

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVALYT™ PRECOTES™ PGM KIT

(Kat.-Nr. 42888.01; Kat.-Nr 42895.01)



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™ PGM KIT	2
1.1	Lieferumfang	2
1.2.	Lagerbedingungen	2
2.	Probenvorbereitung	2
2.1.	Reagenzien und Lösungen	2
2.2.	Vorgehen	2
3.	Elektrophorese	3
3.1	Elektrophorese-Kurzbedienungsanleitung	3
3.2.	Schrittweises Vorgehen	3
4.	Enzymdetektion Phosphoglucomutase	5
4.1	Reagenzien und Lösungen	5
4.2.	Vorgehen	6
5.	Auswertung	7
6.	Literatur	8
7.	Problemlösungen	9

Ver. 09/05

1. SERVALYT™ PRECOTES™ PGM KIT

1.1. Lieferumfang

Kit enthält: 5 SERVALYT™ PRECOTES™ PGM
(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 °C. Bei Lagerung bei der empfohlenen Temperatur mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. Probenvorbereitung

2.1. Reagenzien und Lösungen

- **Natriumchlorid-Lösung**
0,9 g NaCl (Kat. Nr. 30183), ad 100 ml H₂O
- **Chloroform (CHCl₃)** (Kat. Nr. 39553)

2.2. Vorgehen

1. 500 µl Blutprobe zentrifugieren: 5 Minuten, 3000 U/min.
2. Überstand entfernen, Blutkuchen dreimal mit 1 ml der Natriumchlorid-Lösung waschen.
3. Blutkuchen mit 250 µl CHCl₃ und 500 µl dest. H₂O für 5 Minuten gut schütteln oder vortexen.
4. Mischung 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren.
5. Obere Phase (= Hämolysat) abnehmen; weiterverarbeiten oder bei -20 °C lagern.
6. Hämolysat (frisch oder aufgetaut) 1:3 mit dest. H₂O verdünnen und jeweils 8 µl auf das vorfokussierte Gel auftragen (siehe unten).

3. Elektrophorese

3.1. Elektrophorese-Kurzbedienungsanleitung

Gelformate 245 x 125 mm, 300 µm Schichtdicke
125 x 125 mm, 300 µm Schichtdicke

Elektrodenlösungen

Anode : 0,10 M DL-Threonin (Kat. Nr. 36370)
Kathode : 0,07 M L-Histidin (Kat. Nr. 24835)

Kühlung der Kammer auf + 5 °C einstellen

Fokussierungsparameter

Gelformat 245 x 125 mm:	2000 V	12 mA	25 W
Gelformat 125 x 125 mm:	2000 V	6 mA	16 W

Vorfokussierung 30 Minuten
(ohne Probe)

Probenapplikation 3,0 cm vom äußeren anodischen Rand entfernt

Probevolumen 8 µl

Gesamtdauer mit Vorfokussierung 4000 Vh oder 3 Stunden

3.2. Schrittweises Vorgehen

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

1. Kühlplatte auf 5 °C 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™ Gel 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 Papierelektrodenochte der Packung entnehmen und auf eine glatte saubere Fläche (z. B. Glasplatte) legen.

6. Elektrodendochte **gleichmäßig** tränken.
 2 ml (1) Threonin-Lsg. (rote Verschlusskappe)
 2 ml (1) Histidin-Lösung (schwarze Verschlusskappe)

Hinweis:

Getränkte Elektrodendochte nicht mit trockenem Fließpapier abtupfen. 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, 12 mA, 25 Watt
(2000 Volt, 6 mA, 12 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 **3,0 cm** von dem **äußeren anodischen Rand** des Gel entfernt aufgelegt werden.

Hinweis :

Alternativ können auch halbierte Papierprobenapplikatorstücke (Kat. Nr. 42880) verwendet werden.

15. Jeweils **8 µl** Probe werden mittels einer Pipette in die Schlitze des Streifens pipettiert (siehe Probenvorbereitung) und die Elektrophorese fortgesetzt.
16. Nach **insgesamt 4000 Vh oder 3 Stunden** ist die Elektrophorese beendet. Die Elektrodendochte werden mit einer Pinzette vom Gel entfernt und das SERVALYT™ PRECOTE™ Gel sofort zur Phosphoglucomutase-Detektion nach beiliegender Vorschrift weiterbehandelt.

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. Enzymdetektion Phosphoglucomutase

4.1. Reagenzien und Lösungen

- **Reaktionspuffer**

1,5 g	Tris (Kat. Nr. 37190)
2,2 g	L-Histidin HCl (Kat. Nr. 24842)
0,1 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O (Kat. Nr. 28305)
50,0 ml	H ₂ O

- **Substrat-Lösung**

20,0 mg	α-D-Glucose-1-phosphat, Na-Salz (Kat. Nr. 22783)
1,6 mg	α-D-Glucose-1,6-bisphosphat, 4 x CHA-Salz (Kat. Nr. 22775)
80,0 µl	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Kat. Nr. 22822)
12,0 mg	NADP (Kat. Nr. 30315)
12,0 mg	MTT ¹ (Kat. Nr. 20395)
1,6 mg	PMS ² (Kat. Nr. 32030)
10,0 ml	Reaktionspuffer

- **Agarose-Lösung**

200 mg	Agarose (Kat. Nr. 11400)
10,0 ml	Reaktionspuffer

- **Stop-Lösung**

10,0 ml	Essigsäure
90,0 ml	H ₂ O

MTT¹ = 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid

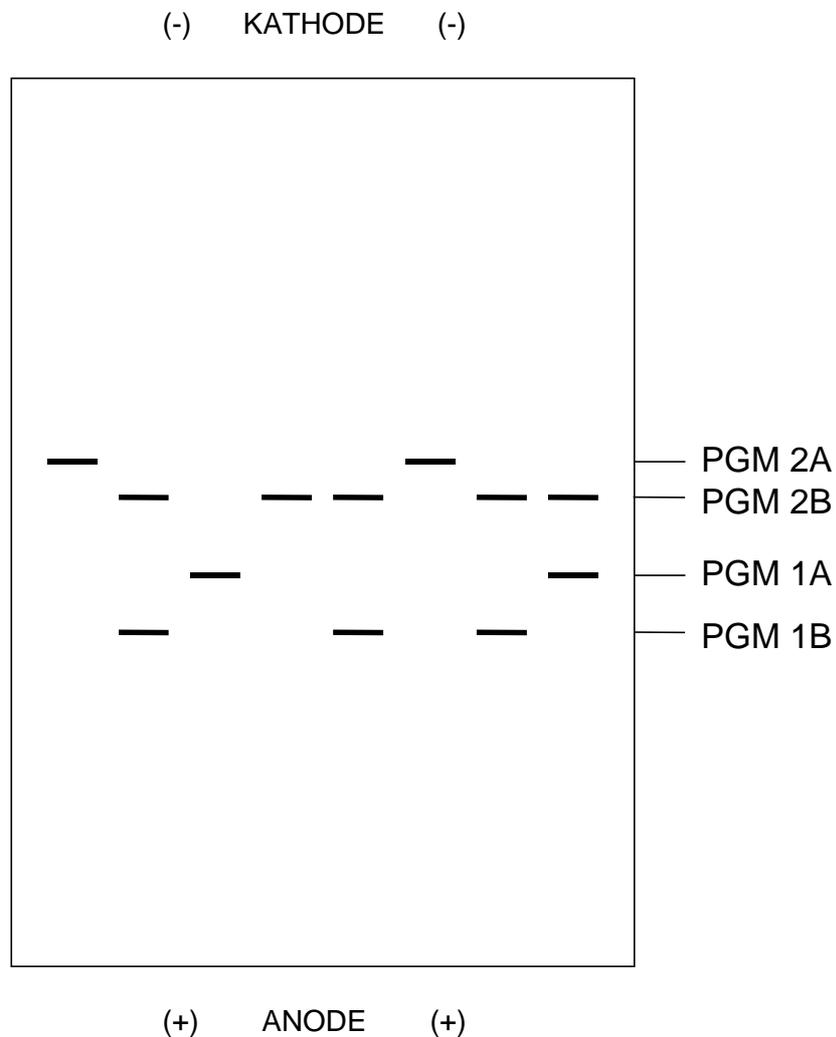
PMS² = N-Methylphenazinium methylsulfat

4.2. Vorgehen

1. Gel nach Beendigung der Elektrophorese auf eine saubere Glasplatte überführen.
2. Agarose unter Rühren in Reaktionspuffer lösen und auf 60 °C abkühlen.
3. Zwei mit Wasser getränkte Elektrodendochte parallel jeweils 2,5 cm von dem unteren und von dem oberen Rand des Gels direkt auf des Gel auflegen und leicht andrücken.
4. Durch zwei mit Wasser getränkte Elektrodendochte (vorher zuschneiden) Rahmen vertikal vervollständigen.
5. Enzymsubstrate in 10 ml Reaktionspuffer unter Rühren lösen (= Substratlösung).
6. Substrat- und Agarose-Lösung kurz mischen und sofort in den mit Elektrodendochten vorbereiteten Rahmen gleichmäßig verteilen (Agarose-Enzym-Overlay).
7. Agarose-Enzym-Overlay 5 Minuten aushärten lassen.
8. Gel mit dem Agarose-Enzym-Overlay in einer feuchten Kammer bei 50 °C inkubieren.
Dauer: 45 Minuten
9. Agarose-Enzym-Overlay mit einem Spatel entfernen und verwerfen.
10. SERVALYT™ PRECOTE™ Gel in Stop-Lösung überführen und mittels eines Schüttlers 15 Minuten schütteln.
11. Gel 2 x 10 Minuten in demin. Wasser waschen und neutralisieren.
12. SERVALYT™ PRECOTE™ Gel über Nacht bei Raumtemperatur trocknen.

5. Auswertung

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



Phänotyp-Häufigkeiten (2)

Subtyp	Häufigkeit	Subtyp	Häufigkeit
PGM ₁ 1A	0,4275	PGM ₁ 2A	0,0387
PGM ₁ 1A-1B	0,1468	PGM ₁ 1A-2B	0,0622
PGM ₁ 1B	0,0165	PGM ₁ 1B-2B	0,0112
PGM ₁ 1A-2A	0,2335	PGM ₁ 2A-2B	0,0178
PGM ₁ 2A-1B	0,0419	PGM ₁ 2B	0,0038

1A (=1+), 1B (=1-), 2A (=2+), 2B (=2-)

6. Literatur

1. Dykes DD, Copouls BA, Polesky HF (1982)
Routine phenotyping of phosphoglucomutase (PGM₁) by thin-layer focusing: Isoelectric points of 14 different variants
Electrophoresis **3**, 165 - 168
2. Pflug W, Berghaus G (1995)
Isoenzym-Polymorphismen
in: Schleyer F, Oepen I, Henke J (Hrsg): Humanbiologische Spuren. Sicherung, Nachweis und Analyse in Kriminaltechnik und forensischer Medizin
Kriminalistik Verlag, Heidelberg 1995, 102 - 168

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. Leistung auf 20 W (10 W) vermindern
	Kühlung nicht ausreichend	Temperatur prüfen, Luftblasen zwischen Gel und Kühlplatte Luftblasen in der Kühlplatte eingeschlossen
Gel brennt durch	Siehe "Kondensation", Gel trocknet aus	Siehe oben, Abhilfe schon bei Auftreten der Kondensation schaffen
	Aufgetragene Proteinmenge zu hoch, Gel überladen	Proteinmenge reduzieren: Auftragevolumen vermindern oder Probe verdünnen
Gel brennt an der Folienkante durch	Elektrodenochte 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
Keine Banden	Fehlerhafte Enzym- oder Substrat-Einwaage	Punkt 4.1. wiederholen
	Fehlerhafte Probenpräparation	Punkt 2.2. beachten
Starker blauer Hintergrund	PMS-Konzentration zu hoch	Substratkonzentration beachten
Schlechte Trennung von 1A (= 1+) und 1B (= 1-)	Fokussierzeit zu kurz	Länger fokussieren (mindestens 3 Std. bzw. 4000 Vh)
	Falsche Elektrophoreseparameter (V, mA, W)	Bedienungsanleitung beachten (3.1.)
	Falscher Auftragsort	Probenapplikatorstreifen genau 3 cm von dem äußeren anodischen Rand entfernt auflegen
	Nicht vorfokussiert	Vorfokussierung beachten
	Falsche Elektrodenlösung verwendet	Spezielle Lösungen nach Vorschrift verwenden
	Elektrodenlösungen oder Dochte vertauscht	Polarität beachten