

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA^{Ge}™ Native PAGE Starter Kit Precast Vertical Gels for Electrophoresis

(Kat.-Nr. 43201.01)

SERVA
Electrophoresis

ERVA 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. SERVAGe™ Native PAGE Starter Kit	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Kitkomponenten	2
1.3. Zusammensetzung der Gele	3
1.4. Lagerbedingungen	4
2. Handhabung der Gelkassetten/Durchführung der Elektrophorese	4
3. Elektrophorese Protokoll	5
3.1. Trennbereich der Gele	5
3.2. Herstellen der Laufpuffer	5
3.3. Probenvorbereitung	6
3.3.1. Empfohlene Probenmenge	6
3.4. Elektrophoresebedingungen	6
4. Färbeprotokolle	6
4.1. Färbung mit SERVA Blau R	7
4.1.1. Reagenzien und Lösungen (nicht im Kit enthalten)	7
4.1.2. Durchführung	7
5. Problemlösungen	8
6. Appendix	9
7. Bestellinformationen	10

Ver. 03/07

1. SERVAGe™ Native PAGE Starter Kit

1.1. Allgemeine Hinweise

Der SERVAGe™ Native PAGE Starter Kit enthält neben gebrauchsfertigen Tris/Glycin-Gelen Elektrophorese-Lauf- und Probenpuffer zum Durchführen einer nativen Gelelektrophorese. Die enthaltenen SERVAGe™ TG Gele sind gebrauchsfertige Tris/Glycin-Gele für die vertikale Gelelektrophorese und sind für die diskontinuierliche Trennung nach Laemmli (Nature 277, 680 [1970]) geeignet. Die Gele enthalten kein SDS und können daher mit nativen Puffern verwendet werden. SERVA bietet homogene und Gradientengele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (T) an.

Vorteile der Gele 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 102, 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. Kitkomponenten

SERVAGe™ Tris/Glycin-Gele (Kat.-Nr. wählbar)	4 Stück
Schlüssel zum Öffnen der Kassetten	1 Stück
10x Towbin Running Buffer (Kat.-Nr. 42558)	400 ml
2x Tris/Glycine Native Sample Buffer (Kat.-Nr. 42528)	1 ml

Jedes Gel ist einzeln in einem Aluthenbeutel verpackt. Es ist durch eine mit Gelpuffer benetzte Lage Filterpapier gegen Austrocknung geschützt.

Kassette:

Außenmaß	10 cm x 10 cm
Anzahl der Probenaschen	12
Taschenvolumen	35 µl

Gel:

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

Hinweis:

Die für die anschließende Färbung der Gele benötigten Reagenzien sind nicht im Kit enthalten und müssen separat erworben werden.

Ein ausführliches Western Blotting-Protokoll für die SERVAGE™ TG Gele ist auf Anforderung erhältlich:

Tel. 06221/1384044 oder per E-mail: tech.service@serva.de

1.3. Zusammensetzung der Gele

SERVAGE™ TG Gele werden als homogene oder Gradientengele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (T) angeboten. Die Gele enthalten **kein SDS**. Durch die Wahl des entsprechenden Elektrophoresepuffers wird bestimmt, ob native oder denaturierende Bedingungen herrschen. Die Trennbereiche der Gele für Proteine sind der Tabelle 3.1. (Seite 8) zu entnehmen.

Acrylamid-Konzentration (T): 8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 %, 4 – 12 %, 8 – 16 %, 4 – 20 %

Quervernetzer-Konz. (C): 2,6 %

Sammelgel: 4 % T, 2,6 % C

Gelpuffer:

Sammelgel 125 mM Tris/HCl, pH 6,8

Trenngel 375 mM Tris/HCl, pH 8,8

1.4. Lagerbedingungen

Kitkomponente	Lagertemperatur
10x Towbin Running Buffer	+15 °C - +30 °C
SERVA Ge/™ TG Gele	2 – 8 °C
2x Tris/Glycine Native Sample Buffer	2 – 8 °C

Frieren Sie die Gele **nicht** ein und/oder setzen Sie sie **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 vermeiden 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 beigegefügt 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.

Die für die anschließende Färbung der Gele benötigten Reagenzien sind nicht im Kit enthalten und müssen separat erworben werden.

Ein ausführliches Western Blotting-Protokoll für die SERVAGE™ TG Gele ist auf Anforderung erhältlich:

Tel. 06221/1384044 oder per E-mail: tech.service@serva.de

3. Elektrophorese-Protokolle

3.1. Trennbereich der Gele

Hinweis: Der angegebene Trennbereich der Gele ist bestimmt in der SDS PAGE.

Acrylamidkonzentration (%)	Trennbereich (Mr 10 ³)
8	40 - 250
10	30 - 200
12	20 - 200
14	10 - 100
16	5 - 70
4 - 12	30 - 300
8 - 16	20 - 250
4 - 20	6 - 200

3.2. Herstellen der Laufpuffer

Verdünnen Sie den **10x Towbin Running Buffer** 1:10 (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 11).

3.3. Probenvorbereitung

- Mischen Sie Ihre Probe mit dem gleichen Volumen **2x Tris/Glycine Native Sample Buffer** (Zusammensetzung siehe Appendix, Seite 11). Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 35 µl. **Proben nicht erhitzen !**
- Spülen Sie die Taschen mit Laufpuffer.
- Tragen Sie die Proben auf und starten Sie die Elektrophorese.

3.3.1. Empfohlene Probenmenge

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

3.4. Elektrophoresebedingungen

Die Elektrophorese wird unter folgenden Bedingungen betrieben:

Limitierende Spannung: 130 V

Die Stromstärke wird dabei während des Laufes von anfangs ca. 15 mA/Gel auf ca. 5 mA absinken.

Dauer: abhängig von der Probe, eine bis mehrere Stunden. Es ist kein Standard-Protokoll verfügbar, sondern muss vom Anwender optimiert werden.

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 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

Fixierer	20 % (w/v) Trichloressigsäure (Kat.-Nr. 36913)
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:	Fixieren sie das Gel in 20 % (w/v) Trichloressigsäure für 30 Min., dann vor dem Färben für 1 Min. in H ₂ O dest. waschen.
Färbung	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. 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
Erscheinungsbild	mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
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)

6. Appendix

Zusammensetzung der Puffer:

10x Towbin Running Buffer

Komponenten	Konzentration
Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M

2x Tris/Glycine Native Sample Buffer

Komponenten	Konzentration
1 M Tris-HCl pH 6.8	0,126 M
Glycerin	20 %
0,1 % (w/v) Bromphenolblau	0,02 %
Wasser, deion.	

7. Bestellinformationen

Fertiggele	Kat-Nr.
SERVAGel™ TG 8 %Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43208.01
SERVAGel™ TG 8 %Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43208.02
SERVAGel™ TG 8 %Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43208.03
SERVAGel™ TG 10 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43210.01
SERVAGel™ TG 10 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43210.02
SERVAGel™ TG 10 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43210.03
SERVAGel™ TG 12 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43212.01
SERVAGel™ TG 12 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43212.02
SERVAGel™ TG 12 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43212.03
SERVAGel™ TG 14 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43214.01
SERVAGel™ TG 14 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43214.02
SERVAGel™ TG 14 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43214.03
SERVAGel™ TG 16 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43216.01
SERVAGel™ TG 16 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43216.02
SERVAGel™ TG 16 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43216.03
SERVAGel™ TG 4 - 20 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43230.01
SERVAGel™ TG 4 - 20 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43230.02
SERVAGel™ TG 4 - 20 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43230.03
SERVAGel™ TG 8 - 16 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43231.01
SERVAGel™ TG 8 - 16 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43231.02
SERVAGel™ TG 8 - 16 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43231.03
SERVAGel™ TG 4 - 12 % Tris-Glycine (10 Fertiggele)	43232.01
SERVAGel™ TG 4 - 12 % Tris-Glycine (6 Fertiggele)	43232.02
SERVAGel™ TG 4 - 12 % Tris-Glycine (2 Fertiggele)	43232.03
Geräte	
BlueVertical Mini Slab Gel System BV 102	BV 102
Blue Power 500 Plus Power Supply	BP-500Plus
BlueBlot Wet 100 Tank Blotter (10 x 10 cm)	BB 100
BlueFlash Semi-Dry Blotter Medium (15 x 15 cm)	BF-M
Proteinmarker	
Protein MW Standards for Native PAGE (12 – 450 kDa)	39064.01
Färbereagenzien und -kits:	
SERVA <i>Densi</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 Native PAGE (25 Minigele)	35077.01
SERVA Blue G	35050
SERVA Blue R	35051
Amido black 10 B (50 g)	12310.01
Ponceau S solution (0,2 %, 500 ml)	33427.01
Silver nitrate	35110

Puffer etc.	
SERVA Tris-Glycine native electrophoresis buffer (10x)	42530
SERVA Tris-Glycine native sample buffer (2x)	42528
Puffer etc.	
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
Ethanol, undenatured, absolute	11093
Glycerol	23176
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.