

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA^{Ge}/™ TG PRIME™

Precast Vertical Gels for Electrophoresis

**(Kat.-Nr. 43260, 43261, 43263, 43264, 43266, 43267, 43269, 43270,
43284, 43285, 43286, 43287)**

SERVA
Electrophoresis

SERVA Electrophoresis GmbH - Carl-Benz-Str. 7 - 69115 Heidelberg
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
e-mail: info@serva.de -<http://www.serva.de>

Inhaltsübersicht

1. SERVAGEL™ TG PRIME™	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lieferumfang und Produktbeschreibung	2
1.3. Zusammensetzung der Gele	3
1.4. Lagerbedingungen	3
2. HANDHABUNG DER GELKASSETTEN/DURCHFÜHRUNG DER	4
ELEKTROPHORESE	4
3. ELEKTROPHORESE-PROTOKOLLE	5
3.1. Trennbereich der Gele	5
3.2. Herstellen der Laufpuffer	5
3.3. Probenvorbereitung	5
3.4. Elektrophoresebedingungen	6
4. FÄRBEPROTOKOLLE	6
4.1. Färbung mit SERVA Blau R.....	7
4.1.1. Reagenzien und Lösungen	7
4.1.2. Durchführung.....	7
5. PROTEINTRANSFER	8
5.1. Tankblotting.....	8
5.2. Semi-Dry Blotting	9
6. PROBLEMLÖSUNGEN	10
7. BESTELLINFORMATIONEN	11

1. SERVAGe™ TG PRiME™

1.1. Allgemeine Hinweise

SERVAGe™ TG PRiME™ Gele sind gebrauchsfertige Tris-Glycin-Gele für die vertikale Gelelektrophorese. Sie sind für die schnelle (35 min) diskontinuierliche Trennung nach Laemmli (Nature 277, 680 [1970]) geeignet und zeichnen sich durch lange Haltbarkeit aus.

Vorteile des Produktes 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 PRiME, 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. Lieferumfang und Produktbeschreibung

Packungsgröße: Box mit 10 oder 2 Tris/Glycin-Gelen
Jedes Gel ist einzeln in einem Aluthenbeutel verpackt. Es ist durch eine mit Gelpuffer benetzte Lage Filterpapier gegen Austrocknung geschützt.
Ein Schlüssel zum Öffnen der Kassetten ist jeder Packung Gele beigelegt.

Kassette:

Außenmaß	10 cm x 10 cm
Anzahl der Probenaschen	10, 12 oder 15
Taschenvolumen	50 µl (10er Kamm), 35 µl (12er Kamm), 20 µl (15er Kamm)

Gel:

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

1.3. Zusammensetzung der Gele

SERVAGe™ TG PRiME™ Gele werden mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (T) angeboten. Die Gele enthalten **kein SDS**. Die Trennbereiche der Gele für denaturierte Proteine sind der Tabelle 3.1. zu entnehmen.

Acrylamid-Konzentration (T): 8 %, 10 %, 12 %, 14 %

1.4. Lagerbedingungen

Lagern Sie die Gele bei 2 – 8 °C. Frieren Sie sie **nicht** ein und/oder setzen Sie die Gele 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. Elektrophoresepuffer einfüllen, Kamm gleichmäßig aus dem Gel ziehen, mögliche Gelreste oberhalb der Probetaschen entfernen, Geltaschen gut ausspülen, dabei Luftblasen vermieden 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.

3. Elektrophorese-Protokolle

3.1. Trennbereich der Gele

Acrylamidkonzentration (%)	Trennbereich (Mr 10 ³)
8	40 - 250
10	30 - 200
12	20 - 150
14	10 - 100

3.2. Herstellen der Laufpuffer

Verdünnen Sie den 10x Laemmli Buffer for SDS PAGE 1:10 (Kat.-Nr. 42556; Zusammensetzung siehe Tabelle).

Komponenten	Konzentration	Menge
Tris	0,25 M	30 g/l
Glycin	1,92 M	144 g/l
SDS	1 %	10 g/l

3.3. Probenvorbereitung

Der SERVA Tris/Glycin/SDS sample buffer (2x), Kat.-Nr. 42527, enthält **kein Reduktionsreagenz**. Sie können durch Zusatz von 5 % 2-Mercaptoethanol (Kat.-Nr. 28625) oder 10 mM DTT (Kat.-Nr. 20710) bestimmen, ob reduzierende Bedingungen herrschen (Konzentrationen beziehen sich auf den 1x Probenpuffer). Da die Reduktionsreagenzien mit der Zeit oxidieren, sollte dieser Puffer immer **frisch** angesetzt werden.

- Mischen Sie Ihre Probe mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer (denaturierend, Zusammensetzung des Puffers zum Selbstansetzen siehe Tabelle). Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 35 µl bei Gelen mit 12 Taschen und 50 µl bei Gelen mit 10 Taschen.
- 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.

Probenpuffer Komponenten	Konzentration 2x Puffer	Menge
1 M Tris-HCl pH 6.8	0,126 M	0,625 ml
10 % (w/v) SDS	4 %	2 ml
Glycerin	20 %	1 ml
0,1 % (w/v) Bromphenolblau	0,02 %	1 ml
2 M DTT	0,02 M	0,05 ml
<i>Oder: 2-Mercaptoethanol</i>	<i>10 %</i>	<i>0,5 ml</i>
Wasser, deion.		ad 5 ml

Empfohlene Probenmenge

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

3.4. Elektrophoresebedingungen

Die Elektrophorese wird unter folgenden Bedingungen betrieben

Spannung	250 V	230 V
Stromstärke	50 mA / Gel	10 min: 10 mA / Gel ca. 50 min: 20 mA / Gel
Zeit	ca. 35 – 40 min	ca. 60 min

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. Proteintransfer

Sicherheitshinweis:

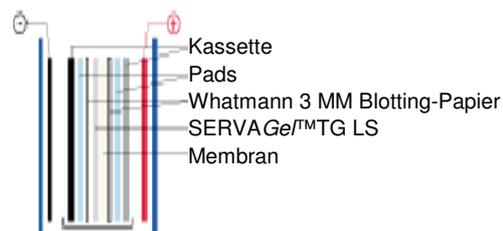
Tragen Sie aus Sicherheitsgründen grundsätzlich geeignete Schutzhandschuhe und -kleidung, wenn Sie mit Gelen und Pufferlösungen arbeiten.

SERVA Ge^{TM} TG PRiME $^{\text{TM}}$ Gele können im Tankblotter oder im Semi-Dry-Blotsystem geblottet werden. Dabei können kontinuierliche und diskontinuierliche Puffersysteme zum Einsatz kommen.

Hinweis: Beachten Sie bitte bezüglich der Transferparameter und Dauer die Angaben des Geräteherstellers (insbesondere die Angaben bezüglich max. Stromstärke und max. Spannung des Gerätes). Die Blottingdauer ist abhängig von Größe und Ladung der zu transferierenden Proteine und muss bei jeder Probe optimiert werden. Bei Markerproteinen mit mittleren Molekulargrößen ist eine Transferzeit von 60 Min. ausreichend.

5.1. Tankblotting

1. Schneiden Sie die Transfermembran und vier Blatt Whatmann 3 MM Papier auf Gelgröße (7 x 8 cm).
2. Äquilibrieren Sie die Membran in Transferpuffer (Towbin-Puffer, Kat.-Nr. 42558). Bei der Verwendung von PVDF-Membranen Gel zunächst für 2 Minuten in Methanol und anschließend für weitere 5 Minuten in Transferpuffer äquilibrieren.
3. Befeuchten Sie die porösen Pads sowie die vier Blatt Whatmann 3 MM Papier ebenfalls mit Transferpuffer.
4. Entnehmen Sie das Gel der Kassette und äquilibrieren Sie das Gel für 5 Minuten in Transferpuffer.
5. Bauen Sie das Transfersandwich auf und setzen Sie es in den Tankblotter.



6. Der Transfer erfolgt bei Raumtemperatur bei 250 mA bzw. ca. 60 V für ca. 1 Stunde (für Standardmarkerproteine).

5.2. Semi-Dry Blotting

1. Schneiden Sie die Transfermembran und vier Blatt Whatmann 3 MM Papier auf Gelgröße (7 x 8 cm).
2. Äquilibrieren Sie die Membran in Transferpuffer (Towbin-Puffer, Kat.-Nr. 42558). Bei der Verwendung von PVDF-Membranen Gel zunächst für 2 Minuten in Methanol und anschließend für weitere 5 Minuten in Transferpuffer äquilibrieren.
3. Befeuchten Sie die vier Blatt Whatmann 3 MM Papier ebenfalls mit Transferpuffer.
4. Entnehmen Sie das Gel der Kassette und äquilibrieren Sie das Gel für 5 Minuten in Transferpuffer.
5. Bauen Sie das Transfersandwich analog zum Tankblot-Sandwich auf und setzen Sie es in den Semi-Dry Blotter.
6. Der Blot erfolgt bei Raumtemperatur mit $0,8 - 1,5 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für ca. 1 Stunde (für Standardmarkerproteine).

Beim Transfer unterschiedlich großer Proteine empfiehlt sich der Einsatz eines diskontinuierlichen Blotting-Puffersystems (SERVA Semi-Dry Blotting Kit Kat.-Nr. 42559.01).

Nach dem Transfer können die Proteine auf der Membran angefärbt werden:

- **Nachweis mit Ponceau S-Lösung** (0,2 %, Kat.-Nr. 33427): Die gewaschene Membran mit der gebrauchsfertigen Ponceau S-Lösung überschichten und ca. 5 Min. lang unter leichtem Schütteln färben. Den Hintergrund mit H_2O dest. entfärben bis die roten Banden klar sichtbar sind.
- **Färben mit Amidoschwarz:** Dazu werden die Membranen für 5 Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung (1 % Amido Black in 40 % Ethanol und 10 % Eisessig 1:10 verdünnen) inkubiert und anschließend in Entfärbelösung (40 % Ethanol, 10 % Eisessig und 2 % Glycerin) entfärbt.
Hinweis: Amidoschwarz ist keine reversible Färbung, jedoch empfindlicher im Nachweis als Ponceau S, vergleichbar mit einer Coomassie® Blau R Färbung.

6. 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)

7. Bestellinformationen

Fertiggele	Kat-Nr.
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 4-12, 12 sample wells	43273
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 4-12, 10 sample wells	43274
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 4-12, 15 sample wells	43288
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 4-20, 12 sample wells	43276
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 4-20, 10 sample wells	43277
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 4-20, 15 sample wells	43289
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 8-16, 12 sample wells	43279
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 8-16, 10 sample wells	43280
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 8-16, 2D	43281
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] 8-16, 15 sample wells	43290
SERVA [™] Ge [™] Neutral HSE, 12 sample wells	43245
SERVA [™] Ge [™] Neutral HSE, 10 sample wells	43246
SERVA [™] Ge [™] Neutral HSE, 2D	43247
SERVA [™] Ge [™] Neutral pH 7.4, 12 sample wells	43220
SERVA [™] Ge [™] Neutral pH 7.4, 10 sample wells	43222
SERVA [™] Ge [™] Neutral pH 7.4 Gradient, 12 sample wells	43221
SERVA [™] Ge [™] Neutral pH 7.4 Gradient, 10 sample wells	43223
SERVA [™] Ge [™] TG PRiME [™] Starter Kit	43206
SERVA [™] Ge [™] Neutral HSE Starter Kit	43207
Geräte	
BlueVertical [™] PRiME [™] Mini Slab Gel System	BV 104
BlueFlash Semi-Dry Blotter Medium (15 x 15 cm)	BF-M
Proteinmarker	
SERVA Protein Test Mixture 6 for SDS PAGE (6.5 – 97.4 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>Dens</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
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.