

# GEBRAUCHSANLEITUNG

---

## SERVALYT™ PRECOTES™ Hp KIT

(Kat. Nr. 42805.01)

**SERVA**  
Electrophoresis

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

# Inhaltsübersicht

<b>1. SERVALYT™ PRECOTES™ Hp KIT</b>	<b>2</b>
1.1 Lieferumfang	2
1.2. Lagerbedingungen	2
<b>2. Probenvorbereitung</b>	<b>2</b>
2.1. Lösungen	2
2.2. Vorgehen	3
<b>3. Elektrophorese</b>	<b>4</b>
3.1 Elektrophorese-Kurzbedienungsanleitung	4
3.2. Schrittweise Vorgehen	4
<b>4. Proteinfärbung: Serva Violet 17</b>	<b>6</b>
4.1 Reagenzien und Lösungen	6
4.2. Vorgehen	6
<b>5. Auswertung</b>	<b>7</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>8</b>
<b>7. Problemlösungen</b>	<b>8-9</b>

Ver. 07/07

# 1. SERVALYT™ PRECOTES™ Hp KIT

## 1.1. Lieferumfang

Kit enthält: 5 SERVALYT™ PRECOTES™ Hp-Gele  
(Gelformat: 245 x 125 mm, 300 µm)  
Anoden- und Kathoden-Puffer  
Elektrodendochte  
Applikatorstreifen  
Bedienungsanleitung

## 1.2. Lagerbedingungen

Die empfohlene Lagertemperatur beträgt 2 - 8 °C. Bei Lagerung bei der empfohlenen Temperatur mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

# 2. Probenvorbereitung

## 2.1. Lösungen

- **Präzipitationslösung** (Lösung ist für 1 Monat bei 4 °C haltbar)  
8,0 g Polyethylenglykol 6000 (Kat.-Nr. 33137)  
1,7 g NaCl (Kat.-Nr. 30183)  
0,2 g NaN<sub>3</sub> (Kat.-Nr. 30175)  
mit demin. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen
- **Natriumchlorid-Lösung** (Lösung ist für 1 Monat bei 4 °C haltbar)  
0,9 g NaCl (Kat.-Nr. 30183)  
in 100 ml demin. H<sub>2</sub>O
- **Reduktionsreagenz (stets frisch ansetzen!!)**  
1,0 g Harnstoff (Kat.-Nr. 24524)  
1,2 ml Boratpuffer (siehe unten)  
22 mg Dithiothreitol (Kat.-Nr. 20710)  
mit demin. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen
- **Borat-Puffer** (Lösung ist für 1 Monat bei 4 °C haltbar)  
0,62 g Borsäure (Kat.-Nr. 15165) in 80 ml H<sub>2</sub>O lösen,  
mit 0,1 N NaOH auf pH 8,8 titrieren,  
mit demin. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen
- **Jodacetamid-Lösung** (Lösung ist für 1 Monat bei 4 °C haltbar)  
100 mg Jodacetamid (Kat.-Nr. 26710) in 1 ml demin. H<sub>2</sub>O lösen

## 2.2. Vorgehen

1. Serum nach dem Auftauen gut durchmischen.
2. 160 µl Präzipitationslösung  
100 µl Serum  
25 µl Hp-Antiserum (Dako, Kat.-Nr. Q 0330, Rabbit-anti-human Hp IgG Fraktion)  
mischen  
**Diese Lösung wird zur Präzipitationsreaktion über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.**
3. Präzipitat 3 Minuten bei 3000 U/Min. abzentrifugieren.
4. Überstand vorsichtig absaugen.
5. Präzipitat mit 1 ml Kochsalz-Lösung versetzen und kräftig mischen.
6. Präzipitat 3 Minuten bei 3000 U/Min. abzentrifugieren.
7. Überstand vorsichtig absaugen.
8. Präzipitat mit 40 µl Reduktionsreagenz (**stets frisch ansetzen**) versetzen, kräftig mischen und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren.
9. Lösung mit 16 µl Jodacetamid-Lösung versetzen.
10. 15 Minuten (Raumtemperatur) nach Jodacetamid-Zugabe ist die Probe für die isoelektrische Fokussierung einsetzbar oder kann bei – 20 °C eingefroren werden.

### 3. Elektrophorese

#### 3.1. Elektrophorese - Kurzbedienungsanleitung

<b>Gelformat</b>	245 x 125 mm, 300 µm Schichtdicke
<b>Elektrodenlösungen</b>	
Anode:	Anodenlösung 3 (Kat.-Nr. 42984)
Kathode:	Kathodenlösung 10 (Kat.-Nr. 42986)
<b>Kühlung der Kammer</b>	auf + 5 °C einstellen
<b>Fokussierungsparameter</b>	2000 V, 16 mA, 25 W
<b>Vorfokussierung</b> (ohne Probe)	20 Minuten
<b>Probenapplikation</b>	1,5 cm vom äußeren kathodischen Rand entfernt
<b>Probevolumen</b>	15 - 20 µl
<b>Entfernen der Papier- probenapplikatorstücke</b>	45 Minuten <b>nach</b> der Vorfokussierung
<b>Gesamtdauer mit Vorfokussierung</b>	4000 Vh oder 3 Stunden

#### 3.2. Schrittweises Vorgehen

1. Kühlplatte auf 5 °C vorkühlen .
2. Mit einer Pipette 2 ml Kerosin (Kat.-Nr. 26940) in die Mitte der Kühlplatte aufbringen (Kerosin dient als Kühlvermittler zwischen Kühlplatte und Precote).
3. Precote 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. Precote **mit Deckfolie** luftblasenfrei (Aufdruck nach oben) auf die Kühlplatte aufrollen. Eventuell überschüssiges Kerosin mit einem saugfähigen Fließpapier an den Rändern entfernen.
5. Zwei Papierelektrodenoche der Packung entnehmen und auf eine glatte saubere Fläche (z. B. Glasplatte) legen.

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

**Hinweis** : *Getränkte Elektrodendochte nicht mit trockenem Fließpapier ab-tupfen. Das Volumen von 2 ml bezieht sich auf die Originallänge eines Elektrodendochtes*

7. Deckfolie mit einer spitzen Pinzette entfernen.
8. 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**

12. Start der isoelektrischen Fokussierung ohne Proben (Vorfokussierung).  
**Dauer: 20 Minuten**

**Hinweis** : *Nach dem Start sollte die Spannung zwischen 250 V und 350 V liegen und nach 20 Minuten auf 400 V bis 600 V ansteigen.*

13. Nach 20 Minuten wird die Elektrophorese unterbrochen und die Kammer geöffnet.
14. Papierprobenaufgabestücke mit der **Schmalseite** zur Laufrichtung auflegen.
15. Die Papierprobenaufgabestücke müssen **exakt 1,5 cm** von dem **äußeren kathodischen Rand** des Precote entfernt aufgelegt werden.
16. Jeweils **15 - 20 µl** der Probe werden mittels einer Pipette auf das Papierprobenaufgabestück pipettiert (siehe Probenvorbereitung) und die Elektrophorese fortgesetzt.
17. Nach **45 Minuten** wird die Elektrophorese unterbrochen und die Papierprobenaufgabestücke **vorsichtig** mit einer spitzen Pinzette entfernt.
18. Nach **insgesamt 4000 Vh oder** weiteren **120 Minuten** ist die Elektrophorese beendet. Die Elektrodendochte werden mit einer Pinzette vom Gel entfernt und das IEF-Gel **sofort** in 200 ml einer 20 %igen Trichloressigsäure überführt.

**Hinweis**: *Zur besseren Fixierung und zur weiteren Färbung und Entfärbung der Proteine das Precote unbedingt mittels eines Schüttlers in den jeweiligen Lösungen mäßig bewegen. Nach dreimaligem Gebrauch sollte die Trichlor-essigsäure fachgerecht entsorgt werden.*

19. Färbung und Entfärbung mit SERVA Violet 17: siehe beiliegende Anleitung.

### 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 °C 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. Proteinfärbung: SERVA Violet 17

### 4.1. Reagenzien und Lösungen

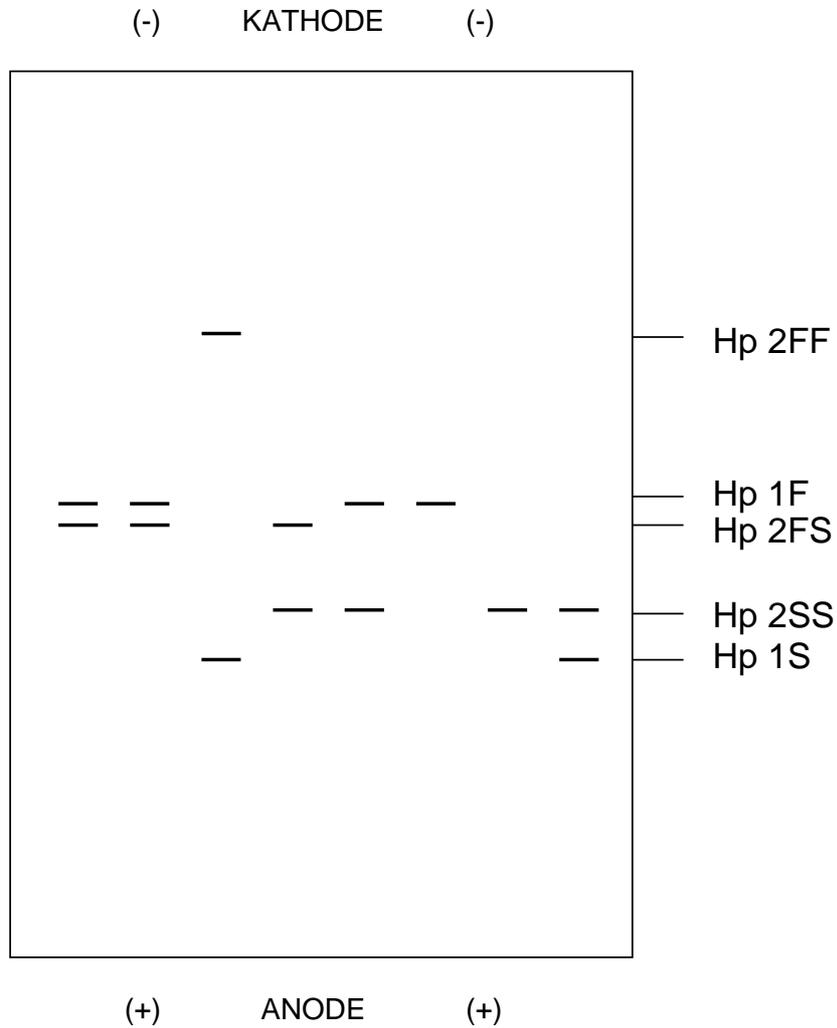
- **Fixierlösung**  
200 g Trichloressigsäure (Kat.-Nr. 36910)  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.
- **Färbestammlösung 1**  
1 g SERVA Violet 17 (Kat.-Nr. 35072)  
ad 500 ml H<sub>2</sub>O dest.
- **Färbestammlösung 2**  
136 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 86 %, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.
- **Entfärbelösung**  
18 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 86 %, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.

### 4.2. Vorgehen

- Fixierung** Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Elektrodendochte mit einer Pinzette entfernt und das IEF Gel **sofort** in 200 ml einer 20 %igen Trichloressigsäurelösung überführt.  
**Dauer: 20 Minuten**  
**Hinweis** : Zur besseren Fixierung und zur weiteren Färbung und Entfärbung der Proteine das Precote unbedingt mittels eines Schüttlers in den jeweiligen Lösungen mäßig bewegen. Nach dreimaligem Gebrauch sollte die Trichloressigsäure fachgerecht entsorgt werden.  
**Beim Umgang mit Trichloressigsäure grundsätzlich Schutzbrille und Gummihandschuhe tragen.**
- Spülen** Nach der Fixierung wird das Gel in 200 ml demin. H<sub>2</sub>O überführt.  
**Dauer: 1 Minute**
- Färbung** 100 ml Stammlösung 1 und 100 ml Stammlösung 2 **direkt** vor Gebrauch mischen und Precote färben. **Dauer: 10 Minuten**
- Entfärben** Precote 2 - 3mal mit 200 ml Entfärbelösung entfärben bis der Hintergrund klar ist. **Dauer: jeweils 10 Minuten**
- Waschen** Precote 2mal in demin. H<sub>2</sub>O oder 1 % Glycerin neutralisieren.  
**Dauer: jeweils 2 Minuten**
- Trocknen** Precote im warmen Luftstrom oder über Nacht bei Raumtemperatur trocknen.

## 5. Auswertung

Die folgende schematische Abbildung zeigt das Verteilungsmuster der wichtigsten Haptoglobin-Subtypen nach Trennung durch isoelektrische Fokussierung mit **SERVALYT™ PRECOTES™ Hp**.



### Phänotyp-Häufigkeiten (2):

Subtyp	Häufigkeit	Subtyp	Häufigkeit
1F	0,0217	1F-2FS	0,1697
1F-1S	0,0728	1S-2FS	0,2846
1S	0,0610	2FS-2SS	0,0323
1F-2FF	0,0005	2FS	0,3319
1S-2FF	0,0008	1F-2SS	0,0083
2FF-2FS	0,0018	1S-2SS	0,0139
2FF-2SS	0,0001	2SS	0,0008
2FF	0,0001		

## 6. Literatur

1. Javid J (1978), Human Haptoglobins, Current Topics in Hematology 1, 151 - 192
2. Berghaus G, Pflug W, Madea B (1995), Elektrophoretisch nachweisbare Serum-Polymorphismen in: Schleyer F, Oepen I, Henke J (Hrsg): Humanbiologische Spuren. Sicherung, Nachweis und Analyse in Kriminaltechnik und forensischer Medizin, Kriminalistik Verlag, Heidelberg 1995, 72 - 102

## 7. Problemlösungen

Erscheinungsbild	mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
<b>Isoelektrische Fokussierung</b>		
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 von Kühlplatte und Kühler prüfen. Wenn notwendig Luftblasen zwischen Gel und Kühlplatte.
	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 durch	aufgetragene Proteinmenge zu hoch	Proteinmenge reduzieren: Auftragsvolumen vermindern oder Probe verdünnen
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
	Gel überladen	siehe oben
Banden unscharf, nicht voneinander getrennt, fehlen	Aufgabepunkt zu nahe am isoelektrischen Punkt	Probenaufgabestücke genau 1,5 cm von dem äußeren, kathodischen Rand entfernt auflegen

<b>Erscheinungsbild</b>	<b>mögliche Ursache</b>	<b>Gegenmaßnahme</b>
<b>Färbung</b>		
Gel löst sich von Trägerfolie	Gel zu lange in TCA inkubiert	Gel, wenn nötig in 50 % Ethanol/10 % Eisessig lagern
Blauer Hintergrund	Trägerampholyte nicht vollständig ausgewaschen	Fixierung in TCA verlängern
Blauer Niederschlag auf dem Gel	TCA präzipitiert den Farbstoff	Gel nach der Fixierung gut mit Wasser spülen
Grüner Hintergrund	Farbstoff-Konzentration zu gering	Stammlösung I frisch herstellen, Farbstoff vollständig lösen
Grüner Hintergrund; grünliche Banden, verblassen beim Trocknen	Gel nicht ausreichend neutralisiert, pH-Wert nach dem Entfärben zu niedrig	Gel gründlich mit H <sub>2</sub> O oder 1 % Glyzerin waschen oder Gel erneut färben und gründlich neutralisieren