

Isoelektrische Fokussierung mit CleanGel IEF for PhastSystem®

CleanGel IEF for PhastSystem (Kat.-Nr. 43350) sind Folien-gestützte 0,44 mm dicke Polyacrylamidgele mit 5% Gelkonzentration und 3% Vernetzung für die Isoelektrische Fokussierung. Katalysatoren und andere nichtpolymerisierte Substanzen wie Acrylamidmonomere sind aus der Matrix entfernt worden. Deshalb sind CleanGels ungiftig. Die Gele müssen vor Gebrauch mit einer Trägerampholyten-Mischung rehydratisiert werden. Beim CleanGel IEF for PhastSystem werden—wie bei fertigen PhastGelen für die IEF auch—keine Elektrodentstreifen und Elektrodenlösungen verwendet: die Elektroden werden direkt auf die Geloberfläche aufgelegt.

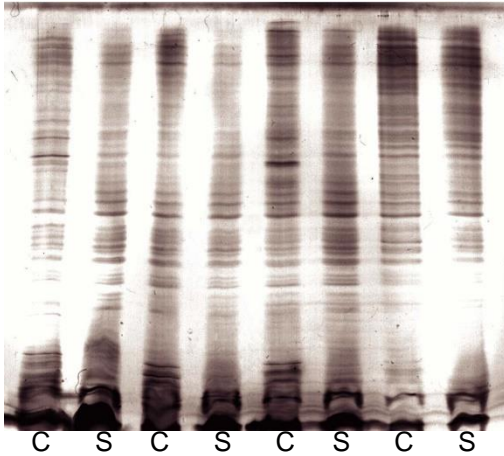


Abb.1: Isoelektrische Fokussierung von Human-Seren und Liquores (CSF) von 4 Patienten CleanGel IEF for PhastSystem . Nachweis mit automatisierter Silberfärbung. S=Serum, C=Liquor (cerebrospinal fluid, CSF)

Tragen Sie immer puderfreie Laborhandschuhe!

Rehydratisierung des Gels

1. Herstellung einer Rehydratisierungslösung aus Servalytgemisch + destilliertes Wasser .
2. Pipettieren von 800 µL dieser Verdünnung in GelPool (Wannen für PhastGele).
3. Trockengel luftblasenfrei auf die Lösung legen.

Wichtig !

Die Schutzfolie vor dem Auflegen der Gele entfernen Gel mit der Oberseite auf die Flüssigkeit auflegen GelPool mit einer Glasplatte abdecken (um Flüssigkeitsverluste besonders in trockenen und warmen Räumen zu vermeiden)

4. nach 5 min das Gel anheben und erneut luftblasenfrei auflegen
5. alle 20 min diesen Schritt wiederholen
6. nach 2 h ist das Gel einsatzbereit
7. das Gel aus dem GelPool nehmen (das verbleibende Volumen sollte in jedem Fall weniger als 50 µL betragen)
8. die Geloberfläche mit der Kante eines sauberen Filterpapiers abziehen

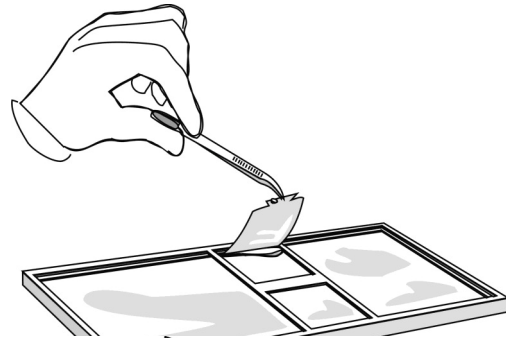


Abb. 2



Abb. 3

Isoelektrische Fokussierung

Die Elektroden müssen nach jedem Lauf mit H₂O_{dest.} und Zahnbürste gereinigt werden. Vor dem Lauf mit Kosmetikpapier trocknen.

Das Gel mit 50 (-75) µL Cooling Contact Fluid (oder Kerosin) auf des Gel-Bett des PhastSystems luftblasenfrei auflegen (so wenig Flüssigkeit wie möglich).

Probenauftrag

Bei Verwendung von Probeaufgabebändern (Abb. 4)

Nach dem Auflegen der Gele werden die Elektroden abgesenkt, die Bänder - Markierungszapfen zum Gel und zur Anode - direkt an der Anode angelegt (max. 2 mm) und mit der Pinzette leicht angedrückt. Beste Dichtigkeit der Bänder wird erreicht, wenn die Kontaktseite mit wenig Silicon gefettet wird.

Wichtig! Geloberfläche muss trocken sein, Probeaufgabebänder müssen trocken und staubfrei sein. Die Probenbänder werden bereits vor der Vorfokussierung aufgelegt, da während der Fokussierung Rillen auf der Geloberfläche entstehen, welche zum Zusammenlaufen der Proben führen könnten.

- Starten der Vorfokussierung
- Nach Erreichen des zweiten Programmschrittes das Programm mit PAUSE unterbrechen und die Proben einpipettieren, je 10 µL (dabei das Band nicht berühren)
- mit CONTINUE das Programm fortsetzen.



Bei Verwendung von Probeaufgabekämmen (Abb. 5)

- Das PhastGel IEF-Gel Cover einsetzen
- Nach dem Auflegen der Gele die Elektroden absenken und das Programm starten
- Während der Vorfokussierung den Probenkamm 6/4 mit je 4µL Probe füllen (direkt in die Slots einpipettieren)
- Nach Ertönen des Signals das Programm mit Pause unterbrechen und den Probenkamm einsetzen
- Mit CONTINUE das Programm fortsetzen

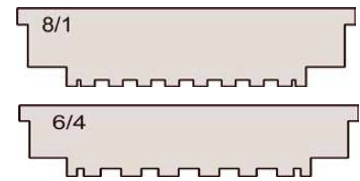


Abb. 5

Trennprogramme

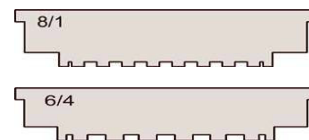
Tab. 3: Probenaufgabe BAND (set extra alarm step .1, 73 Vh)



Schritt	V	mA	W	°C	Vh
.1	1000	3.5	3.0	10	75
.2	200	3.5	3.0	10	25
.3	1000	3.5	3.0	10	100
.4	1500	3.5	3.0	10	350
.5	700	3.5	3.0	10	0

Tab 4: Probenaufgabe KÄMME:

"sample applicator down at" .2 0 Vh
 "sample applicator up at" .3 0 Vh
 "extra alarm" .1 13 V



Schritt	V	mA	W	°C	Vh
.1	500	2.5	3.0	10	15
.2	200	2.5	3.0	20	25
.3	500	3.5	3.0	10	20
.4	1000	3.5	3.0	10	80
.5	1500	3.5	3.0	10	350
.6	700	3.5	3.0	10	0

Silberfärbung

Verwenden Sie entweder den PlusOne Silver Staining Kit (Protein) von GE Healthcare und das original IEF Trennprogramm, oder den SERVA CSF Silver Staining Kit (SERVA 43394.01) mit einem modifizierten Programm.

Wichtig! - Die Entwicklungszeit (Schritt 13) muss optimiert werden, die Zeit sollte zwischen 2 und 4 min liegen:
bei der ersten Entwicklung kontrollieren! Empfohlene Formaldehydmenge im Entwickler: 50 µL
- Nach dem letzten Schritt (Step 14) das Gel noch 10 min mit 2 % Glycerinlösung behandeln.

Tab. 6: Silberfärbungsprogramm für den GE PlusOne Kit

Step	Lösung (min)	Rezeptur	In	Out	Temp °C	Time
.1	Fixieren	20 % (g/v) TCA	1	9'	50	6
.2	Spülen	10% Ethanol, 5% Essigsäure	2	0	50	3
.3	Spülen	10% Ethanol, 5% Essigsäure	2	0	50	5
.4		75 mL Ethanol, 1.25 mL Glutaraldehyde 10 mL Natriumthiosulphat, mit dest. Wasser auf 250 mL auffüllen, den Inhalt Natriumacetate zugeben, mit Magnetrührer auflösen.	3	9'	50	6
.5	Spülen	10% Ethanol, 5% Essigsäure	2	0	50	3
.6	Spülen	10% Ethanol, 5% Essigsäure	2	0	50	5
.7	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	50	2
.8	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	50	2
.9	Silber	25 mL Silbernitrat (2.5%), mit dest. Wasser auf 250 mL auffüllen, mit Magnetrührer mischen.				
.10	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	30	
.11			0.5			
.12	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	30	
.13			0.5			
.14	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	30	4*)
	Entwickler	250 mL destilliertes Wasser 1 Päckchen Natriumcarbonat langsam mit Magnetrührer hineinrühren. 75 µL Formaldehyd (37%)* auf 150 mL Entwickler.				
	Stopp	240 mL destilliertes Wasser, 1 Päckchen EDTA-Na ₂ langsam unter Rühren zugeben.	8	0	30	5

Konservierung: 10 min. in 10% Glycerinlösung²⁾

¹⁾ Informieren Sie sich bitte über die lokalen Regelungen über korrekte Beseitigung.

²⁾ Ist notwendig, damit das Gel beim Trocknen elastisch und kristallfrei bleibt. Das sollte aber einfach erhältlich sein.

* Abweichend zur PlusOne Silver-Kit Vorschrift, Durchschnittswert: hängt von der Wasserqualität ab.

Nach Gebrauch sollten alle Flaschen sorgfältig gereinigt werden, am besten in einer Spülmaschine.

Tab. 7: Silberfärbungsprogramm für den SERVA CSF Silver Staining Kit

Step	Lösung (min)	Rezeptur	In	Out	Temp °C	Time
.1	Fixieren	20 % (g/v) TCA	1	9'	50	6
.2	Spülen	10% Ethanol, 5% Essigsäure	2	0	50	3
.3	Spülen	10% Ethanol, 5% Essigsäure	2	0	50	5
.4	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	50	3
.5	100 mL destilliertes Wasser, + 25 mL Solution A, + 25 mL Solution B, und 25 mL Glutaraldehyde (25%), mit destilliertem Wasser auf 250 mL auffüllen, mischen mit Magnetrührer.		3	9'	50	6
.6	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	50	5
.7	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	50	5
.8	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	50	5
.9	Silber	100 mL destilliertes Wasser, + 5 mL Solution C und 25 mL Solution B, mit destilliertem Wasser auf 250 mL auffüllen, + 260 µL Formaldehyde (37%), mischen mit Magnetrührer.				
.10	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	30	
.11			0.5			
.12	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	30	
.13			4			
.14	Waschen	Destilliertes Wasser	4	0	30	
			4			
.14	Entwickler	100 mL destilliertes Wasser, + 25 mL Solution D, mit destilliertem Wasser auf 250 mL auffüllen, + 260 µL Formaldehyde (37%) , mischen mit Magnetrührer.				
	Stop	100 mL destilliertes Wasser, + 25 mL Eisessig, mit destilliertem Wasser auf 250 mL auffüllen, mischen mit Magnetrührer.	8	0	30	5

Konservierung: 10 min. in 10% Glycerinlösung²⁾

¹⁾ Informieren Sie sich bitte zu den lokalen Regelungen über korrekte Beseitigung.

²⁾ Ist notwendig, damit das Gel beim Trocknen elastisch und kristallfrei bleibt. Das sollte aber einfach erhältlich sein.

* Durchschnittswert: hängt von der Wasserqualität ab.

Problemlösungen

Symptom	Grund	Abhilfe
Nach Silberfärbung keine Banden oder nur Albumin sichtbar	Chemikalien von verschiedenen Lieferanten reagieren unterschiedlich. Auch das destillierte Wasser kann unterschiedlicher Qualität sein.	Silberfärbung muss in den meisten Fällen auf die Wasser- und Chemikalienqualität hin optimiert werden.

Vortest:

Jeweils 20 µL er Silberlösung (AgNO₃+ Formaldehyd) und des Entwicklers (Na₂CO₃+ Formaldehyd) in einem Wägeschälchen vereinigen. Der Tropfen muss sofort braun werden, und nach weiteren 10 Sekunden schwarz.

- a) Sollte dies nicht der Fall sein, neue Chemikalien bestellen (AgNO₃, Na₂CO₃+ Formaldehyd) und /oder die Leitfähigkeit des destillierten Wassers überprüfen.
- b) Reagieren die zwei Lösungen, erfolgt die eigentliche Silberfärbung.



Optimierung der Silberfärbung im Gel:

- "Extraalarm" des PhastSystems auf das Ende des Versilberungsschrittes setzen. Gelangt man dann bei der Silberfärbung zum Ende des Versilberungsschrittes, wird nach Ertönen des Signals die Färbung beendet (DEV "STOP"). Nach erfolgtem Auspumpen der AgNO₃-Lösung die Färbekammer öffnen und das Gel entnehmen.
- Alle weiteren Schritte werden dann am besten in einer Plastik-Petrischale mit Stoppuhr durchgeführt:
- Den 1. Entwicklungsschritt für 0,1 min. durchführen. Wippen nicht vergessen! Entwickler verwerfen, dann den 2. Entwicklungsschritt durchführen. Unter Beobachtung des Gels entscheiden, wie lange entwickelt werden muss (Die IgG-Banden müssen gut gefärbt sein.)
- Anschließend Stoppen und Konservieren, entweder von Hand oder im PhastSystem durchführen.



Von der ermittelten Entwicklungszeit 1 min. abziehen (Pumpzeiten des PhastSystems) und in das Färbeprogramm einprogrammieren.

Symptom	Grund	Abhilfe
Starke wellige Front an der Kathode und unscharfe Banden. Banden unscharf	Elektroden des PhastSystems ungenügend gereinigt; kommt häufig nach SDS-Elektrophorese vor.	Elektroden mit Zahnbürste und destilliertem Wasser jedes Mal – besonders aber nach einer SDS-Elektrophorese - (z.B. Proteinurie-Diagnostik) sorgfältig reinigen. Elektroden dazu abbauen.
Die meisten Proteine laufen am Rand ihrer Spur	Aufgabeort ist identisch mit dem pI des Albumins. Albumin blockiert den Probeneintritt.	Platzieren Sie das Probenaufgabeband näher zur Mitte des Gels (1-3 mm). Albumin sollte die Auftragsstelle in Richtung Anode verlassen, das Immunglobulin in Richtung Kathode. Elektrodenhalter regelmäßig überprüfen ob sie auf gleicher Höhe sind. Gegebenenfalls Elektrodenhalter nachbiegen
Proben sind an der Auftragsstelle liegen geblieben. Spuren laufen ineinander	Ungleiches oder kein elektrisches Feld entstanden weil Elektrodenhalter verbogen sind Flüssigkeit befindet sich auf der Geloberfläche weil das Gel unvollständig rehydratisiert wurde	Mindestens 90 min. rehydratisieren. Sollten mehr als 20 µL Flüssigkeit im GelPool überbleiben, weitere 15 min rehydratisieren.
	Aufgabeband liegt schlecht auf dem Gel, oder falsch herum.	Aufgabeband auf der ganzen Länge leicht andrücken; darauf achten, dass Markierungszapfen zum Gel orientiert sind. Wenn dies nicht hilft: Kontaktfläche des Aufgabenbands mit einer hauchdünnen Schicht Silikon Schliiffett überziehen. Maximal 90 µL aufgeben. Überschüssiges Kerosin sofort mit Kosmetiktuch abziehen. Kühlplatte sorgfältig abtrocknen.
	Beim Einpipettieren das Band verschoben.	Band beim Pipettieren möglichst nicht berühren

Benötigtes Material

CleanGel IEF for PhastSystem 43350.01
Cooling fluid 50 mL 43371.01
1 % Bromphenolblau Lösung, Bayer Silicone, mittel viskos

Für die Färbung: Trichloressigsäure, Ethanol, Essigsäure, Glycerin,
SERVA CSF Silver Staining Kit SERVA 43394.01

SERVA Electrophoresis GmbH

Carl-Benz-Str. 7
D-69115 Heidelberg
Germany.

Phone +49 6221 13840-0

Fax +49 6221 13840-10

E-Mail: info@serva.de

