

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVALYT™ PRECOTES™

SERVALYT™ PreNets™

Blank PRECOTES™

Blank PreNets™



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>

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1. SERVALYT™ PRECOTES™ und SERVALYT™ PreNets™	3
1.2. Blank PRECOTES™ und Blank PreNets™	5
2. Äquilibrieren von Blank PRECOTES™/PreNets™ mit SERVALYT™	
Trägerampholyten mit/ohne 8 M Harnstoff	6
2.1. Herstellen der Äquilibrier-Lösung	6
2.2. Äquilibriervorgang	6
2.3. Trocknen der Geloberfläche	6
2.4. Elektrophorese-Bedingungen	7
2.5. Bestell-Informationen zu SERVALYT™ Carrier Ampholytes	8
3. Elektrophorese	9
3.1. Probenvorbereitung	9
3.1. Standard-Fokussierprogramm, Kurzübersicht	10
3.2. Durchführung der Elektrophorese, schrittweises Vorgehen	10
4. Detektion	15
4.1. Proteinfärbung: SERVA Violet 17	15
4.2. Proteinfärbung: SERVA Blue W	16
4.3. Silberfärbung	17
5. Blotting der SERVALYT™ PreNets™	19
5.1. Tankblotting	19
5.2. Semidry Blotting	19
6. Troubleshooting	20
6.1. Elektrophorese	20
6.2. Färbung	21
6.3. Trennung	23

Vers. 0513

SERVALYT™, SERVALYT™ PRECOTES™, SERVALYT™ PreNets™, and GEL-FIX™ are trademarks of SERVA Electrophoresis GmbH. COOMASSIE™ is a trademark of ICI.

1. Allgemeine Hinweise

1.1. SERVALYT™ PRECOTES™ und SERVALYT™ PreNets™

SERVALYT™ PRECOTES™ sind gebrauchsfertig und für die horizontale Anwendung bestimmt. Es sind dünne Polyacrylamid-Gele, die zur mechanischen Unterstützung und einfacheren Handhabung an einen inerten Polyester-Film (**GEL-FIX™**) gebunden sind. Die Oberfläche ist gegen Austrocknung und Beschädigung mit einem dünnen Deckblatt (**GEL-FIX™ for Covers**) geschützt. Jedes **SERVALYT™ PRECOTES™**-Gel ist separat abgepackt. Haltbarkeit der Gele in ungeöffneter Packung: siehe Angabe auf dem Etikett (Verpackung). Die empfohlene Lagertemperatur beträgt 2 - 8 °C.

SERVALYT™ PreNets™ sind insbesondere für den auf die isoelektrische Fokussierung (IEF) folgenden Transfer der Proteine auf eine Membran (Blotting) geeignet. Sie sind gebrauchsfertig und für die horizontale Anwendung bestimmt. Es sind dünne Polyacrylamid-Gele, die – wie **SERVALYT™ PRECOTES™** – auf einen inerten Polyesterfilm (**GEL-FIX™**) gegossen sind und zur mechanischen Unterstützung zusätzlich eine verstärkende Netzstruktur (inertes **NetFix™**) enthalten, welche in die Gelschicht eingegossen ist. **SERVALYT™ PreNets™** Gele sind – im Gegensatz zu **SERVALYT™ PRECOTES™** – nicht kovalent an den Polyesterfilm gebunden; die Trägerfolie kann daher nach Beendigung der Elektrophorese leicht vom Gel entfernt werden. Die Handhabung ist unproblematisch, denn die eingegossene Netzstruktur stabilisiert mechanisch die Gelschicht und verhindert dadurch, dass das Gel beim Transfer zum Blotting reißt bzw. beschädigt wird und Probenbanden verloren gehen.

Die Fertiggele **SERVALYT™ PRECOTES™ /SERVALYT™ PreNets™** werden nach eigenen Verfahren von 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. Wenden Sie sich dabei bitte an SERVA Electrophoresis GmbH bzw. den zuständigen Distributor.

Eigenschaften / Spezifikationen

- Gebrauchsfertig, keine weitere Vorbereitung des Gels erforderlich
- Hohe Auflösung, scharfe Banden, reproduzierbare Ergebnisse
- Kurze Fokussierzeiten
- Rasche Färbe-/Entfärbezeiten
- Verschiedene Formate, Schichtdicken und pH-Schnitte erhältlich
- Gele können flexibel zurecht geschnitten werden
- Sichere Gelhandhabung bei anschließendem Blotting (**SERVALYT™ PreNets™**)
- Zur Dokumentation einfach an der Luft zu trocknen

Polymerkonzentration 5 % (T) Crosslinker (N,N'-methylen-bisacrylamid) 3 % (C)

SERVALYT™-Konzentration 5 %

**Material der Stützfolie
und Dicke**

Beschichtete Polyesterfolie (**GEL-FIX™** für PAGE), 180 µm

**Material der Deckfolie
und Dicke**

Hydrophobe Polyesterfolie (**GEL-FIX™** für Covers), 75 µm

Geldicke (PAG-Schicht) 0,15 mm bzw. 0,30 mm

Gelformate:

Standardgel, groß (nur **SERVALYT™ PRECOTES™**)

245 x 125 mm

Standardgel, mittel

125 x 125 mm

Packungsgrößen

Standardgele, 245 x 125 mm (nur **SERVALYT™ PRECOTES™**) 5 Stück pro Packung

Standardgele, 125 x 125 mm

5 Stück pro Packung

Hinweis: Die Packungen enthalten nur die Gele, jedoch keine Elektrodenlösungen, Papierelektrodendochte und Applikatorstreifen. Informationen zu diesen Produkten entnehmen Sie bitte der nachstehenden Tabelle bzw. unserem Hauptkatalog.

Produktname	Packungsgröße	Kat. Nr.	für Gelformat	
			245 x 125 mm	125 x 125 mm
Elektrodendochte, extra lang; 300 x 6 x 1 mm	100 Stück	42972.01	Ja	Nein
Elektrodendochte, lang 240 x 6 x 1 mm	100 Stück	42987.03	Ja	Nein
Elektrodendochte, Standardgröße, 120 x 6 x 1 mm	100 Stück	42988.01	Nein	Ja
Anodenflüssigkeit 3	50 ml	42984.03	Ja	Ja
Kathodenflüssigkeit 10	50 ml	42986.03	Ja	Ja

Applikatorstreifen: siehe Übersicht S. 15

1.2. Blank PRECOTES™ und Blank PreNets™

Die von SERVA entwickelten **Blank PRECOTES™** ermöglichen eine vielseitige Verwendung in der Isoelektrischen Fokussierung (IEF). **Blank PRECOTES™** sind dünne (0,3 mm) Polyacrylamid-Gele, gegossen auf Gel-Fix Trägerfolie, die die Polyacrylamid-Gelmatrix kovalent bindet. Die Gele enthalten Bis-Tris Puffer, pH 6,5. Diese nahezu „leeren“ Blank-Gele können an die Anforderungen des Benutzers leicht angepasst werden. Durch einfaches Äquilibrieren in einer Ampholyt-Lösung (einen Überblick an verfügbaren SERVALYTEN finden Sie auf Seite 11) Ihrer Wahl können Sie innerhalb von nur 30 Minuten die Gele mit dem gewünschten pH-Gradienten ausstatten; die gleichzeitige Zugabe von Harnstoff für denaturierende IEF ist ohne Einschränkung möglich. Die Auftrennung der Proteine ist mit diesen frisch äquilibrierten Gelen mindestens so gut wie mit gebrauchsfertigen Gelen für die IEF (z.B. **SERVALYT™ PRECOTES™**).

Möchten Sie die in der IEF getrennten Proteine nach der Elektrophorese blotten, sind **Blank PreNets™** die dafür bestens geeigneten Gele. Bei der Herstellung wird NetFix™ mit in die 0,3 mm dicke Gelmatrix eingegossen, wobei NetFix™ die Polyacrylamid-Matrix kovalent bindet. NetFix™ ist ein inertes Polyesternetz, das im Blotverfahren ohne Einschränkung für Proteine durchlässig ist und dank seiner netzartigen Struktur gleichzeitig den Gelen eine mechanische Stabilität gibt. Nach der Elektrophorese kann das Gel einfach von der nicht-bindenden Trägerfolie abgehoben und für den Transfer auf eine Membran Ihrer Wahl eingesetzt werden. Während des Vorgangs stützt das integrierte NetFix™ -Netz das Gel vor Schäden wie Zerreißen oder Dehnen. Sowohl Tank- als auch Semidry-Blotverfahren sind anwendbar. Die Transferzeiten sind dank der geringen Dicke der Gele kurz; so dauert der Transfer, z.B. im Semidry-Blotverfahren lediglich 30 Minuten. Alle anderen Handhabungen wie Äquilibrieren, Elektrophorese, Färben oder Trocknen der **PreNets™** sind identisch zu den Protokollen für **PRECOTES™**.

Vorteile der Blank PRECOTES™ / Blank PreNets™ sind:

- Durch einfaches Äquilibrieren ist jeder gewünschte pH-Bereich schnell verfügbar
- Geeignet für die IEF in sehr basischen pH-Bereichen
- Geeignet für die IEF in Anwesenheit von Harnstoff
- Ausgezeichnete Trenneigenschaften in der IEF
- Lange Haltbarkeit
- Als PreNets™ auch in Blotverfahren (Western Blot) einsetzbar

2. Äquilibrieren von Blank PRECOTES™/PreNets™ mit SERVALYT™ Trägerampholyten und mit/ohne 8 M Harnstoff

2.1. Herstellen der Äquilibrier-Lösung

	Gelformat 125 x 125 mm ohne Harnstoff	Gelformat 125 x 125 mm mit Harnstoff	Gelformat 245 x 125 mm ohne Harnstoff	Gelformat 245 x 125 mm mit Harnstoff
Harnstoff (Kat. Nr. 24524)	-	12 g	-	24 g
SERVALYT™ (nach Wahl)	2 ml	2 ml	4 ml	4 ml
Glycerol (99%; Kat. Nr. 23176)	2,5 ml	2,5 ml	5 ml	5 ml
H ₂ O, dest.	ad 25 ml	ad 25 ml	ad 50 ml	ad 50 ml

Die Äquilibrier-Lösung kann zweimal verwendet werden und ist bei RT ca. 1 Woche haltbar.

2.2. Äquilibriervorgang

- Deckfolie (bedruckt) vom Gel entfernen und das Gel mit der Gelseite nach unten in eine passende Schale legen, bei **PreNets™** zusätzlich die Trägerfolie entfernen
- Zunächst das Gel unter leichtem Schütteln ca. 5 min. in dest. H₂O waschen
- Nach dem Waschen das Gel mind. 30 min. lang unter leichtem Schütteln in der Äquilibrier-Lösung inkubieren

2.3. Trocknen der Geloberfläche

- Gel aus der Lösung nehmen, bei **PRECOTES™** Folienseite mit dest. H₂O abspülen und Gel zum Trocknen aufhängen
- Max. 25 -30 min. an der Luft trocknen (Vorsicht: bei Harnstoffgelen kristallisiert der Harnstoff bei längerer Trockenzeit aus!)
- Das Gel ist sofort für die IEF einsatzbereit
- Lagerung ohne Harnstoff: luftdicht verpackt bei 4°C mind. 1 Jahr lagerfähig
- Lagerung mit Harnstoff: luftdicht verpackt bei RT ca. 4 Wochen lagerfähig

Achtung: Bei längerer Lagerzeit zeigen die Gele, bedingt durch den Harnstoff Alterungserscheinungen wie schlechtere Gelhaftung, schlechtere Trennqualität. Bei Lagerung der Harnstoffgele im Kühlschrank kann der Harnstoff auskristallisieren; das Gel wird dadurch unbrauchbar!

2.4. Elektrophorese-Bedingungen

z.B. für 125 x 125 x 0,3 mm; Elektrodenabstand: 10 cm

	PRECOTES™ / PreNets™ ohne Harnstoff	PRECOTES™ / PreNets™ mit Harnstoff
Kühlung	5 °C	10 – 15 °C
Spannung	limitieren auf 2000V	limitieren auf 2000V
Stromstärke	limitieren auf ca. 4 mA	limitieren auf ca. 6 mA
Startspannung	mind. 250 - 300 V (über Stromstärke nachregeln)	mind. 300 - 350 V (über Stromstärke nachregeln)
Leistung	doppelter Wert der Anfangsstromstärke	doppelter Wert der Anfangsstromstärke
Dauer	ca. 500 Vh oder 3 h	ca. 500 Vh oder 3 h
Beispiel	Set: 2000V, 4 mA, 8 W, 5000 Vh Start: 300 V, 4 mA, 1 W Ende: 2000 V, 3 mA, 6 W, 5000 Vh	Set: 2000V, 6 mA, 12 W, 5000 Vh Start: 310 V, 6 mA, 2 W Ende: 2000 V, 5 mA, 10 W, 5000 Vh

Hinweis:

Bei äquilibrierten **Blank PRECOTES™** reduziert sich im Laufe der Elektrophorese die Anfangsstromstärke nicht wie bei **SERVALYT™ PRECOTES™** etwa um die Hälfte, sondern bleibt zunächst stabil, um dann gegen Ende minimal abzusinken. Ursache: Kein Salztransport, da APS- und TEMED-Reste während des Äquilibrierens entfernt wurden!

2.5. Bestellinformationen zu SERVALYT™ Carrier Ampholytes

Produkt	Kat. Nr.	Menge	Produkt	Kat. Nr.	Menge
SERVALYT™ 2 - 4	42902.01	10 ml	SERVALYT™ 4 - 9	42910.01	10 ml
	42902.02	25 ml		42910.02	25 ml
				42910.03	100 ml
SERVALYT™ 2 - 9 Seed-Mix	42935.01	10 ml	SERVALYT™ 5 - 6	42924.01	10 ml
	42935.02	25 ml		42924.02	25 ml
	42935.03	100 ml			
SERVALYT™ 2-11	42900.01	10 ml	SERVALYT™ 5 - 7	42905.01	10 ml
	42900.02	25 ml		42905.02	25 ml
SERVALYT™ 3 - 4	42922.01	10 ml	SERVALYT™ 5 - 7 PGM	42936.01	10 ml
	42922.02	25 ml		42936.02	25 ml
SERVALYT™ 3 - 5	42903.01	10 ml	SERVALYT™ 5 - 8	42949.01	10 ml
	42903.02	25 ml		42949.02	25 ml
SERVALYT™ 3 - 6	42944.01	10 ml	SERVALYT™ 5 - 9	42950.01	10 ml
	42944.02	25 ml		42950.02	25 ml
SERVALYT™ 3-10	42940.01	10 ml	SERVALYT™ 6 - 7	42915.01	10 ml
	42940.02	25 ml		42915.02	25 ml
SERVALYT™ 3-10 Iso-Dalt for 2DGE	42951.01	10 ml	SERVALYT™ 6 - 8	42906.01	10 ml
	42951.02	25 ml		42906.02	25 ml
SERVALYT™ 4 - 5	42923.01	10 ml	SERVALYT™ 6 - 9	42913.01	10 ml
	42923.02	25 ml		42913.02	25 ml
SERVALYT™ 4 - 6	42904.01	10 ml	SERVALYT™ 7 - 9	42907.01	10 ml
	42904.02	25 ml		42907.02	25 ml
SERVALYT™ 4 - 7	42948.01	10 ml	SERVALYT™ 9-11	42909.01	10 ml
	42948.02	25 ml		42909.02	25 ml

Für die Gelformate 125 x 125 mm werden 10 ml SERVALYT™, für 245 x 125 mm 25 ml benötigt.

3. Elektrophorese

3.1. Probenvorbereitung

3.1.1. SERVA Liquid Mix IEF Proteinstandard 3-10 (Kat. Nr. 39212.01)

- 5 µl der gebrauchsfertigen Markerlösung auftragen, bei anschließender Silberfärbung 5 µl einer 1:10-Verdünnung auftragen

3.1.2. SERVA IEF Proteinstandard 3-10 lyophilisiert (Kat. Nr. 39211.01)

- 10 mg Proteinmischung in 1ml demin. H₂O lösen
- Lösung für 5 min. bei 14.000 rpm zentrifugieren
- 5-10 µl des Überstandes auftragen, bei anschließender Silberfärbung 5 µl einer 1:10-Verdünnung auftragen

3.1.3. Proben

- Proteinkonzentration je nach Zahl der erwarteten Banden einstellen:

Färbung	Proteinkonzentration
SERVA Violet 17	0,1 – 5,0 mg/ml
SERVA Blau W, Coomassie	0,1 – 5,0 mg/ml
Silberfärbung	0,01 – 0,5 mg/ml

- Verdünnungen mit H₂O demin. oder 0.5 % SERVALYT™-Lösung (dem pH-Gradienten des verwendeten SERVALYT™ PRECOTES™-Gels / SERVALYT™ PreNets™-Gels entsprechend) vornehmen.
- Die Salzkonzentration der Proben soll < 50 mM sein. Die Proben ggf. durch Dialyse, Ultrafiltration oder Chromatographie entsalzen.
- Bei schlecht löslichen Proteinen evtl. Glycerin, Harnstoff und/oder nicht- bzw. zwitterionische Detergentien zusetzen.
- Proben 5 Minuten bei 14.000 rpm zur Entfernung von nicht löslichen Bestandteilen zentrifugieren
- Probenvolumen: 5 - 25 µl des Überstandes

3.2. Standard-Fokussierungsprogramm, Kurzübersicht

Elektrophorese-Parameter*	Gelformat	Schichtdicke [µm]	Spannung [V]	Stromstärke* [mA]	Leistung [W]
	125 x 125 mm	150	2000	3	6
	245 x 125 mm	150	2000	6	12
	125 x 125 mm	300	2000	6	12
	245 x 125 mm	300	2000	12	24

*Anfangsspannung ≥ 200 V

Elektrodenlösungen :	Anode:	Anodenlösung 3	Kat. Nr. 42984.03
	Kathode:	Kathodenlösung 10	Kat. Nr. 42986.03
Dauer :	2,5 h oder 3500 Vh	SERVALYT™ PRECOTES™-Gele SERVALYT™ PreNets™ –Gele pH 3 – 10	
	3,5 h oder 5000 Vh	alle anderen SERVALYT™ PRECOTES™-Gele SERVALYT™ PreNets™-Gele	
Kühlung :	5 °C		

3.3. Durchführung der Elektrophorese, schrittweises Vorgehen

Auflegen des SERVALYT™ PRECOTES™ / SERVALYT™ PreNets™-Gels

1. Vorkühlen der Kühlplatte auf 5 °C.
2. **SERVALYT™ PRECOTES™-Gel / SERVALYT™ PreNets™-Gel** der Kartonverpackung entnehmen (s. Abb.1) und an drei Seiten der Aluthenschweißnaht (zwei Längsseiten und eine Breitseite) mit einer Schere aufschneiden (s. Abb.2). Wenn nur ein Teil des Gels benötigt wird, kann es mit einer scharfen Schere zugeschnitten werden (Deckfolie vorher abnehmen). Das nicht verwendete Stück wieder abdecken und im Originalbeutel aufbewahren (Öffnung verschließen, damit das Gel nicht austrocknet).
Hinweis: Bei der Handhabung mit Polyacrylamidgelen sollten grundsätzlich Gummihandschuhe getragen werden.
3. Mit einer Pipette 1 - 2 ml Kerosin (Kat. Nr. 26940.01) oder Bayol F (Kat. Nr. 14500.01) in die Mitte der Kühlplatte aufbringen. Kerosin bzw. Bayol F dienen als Kühlvermittler zwischen Kühlplatte und **SERVALYT™ PRECOTES™ Gel** (s. Abb.3).
4. **SERVALYT™ PRECOTES™ / SERVALYT™ PreNets™-Gel** mit Deckfolie nach oben luftblasenfrei auf die Kühlplatte aufrollen (s. Abb.4). Die rote Markierung auf der Folie

zur Anode hin ausrichten. Eventuell überschüssiges Kerosin bzw. Bayol F mit einem saugfähigen Vliespapier an den Rändern entfernen. Zwischen **SERVALYT™ PRECOTES™ / SERVALYT™ PreNets™**-Gel und Kühlflüssigkeit soll sich die Schicht mit Wärmeübertragungsflüssigkeit luftblasenfrei und durchgehend erstrecken. Eingeschlossene Luftblasen durch vorsichtiges Hochheben/Absenken des Gels entfernen.

Elektrodendochte

5. Zwei Papierelektrodendochte (Kat. Nr. 42988.01) der Packung entnehmen und auf eine glatte saubere Fläche (z. B. Glasplatte) legen (s. Abb.5). Achten Sie darauf, dass die Dochte keinesfalls über das **SERVALYT™ PRECOTES™-Gel / SERVALYT™ PreNets™**-Gel seitlich hinausragen. Dies verursacht Nebenschlüsse und Verzerrungen im Gel. Dochte notfalls zurechtschneiden.
6. Die Elektrodendochte gleichmäßig mit jeweils 0,1 ml/cm Anodenlösung 3 (rote Verschlusskappe, Kat. Nr. 42984.03) bzw. Kathodenlösung 10 (schwarze Verschlusskappe, Kat. Nr. 42986.03) tränken.
Hinweis: Getränkte Elektrodendochte nicht mit trockenem Fließpapier abtupfen.
7. Deckfolie mit einer spitzen Pinzette behutsam vom Gel entfernen (s Abb.6).
8. Auflegen der getränkten Elektrodendochte auf das Gel (saubere Pinzette benutzen): Anodendocht auf den markierten roten Längsstreifen, Kathodendocht auf den markierten schwarzen Längsstreifen (s Abb.7).

Applikatorstreifen

Auswahl des Applikatorstreifens

Die Größe des Applikatorstreifen wird entsprechend dem Probenvolumen ausgewählt. Es stehen verschiedene Applikatorstreifen zur Auswahl:

Produkt (Material)	Kat. Nr. Anzahl pro Pckg.	Auftragsvolumen [µl]	max. Probenanzahl	Format Gesamt [mm]	Anwendung
Applikatorstreifen 7 x 1 mm (Silikon)	42989.01 (3 Stück)	10	24	Streifen mit 260 x 6 x 1 ¹	für Gele mit 245 mm Breite, Proben mit 10 - 30 mg/ml Proteingehalt
Applikatorstreifen 3,5 x 2 mm (Silikon)	42915.01 (6 Stück)	5 - 10	15	Streifen mit 100 x 6 x 1 ¹	für Gele mit 125 mm Breite, Proben mit 0,5 - 1 mg/ml Proteingehalt
Applikatorstreifen 2 x 3,5 mm (Silikon)	42914.01 (6 Stück)	5 - 10	19	Streifen mit 100 x 6 x 1 ¹	für Gele mit 125 mm Breite, bei stark ver- dünnten Proben mit 0,1-0,5 mg/ml Proteingehalt
Applikatorstreifen 3,5 x 2 mm (Silikon)	42899.01 (3 Stück)	5 - 10	43	Streifen mit 240 x 6 x 1 ¹	für Gele mit 245 mm Breite, Proben mit 0,5 - 1 mg/ml Proteingehalt
Applikatorstreifen -Kit (Silikon)	42937.02 (4x 1 Stück)				enthält je einen Streifen von Kat. Nr. 42989, 42915, 42914, 42899
Applikatorstücke (Spezialpapier)	42880.01 (200 Stück)	15 - 25		Einzelstück 10 x 5 ¹	für Spezial- anwendungen (Hp,PGM, etc.)

¹ Länge x Breite x Dicke

Hinweis zur Handhabung der Applikatorstreifen:

Applikatorstreifen können mehrfach verwendet werden. Vor der Verwendung gründlich mit destilliertem Wasser reinigen und trocknen. Der Streifen muss absolut sauber sein, da Staubteilchen und andere Verunreinigungen den Kontakt mit dem Gel stören und zum Verlaufen der Probe und damit zu Verzerrungen im Pherogramm führen.

Auflageort des Applikatorstreifens:

- Parallel zu den Elektrodendochten, quer über die gesamte Gelfläche
- In der Mitte des SERVALYT™ PRECOTES™ / SERVALYT™ PreNets™ bei unbekanntem Protein
- Gegen die Anode gerückt bei basischen Proteinen
- Gegen die Kathode gerückt bei sauren Proteinen
- Im Allgemeinen mind. 25 mm von den Elektroden entfernt

Verwendung von Papierstücken:

Auflegen der Papierprobenapplikatorstücke mit der Schmalseite zur Lafrichtung. Die Papierprobenapplikatorstücke können je nach Anforderung variabel oder in Linie auf dem Gel platziert werden.

Auftragen der Proben

9. Auflegen des Applikatorstreifens und Auftragen der Proben (s. Abb. 8): Applikatorstreifen an einem Ende auflegen und unter leichtem Druck auf das Gel aufrollen. Der Streifen darf nicht über das **SERVALYT™ PRECOTES™ / SERVALYT™ PreNets™** Gel hinausragen. Liegt der Streifen nicht gut auf, wird er wieder abgenommen, mit dest. Wasser abgespült, dann getrocknet und wieder aufgelegt. Vermeiden Sie Detergentien, denn sie können ein Verlaufen der Probe verursachen. Tragen Sie zur Kontrolle und Markierung 5 µl des SERVA Liquid Mix IEF Markers 3-10 (Kat. Nr. 39212.01) oder 10 µl einer aus dem lyophilisierten SERVA IEF Marker 3-10 (Kat. Nr. 39211.01) hergestellten Lösung auf. Die empfohlene Konzentration beträgt 10 mg/ml.

Start der Fokussierung

10. Auflegen der **Minus**-Elektrode auf den Kathodendocht. Auflegen der Plus Elektrode auf den Anodendocht (s. Abb.9).
11. Die beiden Elektroden müssen mit ausreichendem Druck auf die Dichte aufgesetzt sein, da sonst Verzerrungen im Anodenbereich auftreten. Bei Gelen im Format 125 x 125 mm sollte das Auflagegewicht ca. 300 g betragen. Legen Sie eventuell eine Glasplatte zur Beschwerung auf die Elektroden (s. Abb.10).
12. Gehäusedeckel der Kammer schließen und an Stromversorgungsgerät anschließen.
13. An der Spannungsquelle in Abhängigkeit von Gelformat und Schichtdicke folgende Parameter einstellen

Gelformat	Schichtdicke [µm]	Spannung [V]	Stromstärke* [mA]	Leistung [W]
125 x 125 mm	150	2000	3	6
245 x 125 mm	150	2000	6	12
125 x 125 mm	300	2000	6	12
245 x 125 mm	300	2000	12	24

*Ausgangsspannung \geq 200 V

14. Start der isoelektrischen Fokussierung.
15. Nach 3500 bzw. 5000 Vh oder 2,5 bzw. 3,5 Stunden ist die Elektrophorese beendet. Die Spannungsquelle wird abgeschaltet und die Kammer geöffnet. Entfernen Sie vorsichtig die Elektrodendochte und den Applikatorstreifen, und überführen Sie das SERVALYT™ PRECOTES™-Gel sofort in die Fixierung (s. Detektion, S. 18 bzw. das SERVALYT™ PreNets™- Gel in das Blotting (s. Blotting, S. 22).

Hinweis: Mit den empfohlenen Standardbedingungen lassen sich sehr gute Trennergebnisse erzielen. Die Dauer der Fokussierung kann durch Erhöhung der Stromstärke und vorsichtiger Steigerung der Leistung verkürzt werden. Die Leistung darf die angegebenen Werte jedoch nicht überschreiten, da sonst keine optimale Kühlung der Gele gewährleistet ist. In einigen Fällen kann auch durch Erhöhung der Endspannung (max. 2500 V) die Auflösung (Bandenschärfe) optimiert werden. Sind in Ihrer Probe Proteine mit einem Molekulargewicht von $M_r > 150.000$ Da enthalten, kann unter Umständen eine Erhöhung der Elektrophoresetemperatur auf 10 °C nützlich sein.

Wenn eine Vorfokussierung erforderlich ist (abhängig von der Art der Proben und individuell zu ermitteln) erfolgen die ersten 20 Minuten der Elektrophorese ohne Probe. Danach wird die Elektrophorese unterbrochen. Die Applikatorstreifen bzw. Probenapplikatorstücke werden aufgelegt und die Proben appliziert. Anschließend wird die Elektrophorese fortgesetzt. Der Applikatorstreifen kann während der gesamten Fokussierung auf dem Gel verbleiben. Probenapplikatorstücke hingegen werden nach weiteren 45 Minuten entfernt. Dazu erneut die Elektrophorese unterbrechen, Kammer öffnen und die Stücke mit einer spitzen Pinzette vorsichtig entfernen. Kammer wieder schließen und Elektrophorese fortsetzen.

4. Detektion

4.1. Proteinfärbung : SERVA Violet 17

4.1.1. Reagenzien und Lösungen

Fixierlösung	20% (w/v) Trichloressigsäure (Kat. Nr. 36913.01)
SERVA Violet 17	Lösen Sie 500 mg SERVA Violet 17 Pulver
Stammlösung 1*	(Kat. Nr. 35072.01) oder 20 Tabletten SERVA Violet 17 (Kat. Nr. 35075.01) in 250 ml demin. H ₂ O
Stammlösung 2	20% (w/v) Phosphorsäure: 70 ml einer 85% igen Phosphorsäure ad 500 ml demin. H ₂ O
Entfärbelösung	3% (w/v) Phosphorsäure: 20 ml einer 85% igen Phosphorsäure ad 1.000 ml demin. H ₂ O
Hinweis: Die kolloidale Violet 17-Färbelösung (SERVA Violet 17 Stammlösung 1) ist nur ca. 20 Minuten stabil und nicht wieder verwendbar.	

4.1.2. Durchführung

1 Fixierung Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Elektrodendochte mit einer Pinzette entfernt und das IEF-Gel sofort in 200 ml Fixierlösung überführt. Dauer: 20 Minuten

Hinweis: Zur besseren Fixierung und zur weiteren Färbung und Entfärbung sollte das SERVALYT™ PRECOTES™-Gel unbedingt mittels eines Schüttlers in den jeweiligen Lösungen mäßig (50 - 100 rpm) bewegt werden. Nach dreimaligem Gebrauch sollte die Trichloressigsäure fachgerecht entsorgt werden.

Beim Umgang mit Trichloressigsäure sollen grundsätzlich Schutzbrille und Gummihandschuhe getragen werden.

2 Spülen Nach der Fixierung wird das Gel in 200 ml H₂O demin. überführt. Dauer: 1 Minute

3 Färbung 100 ml Stammlösung 1 und 100 ml Stammlösung 2 direkt vor Gebrauch mischen und SERVALYT™ PRECOTES™-Gel färben. Dauer: 10 Minuten

4 Entfärben Geben Sie in 200 ml Entfärbelösung SERVALYT™ PRECOTES™-Gel, bis der Hintergrund klar ist. Dauer: 10 Minuten

5 Waschen SERVALYT™ PRECOTES™ 2 mal in 1 - 2 % (w/v) Glycerinlösung inkubieren. Dauer: 2 x 5 - 10 Minuten

6 Trocknen SERVALYT™ PRECOTES™ -Gel im warmen Luftstrom oder bei Raumtemperatur trocknen.

4.2. Proteinfärbung : SERVA Blue W

4.2.1. Reagenzien und Lösungen

Fixierlösung	20 % (w/v) Trichloressigsäure (Kat. Nr. 36913.01)
Färbelösung	Lösen Sie 100 mg SERVA Blue W (Kat. Nr. 35053.02) oder 4 Tabletten SERVA Blue W (Kat. Nr. 35054.01) in 250 ml H ₂ O demin. (gelagert bei Raumtemperatur ist die Lösung für mehrere Monate haltbar)
Entfärbelösung	0,4 % (w/v) Trichloressigsäure

4.2.2. Durchführung

1 Fixierung Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Elektrodendochte mit einer Pinzette entfernt und das IEF-Gel sofort in 200 ml Fixierlösung überführt.
Dauer: 20 Minuten

Hinweis: Zur besseren Fixierung und zur weiteren Färbung und Entfärbung sollte das SERVALYT™ PRECOTES™ -Gel unbedingt mittels eines Schüttlers in den jeweiligen Lösungen mäßig (50 - 100 rpm) bewegt werden. Nach dreimaligem Gebrauch sollte die Trichloressigsäure fachgerecht entsorgt werden.

Beim Umgang mit Trichloressigsäure sollen grundsätzlich Schutzbrille und Gummihandschuhe getragen werden.

2 Neutralisierung Neutralisieren Sie das Gel in H₂O demin.
Dauer: 1 Minute

3 Färbung Geben Sie 5 ml Fixierlösung zu 250 ml Färbelösung, färben Sie damit das Gel.
Dauer: 10 Minuten

4 Entfärbung Geben Sie das Gel in Entfärbelösung bis der Hintergrund klar ist.
Dauer: 2 - 3 x 10 Minuten

5 Waschen SERVALYT™ PRECOTES™ 2 mal in 1 - 2 % (w/v) Glycerinlösung inkubieren. Dauer: 2 x 5 - 10 Minuten

6 Trocknen Trocknen Sie das Gel im warmen Luftstrom oder bei Raumtemperatur.

4.3. Silberfärbung

Optimiertes Protokoll für **SERVALYT™ PRECOTES™** -Gel (0,15 bzw. 0,3 mm Geldicke)

4.3.1. Reagenzien und Lösungen

Fixierlösung I	20 % (w/v) Trichloressigsäure (Kat. Nr. 36913.01)
Fixierlösung II	80 ml Glutaraldehyd (25 %) (Kat. Nr. 23115.01) ad 1000 ml H ₂ O demin.
Waschlösung	300 ml Ethanol (100 %) (Kat. Nr. 11094.01) ad 1000 ml H ₂ O demin.
Vorbereitungslösung	40 mg Na ₂ S ₂ O ₃ ad 200 ml H ₂ O demin.
Färbelösung	200 mg AgNO ₃ (Kat. Nr. 35110.01) 75 µl Formaldehyd (37 %) ad 100 ml H ₂ O demin.
Entwicklungslösung	6 g Na ₂ CO ₃ (Kat. Nr. 30181.01) 10 mg Na ₂ S ₂ O ₃ 75 µl Formaldehyd (37 %) ad 100 ml H ₂ O demin.
Stopplösung	10 % (v/v) Essigsäure

4.3.2. Durchführung (bitte beachten Sie die Hinweise weiter unten)

- 1 Fixierung** Legen Sie das Gel in die Fixierlösung.
Dauer: 20 Minuten
- 2 Waschen** Waschen Sie das Gel mit der Waschlösung.
Dauer: 10 Minuten
- 3 Fixierung** Legen Sie das Gel in die Fixierlösung.
Dauer: 10 Minuten
- 4 Waschen** Waschen Sie das Gel mit der Waschlösung.
Dauer: 2 x 10 Minuten
- 5 Vorbereiten
der Färbung** Inkubieren Sie das Gel in der Vorbereitungslösung.
Dauer: 1 Minute
- 6 Spülen** Spülen Sie das Gel mit H₂O demin.
Dauer: 3 x 20 Sekunden
- 7 Färben** Geben Sie das Gel in die Färbelösung.
Dauer: 20 Minuten

8 Spülen	Behandeln Sie das Gel mit H ₂ O demin. Dauer: 2 x 20 Sekunden
9 Entwicklung	Lassen Sie die Entwicklerlösung so lange einwirken bis die Banden sichtbar sind.
10 Abstoppen	Legen Sie das Gel in die Stopplösung. Dauer: 5 Minuten
11 Wässern	SERVALYT™ PRECOTES™ 2 mal in 1 - 2 % (w/v) Glycerinlösung inkubieren. Dauer: 2 x 5 - 10 Minuten
12 Trocknen	Trocknen Sie das Gel im warmen Luftstrom oder bei Raumtemperatur.

4.3.3. Wichtige Hinweise zur Silberfärbung

- Verwenden Sie ausschließlich absolut saubere Färbewannen. Reste von Farbstoffen wie Coomassie. o.ä. in den Färbewannen können das Ergebnis nachteilig beeinflussen. Ideal sind Färbewannen aus Edelstahl oder Glas.
- Das Gel stets gleichmäßig mit einem Schüttler in der jeweiligen Lösung bewegen (50 - 100 rpm).
- 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.
- Waschzeiten exakt einhalten.

5. Blotting der SERVALYT™ PreNets™

Das Blotting der SERVALYT™ PreNets™ ist direkt nach der Elektrophorese durchzuführen. Dazu können Sie alle gängigen Transfermethoden anwenden.

5.1. Tankblotting

1 x Towbin Buffer for Western Blotting (Kat. Nr. 42558.01)	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol 0,05 - 0,1 % (w/v; optional) SDS
---	--

5.2. Semidry Blotting

5.2.1. Kontinuierlich: 0,5 x Laemmli Buffer (Kat. Nr. 42556.01)

5.2.2. Diskontinuierlich: Semi-dry Buffer Kit for Western Blotting
(Kat. Nr. 42559.01)

bestehend aus:

Anodenpuffer I: 0,3 M Tris, 20 % Methanol

Anodenpuffer II: 0,03 M Tris, 20 % Methanol

Kathodenpuffer III: 0,025 M Tris/HCl (pH 9,4)
0,04 M 6-Aminocaprinsäure
20 % (v/v) Methanol

Elektrophoreseparameter und Dauer entnehmen Sie bitte den Bedienungsanleitungen der Gerätehersteller. Führen Sie zur Kontrolle der Transferleistung eine Proteinfärbung von Membran (z.B. Ponceau S, Kat. Nr. 33427.01) und Gel (Durchführung siehe Kapitel 3.1 bzw. 3.2) durch.

6. Troubleshooting

6.1. Elektrophorese

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) reduzieren, Fokussierzeit verlängern
	Kühlung nicht ausreichend	Temperatur am Gerät und an der Kühlplatte prüfen, mögliche Luftblasen zwischen Gel und Kühlplatte entfernen
	Salzkonzentration der Probe zu hoch	Probe durch geeignete Maßnahmen (Dialyse, Ultra- oder Gelfiltration) entsalzen
	Elektrodenlösung oder Dochte vertauscht	Polarität beachten
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	Elektroden-dochte länger als das Gel	Dochte genau auf Gelgröße zuschneiden

6.2. Färbung

Erscheinungsbild	Mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
Gel löst sich von der Trägerfolie	Gel zu lange in TCA inkubiert	Gel wenn nötig in 50 % (M)Ethanol/10 % Eisessig lagern
Gel bricht während des Trocknens		Gel vor dem Trocknen in wässriger 1 - 2 % (w/v) Glycerinlösung inkubieren (2x 5 – 10 min).
SERVA Violet 17		
blauer Hintergrund	SERVALYT™ nicht vollständig entfernt	Fixierung in TCA verlängern, TCA nur 3 x wiederverwenden
blauer Niederschlag auf dem Gel	TCA präzipitiert den Farbstoff	Gel nach der Fixierung gründlich mit Wasser abspülen
grüner Hintergrund	Farbstoff-Konzentration zu niedrig	Stammlösung frisch herstellen, Farbstoff vollständig lösen
grüner Hintergrund; grünliche Banden, Verblässen beim Trocknen	Gel nicht ausreichend neutralisiert, pH-Wert nach dem Entfärben zu niedrig	Gel gründlich mit Wasser oder 1 % Glycerin waschen oder Gel erneut färben und gründlich neutralisieren
SERVA Blue W, Coomassie		
blauer Hintergrund	SERVALYT™ nicht vollständig entfernt	Fixierung in TCA verlängern, TCA nur 3 x wiederverwenden
	TCA präzipitiert den Farbstoff	Gel nach der Fixierung gründlich mit Wasser abspülen
	Färbelösung zu alt, Farbstoff präzipitiert	Färbelösung frisch ansetzen

Erscheinungsbild	Mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
Silberfärbung durchgehender brauner Streifen	Elektrodenlösung kontaminiert	stets frische Lösungen verwenden; Lösungen ggf. portionieren und einfrieren
gelblicher oder bräunlicher Hintergrund	Einwirkzeit der Silberionen zu lang, Waschzeit zu kurz	Zeiten verkürzen bzw. verlängern
keine Banden	Waschdauer zu lang, Silberionen wieder ausgewaschen	Waschzeit verkürzen

6.3. Trennung

Erscheinungsbild	Mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
pH-Gradient verschoben	Fokussierung zu lang	Fokussierung verkürzen
	Temperaturabhängigkeit der pK-Werte	empfohlene Temperatur einhalten
pH-Linien zeigen Wellenbildung	a) ohne Probe	
	Ungleichmäßiger Elektrodenkontakt	Elektroden evtl. mit Glasplatte beschweren
	Elektrodendochte ungleichmäßig oder zu stark getränkt	0,1 ml Lösung pro cm Dochtlänge verwenden
	Elektrodenlösung zu salzhaltig	stets empfohlene Lösungen verwenden
	b) mit Probe	
	aufgetragene Proteinmenge zu hoch, Gel überladen	Proteinmenge reduzieren: Auftragevolumen verringern oder Probe verdünnen
	aufgetragene Proteinmenge variiert von Spur zu Spur	nach Möglichkeit gleiche Proteinmengen oder in steigender Reihenfolge auftragen
aufgetragene Salzkonzentration variiert stark von Spur zur Spur	Protein möglichst in Puffer gleicher Konzentration lösen	
	Feldstärke bei Eintritt der Probe ins Gel zu hoch	Probenauftrag bis max. 600 V, ggf. Stromstärke reduzieren
Banden schleppen Streifen nach	schlecht lösliche oder präzipitierte Proteine/Salze in der Probe	Probe zentrifugieren
	Gel überladen	siehe oben
	Lipide in der Probe	Lipidkonzentration evtl. durch Ultrazentrifugation verringern, zwitter- oder nichtionische Detergenzien zusetzen

Erscheinungsbild	Mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
	Retardierung der Proteine durch Applikatorstreifen oder -stücke	Applikatorstreifen oder -stücke 30 - 40 Minuten nach Probenauftrag wieder vom Gel abnehmen
	Probe zu alt, denaturiert	Probe kurz vor der Elektrophorese vorbereiten, nicht zu häufig einfrieren und auftauen
	Proteine mit hohem Molekulargewicht haben pI nicht erreicht	länger fokussieren oder Gelmaterial mit größeren Poren, z.B. Agarose verwenden
Banden unscharf	Fokussierzeit zu kurz	Elektrophoresedauer erhöhen
	Endspannung zu niedrig	Einstellung an Spannungsquelle überprüfen; Probe zu salzhaltig, Endspannung wird nicht erreicht
	falscher Auftrageort	optimalen Auftrageort durch diagonales Auflegen des Applikatorstreifens ermitteln
	Fixierung nicht ausreichend	Fixierungsmethode überprüfen
Proteinbanden fehlen	Molekül zu groß	Agarosegele verwenden
	Proteine präzipitieren am Auftrageort	Applikator-Material variieren; pH-Wert des Auftrageorts ungünstig: Gel vorfokussieren und optimalen Auftrageort ermitteln
	Feldstärke bei Eintritt der Probe ins Gel zu hoch	Probenauftrag bis max. 600 V, ggf. Stromstärke reduzieren

Erscheinungsbild	Mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
Proteinbanden fehlen	Nachweisempfindlichkeit der verwendeten Detektionsmethode zu gering	Probenmenge erhöhen oder andere Detektionsmethode wählen z.B. Silberfärbung, Immunoblotting
Protein fokussiert in mehr als einer Bande	unterschiedliche Bindung von Cofaktoren oder Liganden	Protein vollständig sättigen, günstigsten Auftragsort wählen
	unterschiedliche Oxidationszustände	Probenvorbereitung überprüfen evtl. DTT o.ä. zusetzen
	unterschiedliche Konformationszustände (Oligomere oder Untereinheiten)	Elektrophorese evtl. unter denaturierenden Bedingungen (> 7 M Harnstoff) durchführen
	unterschiedliche Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung usw.	Probenvorbereitung ändern: z.B. Neuraminidase Behandlung
	Proteolytischer Abbau des Proteins	Probenvorbereitung ändern: Protease-Inhibitor zusetzen

SERVALYT™, SERVALYT™ PRECOTES™, SERVALYT™ PreNets™, and GEL-FIX™ are trademarks of SERVA Electrophoresis GmbH. COOMASSIE™ is a trademark of ICI.

Get Started with Isoelectric Focusing using SERVALYT™ PRECOTES™

Abb. / Figure 1

- Alles was für die IEF benötigt wird
- All what you need to run IEF



Abb. / Figure 2

- Beutel an drei Seiten aufschneiden
- Cut open bag along 3 sides



Abb. / Figure 3

- Etwas Kerosin auf die Kühlplatte geben
- Add kerosine to the cooling plate

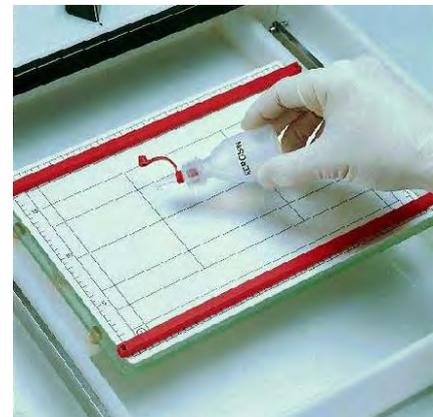


Abb. / Figure 4

- Gel auf die Kühlplatte auflegen
- Position gel on cooling plate



Get Started with Isoelectric Focusing using SERVALYT™ PRECOTES™

Abb. / Figure 5

- Dochte mit Elektrodenpufferlösung tränken (feucht, nicht naß)
- Apply electrode buffers to wicks (moist, not wet)



Abb. / Figure 6

- Deckfolie entfernen
- Peel off covers

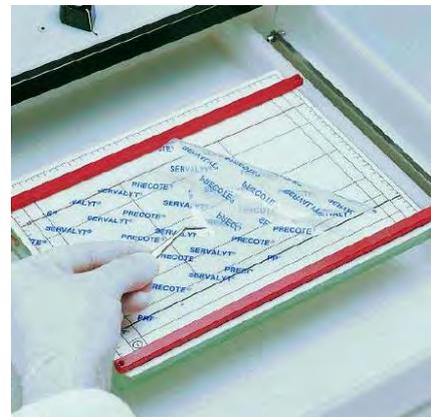


Abb. / Figure 7

- Befeuchtete Elektroden auf die Gelkanten auflegen
- Position buffer-soaked wicks at ends

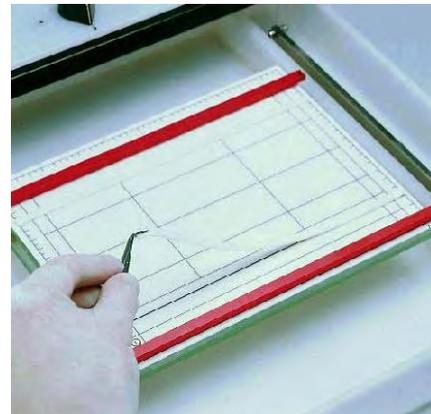
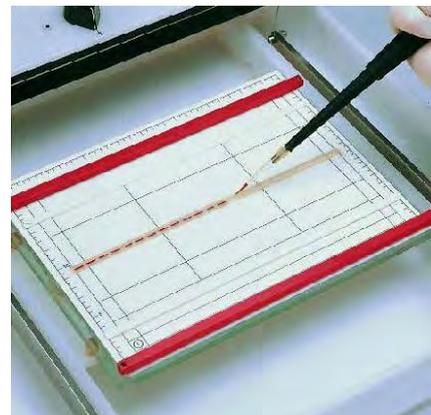


Abb. / Figure 8

- Applikatorstreifen auflegen
- Use an applicator strip and load samples



Get Started with Isoelectric Focusing using SERVALYT™ PRECOTES™

Abb. / Figure 9

- Elektroden auf die Dochte auflegen
- Place an electrode on top of wicks

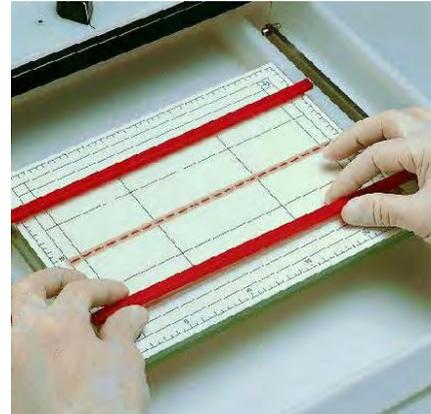


Abb. / Figure 10

- Eventuell eine Glasplatte auf die Elektroden legen und Elektrophorese starten
- Eventually put a heavy glass plate on top and start electrophoresis at given conditions

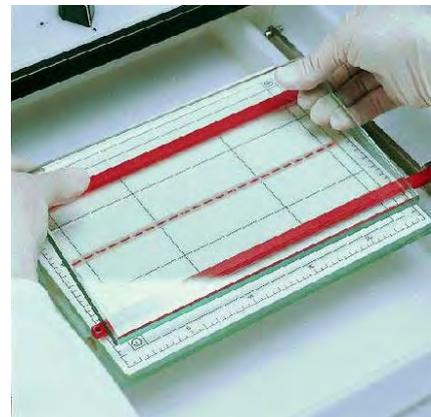


Abb. / Figure 11

- Färben nach beendeter IEF: siehe Text (4.1. ff)
- Stain upon completion of the IEF (see 4.1.)

