# GEBRAUCHSANLEITUNG

# SERVALYT™ PRECOTES™ CSF KIT

**(Kat-Nr. 42800.01; Kat.-Nr. 42801.01)**

**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. SERVALYT™ PRECOTES™ CSF KIT 3**

1.1 Lieferumfang 3

1.2. Lagerbedingungen 3

**2. Probenvorbereitung 3**

2.1. Probematerial 3

2.2. Vorgehen 3

**3. Elektrophorese 4**

3.1 Elektrophorese-Kurzbedienungsanleitung 4

3.2. Schrittweises Vorgehen 4

**4. Silberfärbung 6**

4.1 Reagenzien und Lösungen 6

4.2. Vorgehen 7

**5. Auswertung 8**

**6. Literatur 8**

**7. Problemlösungen 9**


Ver. 08/05



SERVA Electrophoresis GmbH D-69115 Heidelberg Carl-Benz-Str. 7 Phone +49 6221/138 40 -0 · Fax +49 6221/138 40-10
e-mail: info@serva.de · http://www.serva.de

# 1. SERVALYT™ PRECOTES™ CSF KIT

## 1.1. Lieferumfang

Kit enthält: SERVALYT™ PRECOTES™ CSF
(Gelformat**:** 125 x 125 mm/245 x 125 mm, 300 µm)
Anoden- und Kathoden-Puffer
Elektrodendochte
Applikatorstreifen
Bedienungsanleitung

## 1.2. Lagerbedingungen

Die empfohlene Lagertemperatur beträgt 2 - 8 ℃. Be i Lagerung bei der empfohlenen Temperatur mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

# 2. Probenvorbereitung

## 2.1. Probenmaterial

- Liquor
- Serum

## 2.2 Vorgehen

1. 10 µl Serum mit 990 µl $H_2O$ dest. verdünnen.
2. Liquor- und verdünnte Serumproben 5 Minuten bei 14.000 U/min zentrifugieren.
3. Je 10 µl Probe auf das vorfokussierte Gel auftragen (siehe unten).

**Hinweis:** Die **IgG-Konzentration** der **Liquores** sollte **40 – 60 mg/l** betragen. Bei Beachtung beiliegender Vorschrift zur Silberfärbung kann die Liquorflüssigkeit unverdünnt eingesetzt werden (Auftrag: 0,4 µg IgG/Spur).
Bei Verwendung weniger empfindlicher Detektionsmethoden (z. B. mit Farbstoffen) muß die Cerebrospinal-Flüssigkeit durch geeignete Methoden, z.B. Ultrafiltration, konzentriert werden.



SERVA Electrophoresis GmbH D-69115 Heidelberg Carl-Benz-Str. 7 Phone +49 6221/138 40 -0 · Fax +49 6221/138 40-10
e-mail: info@serva.de · http://www.serva.de

# 3. Elektrophorese

## 3.1. Elektrophorese-Kurzbedienungsanleitung

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Gelformate** | 245 x 125 mm, 300 µm Schichtdicke<br>125 x 125 mm, 300 µm Schichtdicke | | |
| **Elektrodenlösungen** | | | |
| Anode : | Anodenlösung 3 (Kat. Nr. 42984) | | |
| Kathode : | Kathodenlösung 10 (Kat. Nr. 42986) | | |
| **Kühlung der Kammer** | auf + 5 ℃ einstellen | | |
| **Fokussierungsparameter** | | | |
| Gelformat 245 x 125 mm: | 2000 V | 16 mA | 25 W |
| Gelformat 125 x 125 mm: | 2000 V | 8 mA | 16 W |
| **Vorfokussierung** (ohne Probe) | 30 Minuten | | |
| **Probenapplikation** | 4,0 - 5,0 cm vom äußeren anodischen Rand entfernt | | |
| **Probevolumen** | 10 µl | | |
| **Gesamtdauer mit Vorfokussierung** | 3500 Vh oder 2,5 Stunden | | |

## 3.2. Schrittweises Vorgehen

**Angaben in Klammern beziehen sich auf PRECOTES im Format 125 x 125 mm.**

1. Kühlplatte auf 5℃ vorkühlen.

2. Mit einer Pipette 2 ml (1 ml)* Kerosin (Kat. Nr. 26940) in die Mitte der Kühlplatte aufbringen (Kerosin dient als Kühlvermittler zwischen Kühlplatte und Gel).

3. SERVALYT™ PRECOTES™ der Kartonverpackung entnehmen und an drei Seiten der Aluthenschweißnaht (zwei Längs- und eine Breitseite) mittels einer Schere aufschneiden.

***Hinweis: Bei der Handhabung von Polyacrylamidgelen grundsätzlich Gummihandschuhe tragen.***

4. SERVALYT™ PRECOTES™ Gel **mit Deckfolie** luftblasenfrei (Aufdruck nach oben) auf die Kühlplatte aufrollen. Eventuell überschüssiges Kerosin mit einem saugfähigen Fließpapier an den Rändern entfernen.

5. Zwei Papierelektrodendochte der Packung entnehmen und auf eine glatte saubere Fläche (z. B. Glasplatte) legen.

6. Elektrodendochte **gleichmäßig** tränken
   **2 (1) ml** Anodenlsg. 3 (rote Verschlußkappe)
   **2 (1) ml** Kathodenlsg. 10 (schwarze Verschlußkappe)



SERVA Electrophoresis GmbH D-69115 Heidelberg Carl-Benz-Str. 7 Phone +49 6221/138 40 -0 · Fax +49 6221/138 40-10
e-mail: info@serva.de · http://www.serva.de

***Hinweis : Getränkte Elektrodendochte nicht mit trockenem Fließpapier abtupfen. Das Volumen von 2 ml bezieht sich auf die Originallänge eines Elektroden-dochtes.***

7. Deckfolie mit einer spitzen Pinzette entfernen.

8. Auflegen der getränkten Elektrodendochte auf das Gel:
   Anodendocht auf den markierten **roten** Längsstreifen, Kathodendocht auf den markierten **schwarzen** Längsstreifen.

9. Auflegen der **Minus-**Elektrode auf den Kathodendocht, Auflegen der **Plus**-Elektrode auf den Anodendocht. Elektroden evtl. mit Glasplatte beschweren.

10. Gehäusedeckel der Kammer schließen und an Stromversorgungsgerät anschließen.

11. Im "Set"-Modus (Limitierung der Parameter) folgende Werte eingeben:
    **2000 Volt, 16 mA, 25 Watt**
    **2000 Volt, 8 mA, 16 Watt**

12. Start der Isoelektrischen Fokussierung ohne Proben (Vorfokussierung).
    **Dauer: 30 Minuten**

***Hinweis: Nach dem Start sollte die Spannung zwischen 250 V und 350 V liegen und nach 30 Minuten auf 400 V bis 600 V ansteigen.***

13. Nach 30 Minuten wird die Elektrophorese unterbrochen und die Kammer geöffnet.

14. Auflegen des Applikatorstreifens: Der Silikonstreifen muss **4,0 - 5,0 cm** von dem **äußeren anodischen Rand** des Precote entfernt aufgelegt werden.

15. Jeweils **10 µl** Probe werden mittels einer Pipette in die Schlitze des Silikonstreifens pipettiert (siehe Probenvorbereitung) und die Elektrophorese fortgesetzt.

16. Nach **insgesamt 3500 Vh oder** weiteren **2,5 Std.** ist die Elektrophorese beendet. Die Elektrodendochte werden mit einer Pinzette vom Gel entfernt und das IEF-Gel **sofort** in 200 ml der Fixierlösung I überführt.

***Hinweis: Zur besseren Fixierung und zur weiteren Färbung und Entfärbung der Proteine das SERVALYT™ PRECOTES™ Gel unbedingt mittels eines Schüttlers in den jeweiligen Lösungen mäßig bewegen. Nach dreimaligem Gebrauch sollte die Trichloressigsäure-haltige Lösung fachgerecht entsorgt werden.***

17. Detektion der Proteine durch Silberfärbung: siehe Abschnitt 4, Seite 6.



**SERVA Electrophoresis GmbH D-69115 Heidelberg Carl-Benz-Str. 7 Phone +49 6221/138 40 -0 · Fax +49 6221/138 40-10**
**e-mail: info@serva.de · http://www.serva.de**

**Allgemeiner Hinweis:**
Falls die Probenanzahl kein ganzes Gel erfordert, kann das Gel mit einer Schere in zwei Hälften zerschnitten werden (beim Schneiden vorher Deckfolie entfernen). Das restliche Gel wird mit der Deckfolie abgedeckt und in einem Plastikbeutel möglichst luftdicht bei 4 ℃ im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.
Reduzieren Sie in diesem Fall die Elektrophoreseparameter Stromstärke und Leistung auf die Hälfte, die Spannung bleibt unverändert.

# 4. Silberfärbung

## 4.1. Reagenzien und Lösungen

- **Fixierlösung I**
  150 ml Ethanol (Kat. Nr. 11094)
  17,3 g Sulfosalicylsäure (Kat. Nr. 35706)
  285 ml TCA 20 % (Kat. Nr. 36910)
  ad 500 ml $H_2O$

- **Fixierlösung II**
  500 ml Ethanol
  100 ml Eisessig
  400 ml $H_2O$

- **Fixierlösung III**
  40 ml Glutaraldehyd 25 % (Kat. Nr. 23115)
  60 ml $H_2O$

- **Waschlösung**
  50 ml Ethanol
  950 ml $H_2O$

- **Färbelösung**
  400 mg Silbernitrat ($AgNO_{3)}$ (Kat. Nr. 35110)
  1,5 ml Ammoniak 25 %
  10,5 ml NaOH 0,1 M
  ad 100 ml $H_2O$

- **Entwickler**
  100 µl Zitronensäure 5 % (Kat. Nr. 38640)
  100 µl Formaldehyd-Lösung 37 - 40 %
  ad 100 ml $H_2O$

- **Stoplösung**
  10 ml Eisessig
  90 ml $H_2O$



SERVA Electrophoresis GmbH D-69115 Heidelberg Carl-Benz-Str. 7 Phone +49 6221/138 40 -0 · Fax +49 6221/138 40-10
e-mail: info@serva.de · http://www.serva.de

## 4.2. Vorgehen

### Wichtige Hinweise zur Silberfärbung

- Verwenden Sie ausschließlich absolut saubere Färbewannen. Reste von Farbstoffen wie Coomassie® o. ä. in den Färbewannen können das Ergebnis beeinflussen (ideal sind Färbewannen aus Edelstahl).
- Das Gel stets gleichmäßig mittels eines Schüttlers in der jeweiligen Lösung bewegen.
- Achten Sie darauf, dass das Gel stets mit der jeweiligen Lösung **bedeckt** ist (je nach Größe der Färbewanne sind 100 - 200 ml Lösung ausreichend).
- **Färbelösung** und **Entwickler** kurz vor Gebrauch herstellen.
- Beim Herstellen der Färbelösung sollten Sie folgende Reihenfolge beachten: Lösen des Silbernitrates in 60 ml $H_2O$, 10,5 ml NaOH zugeben, mischen, 1,5 ml Ammoniak-Lösung zutropfen, mit Wasser auf 100 ml auffüllen. Die Färbelösung muss wasserklar sein.

Coomassie® = Trademark ICI Ltd.

### Färbeschritte:

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Fixierlösung I | 1 x 20 Minuten |
| 2. | Fixierlösung II | 2 x 10 Minuten |
| 3. | Waschlösung | 2 x 10 Minuten |
| 4. | Fixierlösung III | 1 x 20 Minuten |
| 5. | Waschlösung | 2 x 10 Minuten |
| 6. | Wässern | 3 x 10 Minuten |
| 7. | Färbelösung | 1 x 30 Minuten |
| 8. | Wässern | 1 x 5 Minuten |
| 9. | Entwickler | ca. 2 Minuten nach Sicht |
| 10. | Stoplösung | 1 x 5 Minuten |
| 11. | Wässern | 2 x 5 Minuten |
| 12. | Gel über Nacht bei Raumtemperatur trocknen | |



SERVA Electrophoresis GmbH D-69115 Heidelberg Carl-Benz-Str. 7 Phone +49 6221/138 40 -0 · Fax +49 6221/138 40-10
e-mail: info@serva.de · http://www.serva.de

## 5. Auswertung

Untersuchen Sie das Proteinmuster der Liquorproben in der kathodischen Hälfte des Precote auf solche IgG-Banden, die im dazugehörigen Serum nicht vorkommen oder deren Zahl bzw. Intensität dort geringer ist. Das Auftreten solcher Banden ist charakteristisch für eine lokale IgG-Synthese im Gehirn.

## 6. Literatur


1. Wiederkehr F (1991)
   Analysis of cerebrospinal fluid proteins by electrophoresis
   J Chromatography **569**, 281 - 296

2. Poehling HM, Neuhoff V (1982)
   Visualization of proteins with a silver "stain": A critical analysis
   Electrophoresis **2**, 141 - 147

3. Wurster U (1988)
   Liquoranalytik
   in: Schliack, H & Hopf HC (Hrgs.): Diagnostik in der Neurologie
   Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1988, 212 - 236




**SERVA Electrophoresis GmbH D-69115 Heidelberg Carl-Benz-Str. 7 Phone +49 6221/138 40 -0 · Fax +49 6221/138 40-10**
**e-mail: info@serva.de · http://www.serva.de**

## 7. Problemlösungen:

### Isoelektrische Fokussierung - Färbung

| Erscheinungsbild | Mögliche Ursache | Gegenmaßnahme |
|---|---|---|
| **Kein Strom** | Stromkreis nicht geschlossen | Kontakte/Kabel von Spannungsquelle und Trennkammer überprüfen |
| **Wenig Strom** | schlechter Kontakt zwischen Elektroden und Dochten | Elektroden evtl. mit Glasplatte o. ä. beschweren |
| **Kondensation** | Leistung zu hoch | Einstellungen an der Spannungsquelle prüfen, ggf. Stromstärke bzw. Spannung vermindern |
| | Kühlung nicht ausreichend | Temperatur prüfen,<br>Luftblasen zwischen Gel und Kühlplatte?<br>Luftblasen in der Kühlplatte eingeschlossen? |
| | Salzkonzentration der Probe zu hoch | Probe durch geeignete Maßnahmen (Dialyse, Gelfiltration, etc.) entsalzen |
| **Gel brennt durch** | siehe "Kondensation", Gel trocknet aus | siehe oben, Abhilfe schon bei Auftreten der Kondensation schaffen |
| **Gel brennt an der Folienkante durch** | Elektrodendochte länger als das Gel | Dochte genau auf Gelgröße zurechtschneiden |
| **Banden schleppen Streifen nach** | schlecht lösliche oder ausgefallenen Proteine/Salze in der Probe | Probe zentrifugieren |
| **Banden unscharf, nicht voneinander getrennt, fehlen** | Aufgabepunkt zu nahe am isoelektrischen Punkt | Probenaufgabebereich beachten:<br>4 - 5 cm von dem äußeren, anodischen Rand |
| **Durchgehender brauner Streifen nach Silberfärbung** | Elektrodenlösungen kontaminiert | Stets frische Lösungen verwenden;<br>Lösungen ggf. portionieren und einfrieren |
| **Kein oder nur wenig Protein in Liquores nachweisbar** | aufgetragene Proteinmenge zu gering, | IgG-Konzentration der Liquores sollte 40 - 60 mg/l betragen; ggf. überprüfen und evtl. Lösung konzentrieren; ideale Auftragsmenge pro Spur: ~ 500 ng IgG |
| **Gelblicher oder bräunlicher Hintergrund** | Einwirkzeit der Silberionen zu lang, Waschzeit zu kurz | Zeiten verkürzen bzw. verlängern |



SERVA Electrophoresis GmbH D-69115 Heidelberg Carl-Benz-Str. 7 Phone +49 6221/138 40 -0 · Fax +49 6221/138 40-10
e-mail: info@serva.de · http://www.serva.de