAGe™ IEF 3-10 Gele sind gebrauchsfertig Gele für die vertikale isoelektrische Fokussierung. Diese Gele können in der Standard-IEF mit kathodischem als auch in der NEPHGE (*non-equilibrium pH gradient electrophoresis*) mit anodischem Probenauftrag verwendet werden. Dadurch kann eine optimale Proteintrennung im sauren bis neutralen als auch im neutralen bis basischen Bereich erfolgen. Die Anwendung der NEPHGE ermöglicht auch die Trennung von Proteinen im pH-Bereich von 8,5 bis 10,7.

Diese Gele sind Bestandteil des SERVAGe™ IEF Starter Kits (Kat.-Nr. 43205). Neben den gebrauchsfertigen Gelen enthält dieser Kit auch Anoden- und Kathodenpuffer für die Standard-IEF, sowie Probenpuffer.

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. SERVA BlueVertical™ PRiME™, Hoefer Mighty Small™ SE 260, Hoefer miniVE™, 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.

Kassette:

Außenmaß	10 cm x 10 cm
Anzahl der Probenaschen	10 / 12
Taschenvolumen	50 µl / 35 µl

Gel:

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

1.2. Lagerbedingungen

Die Lagerung der Gele sollte bei 2 °C – 8 °C erfolgen.

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 °C - + 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. 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.
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 bzw. 4.
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.

3. Standard-IEF Protokoll

3.1. Herstellen der Laufpuffer

3.1.1. Kathodenpuffer

Lösen Sie **SERVA IEF cathode buffer** in 1 l bidest. Wasser. Für das Füllen des inneren Kathodentanks sind normalerweise 200 ml ausreichend.

3.1.2. Anodenpuffer

Setzen Sie den Anodenpuffer **mindestens eine Stunde vor Beginn** der IEF an, damit eine vollständige Lösung des Pulvers erreicht wird.

Lösen Sie **SERVA IEF anode buffer** in einem geeigneten Gefäß in **2,5 l** bidest. Wasser unter Rühren bei Raumtemperatur.

Für das vollständige Füllen der äußeren Pufferkammer sind je nach Gerät ca. 500 ml Puffer notwendig.

Wichtig: Verwenden Sie nur den von SERVA angegebenen Anodenpuffer. Die Verwendung von Phosphorsäure als Anodenpuffer führt zu massiven Störungen während der IEF! Bitte achten Sie außerdem auf ausreichende Kühlung der Gele. Die Temperatur des Laufpuffers sollte bei 20 °C liegen.

3.2. Probenvorbereitung für IEF

- Mischen Sie Ihre Probe zu gleichen Volumenteilen mit **IEF Probenpuffer**. Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 50 µl (10 Probenaschen) und 35 µl (12 Probenaschen). **Proben nicht erhitzen!**
- Spülen Sie die Taschen mit Kathodenpuffer.
- Tragen Sie die Proben auf und starten Sie die Elektrophorese.

3.3. Elektrophoresebedingungen

Die IEF wird unter folgenden Bedingungen betrieben:

Spannung:

60 min U = 50 V = konst.

60 min U = 200 V = konst.

30 min U = 500 V = konst.

Die Stromstärke wird dabei während des Laufes von anfangs ca. 8 mA/Gel bei 100 V auf ca. 6 mA absinken.

4. NEPHGE Protokoll

Hinweis: Die Polaritäten bei dieser Elektrophorese entsprechen nicht der Standard-IEF, sondern erfordern eine Umkehrung.

Bitte achten Sie außerdem auf ausreichende Kühlung der Gele. Die Temperatur des Laufpuffers sollte bei 20 °C liegen.

4.1. Herstellen der Laufpuffer

Als Anodenpuffer (1x) wird eine 40 mM Glutaminsäurelösung verwendet. Der Kathodenpuffer (1x) besteht aus 20 mM NaOH.

4.2. Vorbereitung der NEPHGE

- Mischen Sie Ihre Probe zu gleichen Volumenteilen mit **IEF Probenpuffer**. Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 50 µl (10 Probenaschen) und 35 µl (12 Probenaschen). **Proben nicht erhitzen!**
- Füllen Sie den Anodenpuffer in die innere Pufferkammer und spülen Sie die Taschen mit Anodenpuffer.
- Die äußere Pufferkammer mit Kathodenpuffer komplett füllen.
- Tragen Sie die Proben anodisch auf.
- Verbinden Sie die innere Pufferkammer mit der Anode (+ Pol) und die äußere Pufferkammer mit der Kathode (- Pol) und starten Sie die Elektrophorese.

4.3. NEPHGE Bedingungen

Die NEPHGE wird unter folgenden Bedingungen betrieben:

Spannung:

60 min U = 100 V = konst.

20 min U = 200 V = konst.

5 min* U = 500 V = konst.

*Die Zeit kann probenabhängig auf 10 min erhöht werden. Cytochrom C (pI = 10,7) ist dann nicht mehr im Gel zu detektieren.

5. Färbung mit SERVA Violet 17

5.1. Reagenzien und Lösungen

Fixierer	20 % (w/v) Trichloressigsäure (Kat.-Nr. 36913)
Stammlösung 1	0,2 % SERVA Violet 17 in H ₂ O dest. (100 mg SERVA Violet 17 in 50 ml H ₂ O dest. lösen)
Stammlösung 2	20 % (w/v) Phosphorsäure (140 ml 85 % H ₃ PO ₄ , auf 1000 ml H ₂ O)
Entfärber	3 % (w/v) Phosphorsäure (20 ml 85 % H ₃ PO ₄ , auf 1000 ml H ₂ O)
Konservierungslsg.	30 % (v/v) Ethanol, 5 % (w/v) Glycerin

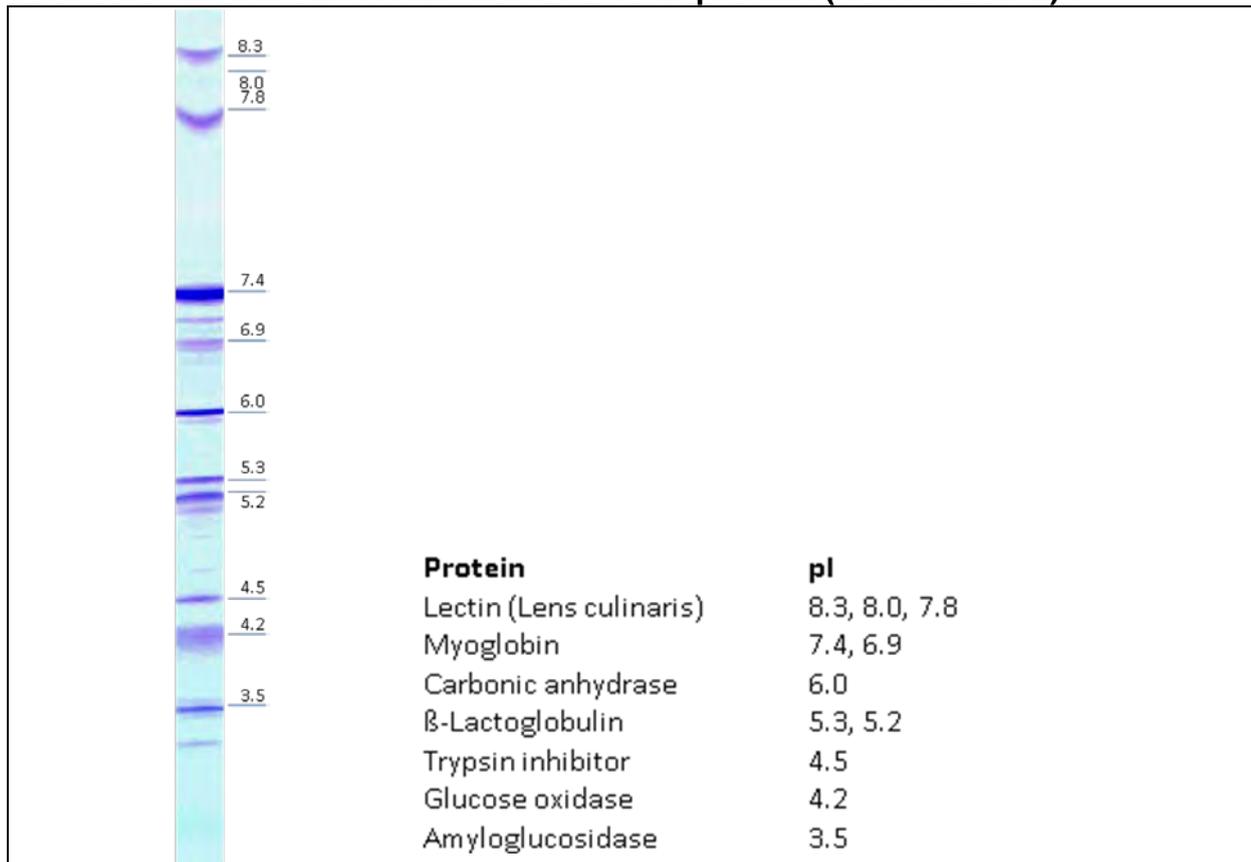
5.2. Durchführung

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.

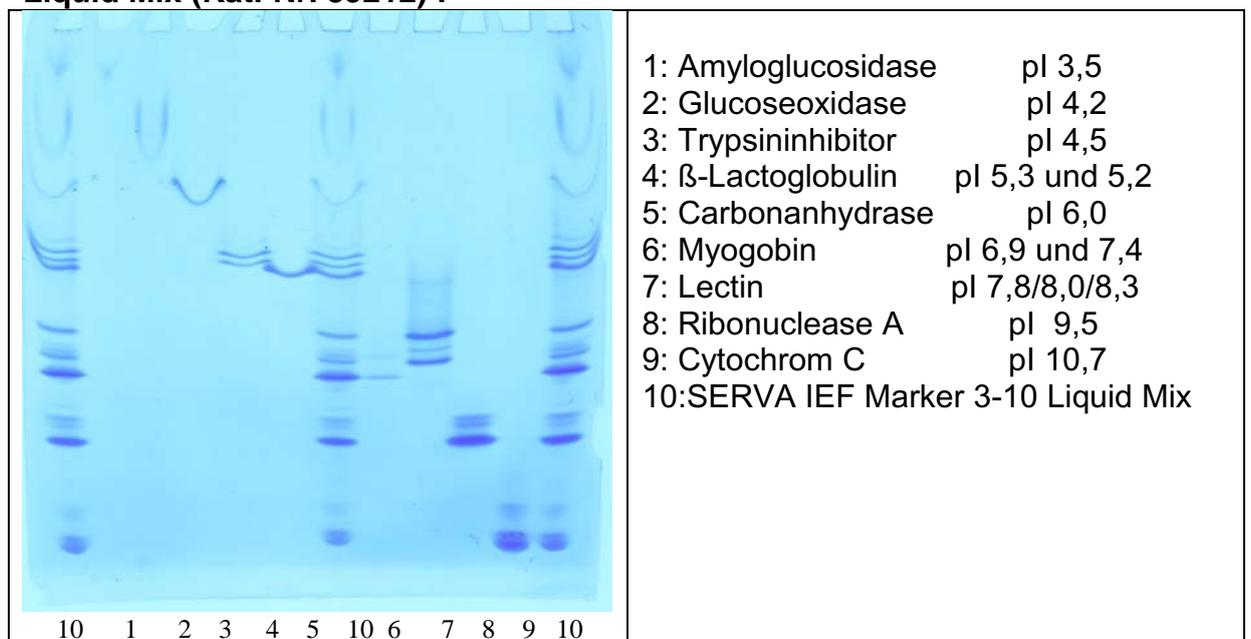
Fixierung:	Fixieren sie das Gel in 20 % (w/v) Trichloressigsäure für 20 Min., dann vor dem Färben für 1 Min. in H ₂ O dest. waschen.
Färbung	Stammlösungen 1 und 2 werden zu gleichen Teilen gemischt und das Gel 10 Min. und länger darin inkubiert.
Entfärben	Gel nach dem Färbebad eine Minute mit dest. Wasser spülen und anschließend in Entfärber geben bis der Hintergrund klar ist.
Konservieren	Gel 1 h in Konservierungslösung inkubieren. Das Gel kann anschließend in einem Trocknungsrahmen getrocknet werden.

6. Appendix

Standard-IEF mit SERVA IEF Marker 3-10 Liquid Mix (Kat.-Nr. 39212) :



NEPHGE mit verschiedenen Markerproteinen und SERVA IEF Marker 3-10 Liquid Mix (Kat.-Nr. 39212) :



7. Bestellinformationen

Produkt	Kat.-Nr.
Fertiggele	
SERVAGel™ IEF 3-10, 12 wells	43240
SERVAGel™ IEF 3-10, 10 wells	43242
SERVAGel™ N 3-12, Vertical Native Gel 3-12 % 12 wells	43250
SERVAGel™ N 3-12, Vertical Native Gel 3-12 % 10 wells	43251
SERVAGel™ N 4-16, Vertical Native Gel 4-16 % 12 wells	43252
SERVAGel™ N 4-16, Vertical Native Gel 4-16 % 10 wells	43253
SERVAGel™ Neutral pH7.4, 12 sample wells	43220
SERVAGel™ Neutral pH7.4, 10 sample wells	43222
SERVAGel™ Neutral pH7.4 Gradient, 12 sample wells	43221
SERVAGel™ Neutral pH7.4 Gradient, 12 sample wells	43223
SERVAGel™ PRiME™ 8, 12 sample wells	43260
SERVAGel™ PRiME™ 8, 10 sample wells	43261
SERVAGel™ PRiME™ 10, 12 sample wells	43263
SERVAGel™ PRiME™ 10, 10 sample wells	43264
SERVAGel™ PRiME™ 12, 12 sample wells	43266
SERVAGel™ PRiME™ 12, 10 sample wells	43267
SERVAGel™ PRiME™ 12, 2D sample well	43268
SERVAGel™ PRiME™ 14, 12 sample wells	43269
SERVAGel™ PRiME™ 14, 10 sample wells	43270
SERVAGel™ PRiME™ 14, 2D sample well	43271
SERVAGel™ PRiME™ 4-12, 12 sample wells	43273
SERVAGel™ PRiME™ 4-12, 10 sample wells	43274
SERVAGel™ PRiME™ 4-20, 12 sample wells	43276
SERVAGel™ PRiME™ 4-20, 10 sample wells	43277
SERVAGel™ PRiME™ 8-16, 12 sample wells	43279
SERVAGel™ PRiME™ 8-16, 10 sample wells	43280
SERVAGel™ PRiME™ Starter Kit	43206
Geräte	
BlueVertical PRiME™ Mini Slab Gel System BV 102	BV 102
BluePower 500x4 Power Supply	BP-500x4
BlueFlash Semi-Dry Blotter Medium (15 x 15 cm)	BF-M
Proteinmarker	
SERVA Native Marker Liquid Mix for BN/CN	39219
SERVA IEF Marker 3-10, Liquid Mix	39212
Protein Test Mixture for pI-Determination pH 3-10, lyophil.	39211
Färbereagenzien und -kits:	
SERVA <i>Densi</i> Stain Blue G Staining Solution (2fach konzentriert, 500 ml)	35078
SERVA Blue R Staining Kit (2 x 500 ml)	42531
SERVA Silver Staining Kit Native PAGE (25 Minigele)	35077
SERVA Blue G	35050
SERVA Blue R	35051
Amido black 10 B (50 g)	12310
Ponceau S solution (0,2 %, 500 ml)	33427
Silver nitrate	35110
Puffer etc.	
SERVAGel™ IEF Running Buffer Kit	42539
IEF Sample Buffer (2 x)	42537

Native Anode Buffer for BN/CN (10x)	42535
Native Cathode Buffer for BN/CN (10x)	42536
Sample Buffer Blue Native (2x)	42533
Sample Buffer Clear Native (2x)	42534
SERVA Tris-Glycine native electrophoresis buffer (10x)	42530
SERVA Tris-Glycine native sample buffer (2x)	42528
Laemmli Buffer 10x, for SDS PAGE	42556
Laemmli Sample Buffer 2x, for SDS PAGE	42526
SERVA Tris-MOPS/SDS electrophoresis buffer (20x)	42561
SERVA Tris-Tricine/SDS electrophoresis buffer (20x)	42560
SERVA Tris-Tricine/SDS sample buffer (2x)	42551
Towbin buffer 10x, 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
Membranen	
Immobilon™-P-membrane (PVDF), 26,5 cm x 3,75 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42574
Fluorobind (PVDF), 25 cm x 3 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42571

Mighty Small™ and miniVE™ sind Warenzeichen von Hoefer Inc.

Coomassie® ist ein Warenzeichen von ICI Ltd.

Immobilon™ ist ein Warenzeichen von Millipore Corp.