

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVAGe/™ IEF 3-10 Starter Kit Precast Vertical Gels for Isoelectric Focusing

(Kat.-Nr. 43205.01)



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>

Inhaltsverzeichnis

1.	SERVAGe/™ IEF 3-10 Starter Kit	2
1.1.	Allgemeine Hinweise	5
1.2.	Kitkomponenten	3
1.3.	Lagerbedingungen	4
2.	Handhabung der Gelkassetten/Durchführung der Elektrophorese	5
3.	Standard-IEF Protokoll	6
3.1.	Herstellung der Laufpuffer	6
3.1.1.	Kathodenpuffer	6
3.1.2.	Anodenpuffer	6
3.2.	Probenvorbereitung für die IEF	6
3.3.	Elektrophoresebedingungen	6
4.	NEPHGE Protokoll	7
4.1.	Herstellen der Laufpuffer	7
4.2.	Vorbereitung der NEPHGE	7
4.3.	NEPHGE Bedingungen	7
5.	Färbung mit SERVA Violet 17	8
5.1.	Reagenzien und Lösungen	8
5.2.	Durchführung	8
6.	Appendix	9
7.	Bestellinformationen	10

1. SERVAGe/™ IEF 3-10 Gel Starter Kit

1.1. Allgemeine Hinweise

Der SERVAGe/™ IEF 3-10 Starter Kit enthält neben den gebrauchsfertigen Gelen für die vertikale IEF auch Elektrophorese-Anoden- und Kathodenpuffer sowie Probenpuffer.

Vorteile der Gele für den Anwender:

- einfache und schnelle Handhabung
- hohe Auflösung, scharfe Banden, beste Reproduzierbarkeit
- hergestellt mit Chemikalien höchster Qualität
- Gele werden in unzerbrechliche, gegen Auslaufen sicher versiegelte Plastikkassetten gegossen
- Einzel in Aluthenbeutel verpackte und gegen Austrocknung geschützte Gele
- 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. Hoefer Mighty Small™ SE 260, Hoefer miniVE™, 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. Kit-Kponenten

SERVAGe™ IEF 3-10 (Kat.-Nr. 43239/43240/43242)	4 Stück
Schlüssel zum Öffnen der Kassetten	1 Stück
SERVA IEF anode buffer (Kat.-Nr. 42541)	14,5 g
SERVA IEF cathode buffer (Kat.-Nr. 42540)	6,4 g
SERVA IEF Marker 3-10 Liquid Mix (Kat.-Nr. 39212)	30 µl
IEF sample buffer (2x) (Kat.-Nr. 42537)	2x 1 ml
SERVA Violet 17 (Kat.-Nr. 35072)	0,5 g

Kassette:

Außenmaß	10 cm x 10 cm
Anzahl der Probentaschen	10 / 12 / 15
Taschenvolumen	50 µl / 35 µl / 20 µl

Gel:

Material	Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid
Schichtdicke	1 mm

Hinweis:

Trichloressigsäure und Phosphorsäure für die Färbung der Gele sind nicht im Kit enthalten. Diese Produkte müssen separat erworben werden.

1.3. Lagerbedingungen

Kitkomponente	Lagertemperatur
SERVAGe/™ IEF 3-10	+ 2 °C - + 8 °C
SERVA IEF anode und cathode buffer	+15 °C - +30 °C
IEF sample buffer (2x)	+ 2 °C - + 8 °C
SERVA IEF Marker 3-10 Liquid Mix	+ 2 °C - + 8 °C
SERVA Violet 17	+15 °C - +30 °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.

Der angesetzte Anode Buffer sollte bei Raumtemperatur gelagert werden, da es sonst zur Ausfällung der Glutaminsäure kommt.

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 °C - + 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. Kathodenpuffer in die innere Pufferkammer einfüllen, Kamm gleichmäßig aus dem Gel ziehen, mögliche Gelreste oberhalb der Probetaschen entfernen, **Geltaschen gut ausspülen**, dabei Luftblasen vermeiden bzw. entfernen. Anodenpuffer in die äußere Pufferkammer füllen.
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 beigefügten 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.

3. Standard-IEF Protokoll

3.1. Herstellen der Laufpuffer

3.1.1. Kathodenpuffer

Lösen Sie **SERVA IEF cathode buffer** in **1 l** bidest. Wasser. Für das Füllen des inneren Kathodentanks sind normalerweise 200 ml ausreichend.

3.1.2. Anodenpuffer

Setzen Sie den Anodenpuffer **mindestens eine Stunde vor Beginn** der IEF an, damit eine vollständige Lösung des Pulvers erreicht wird.

Lösen Sie **SERVA IEF anode buffer** in einem geeigneten Gefäß in **2,5 l** bidest. Wasser unter Rühren bei Raumtemperatur.

Für das vollständige Füllen der äußeren Pufferkammer sind je nach Gerät ca. 500 ml Puffer notwendig.

Wichtig: Verwenden Sie nur den von SERVA angegebenen Anodenpuffer. Die Verwendung von Phosphorsäure als Anodenpuffer führt zu massiven Störungen während der IEF!

Bitte achten Sie außerdem auf ausreichende Kühlung der Gele. Die Temperatur des Laufpuffers sollte bei 20 °C liegen.

3.2. Probenvorbereitung für IEF

- Mischen Sie Ihre Probe zu gleichen Volumenteilen mit **IEF Probenpuffer**. Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 50 µl (10 Probentaschen) und 35 µl (12 Probentaschen). **Proben nicht erhitzen!**
- Spülen Sie die Taschen mit Kathodenpuffer.
- Tragen Sie die Proben auf und starten Sie die Elektrophorese.

3.3. Elektrophoresebedingungen

Die IEF wird unter folgenden Bedingungen betrieben:

Spannung:

60 min $U = 100 \text{ V} = \text{konst.}$

60 min $U = 200 \text{ V} = \text{konst.}$

30 min $U = 500 \text{ V} = \text{konst.}$

Die Stromstärke wird dabei während des Laufes von anfangs ca. 8 mA/Gel bei 100 V auf ca. 6 mA absinken.

4. NEPHGE Protokoll

Hinweis: Die Polaritäten bei dieser Elektrophorese entsprechen nicht der Standard-IEF, sondern erfordern eine Umkehrung.

Bitte achten Sie außerdem auf ausreichende Kühlung der Gele. Die Temperatur des Laufpuffers sollte bei 20 °C liegen.

4.1. Herstellen der Laufpuffer

Als Anodenpuffer (1x) wird eine 40 mM Glutaminsäurelösung verwendet. Der Kathodenpuffer (1x) besteht aus 20 mM NaOH.

4.2. Vorbereitung der NEPHGE

- Mischen Sie Ihre Probe zu gleichen Volumenteilen mit **IEF Probenpuffer**. Das maximale Volumen pro Tasche beträgt 50 µl (10 Probentaschen) und 35 µl (12 Probentaschen). **Proben nicht erhitzen!**
- Füllen Sie den Anodenpuffer in die innere Pufferkammer und spülen Sie die Taschen mit Anodenpuffer.
- Die äußere Pufferkammer mit Kathodenpuffer komplett füllen.
- Tragen Sie die Proben anodisch auf.
- Verbinden Sie die innere Pufferkammer mit der Anode (+ Pol) und die äußere Pufferkammer mit der Kathode (- Pol) und starten Sie die Elektrophorese.

4.3. NEPHGE Bedingungen

Die NEPHGE wird unter folgenden Bedingungen betrieben:

Spannung:

60 min $U = 100 \text{ V} = \text{konst.}$

20 min $U = 200 \text{ V} = \text{konst.}$

5 min* $U = 500 \text{ V} = \text{konst.}$

*Die Zeit kann probenabhängig auf 10 min erhöht werden. Cytochrom C (pI = 10,7) ist dann nicht mehr im Gel zu detektieren.

5. Färbung mit SERVA Violet 17

5.1. Reagenzien und Lösungen

Fixierer	20 % (w/v) Trichloressigsäure (Kat.-Nr. 36913)
Stammlösung 1	0,2 % SERVA Violet 17 in H ₂ O dest. (100 mg SERVA Violet 17 in 50 ml H ₂ O dest. lösen)
Stammlösung 2	20 % (w/v) Phosphorsäure (140 ml 85 % H ₃ PO ₄ , auf 1000 ml H ₂ O)
Entfärber	3 % (w/v) Phosphorsäure (20 ml 85 % H ₃ PO ₄ , auf 1000 ml H ₂ O)
Konservierungslsg.	30 % (v/v) Ethanol, 5 % (w/v) Glycerin

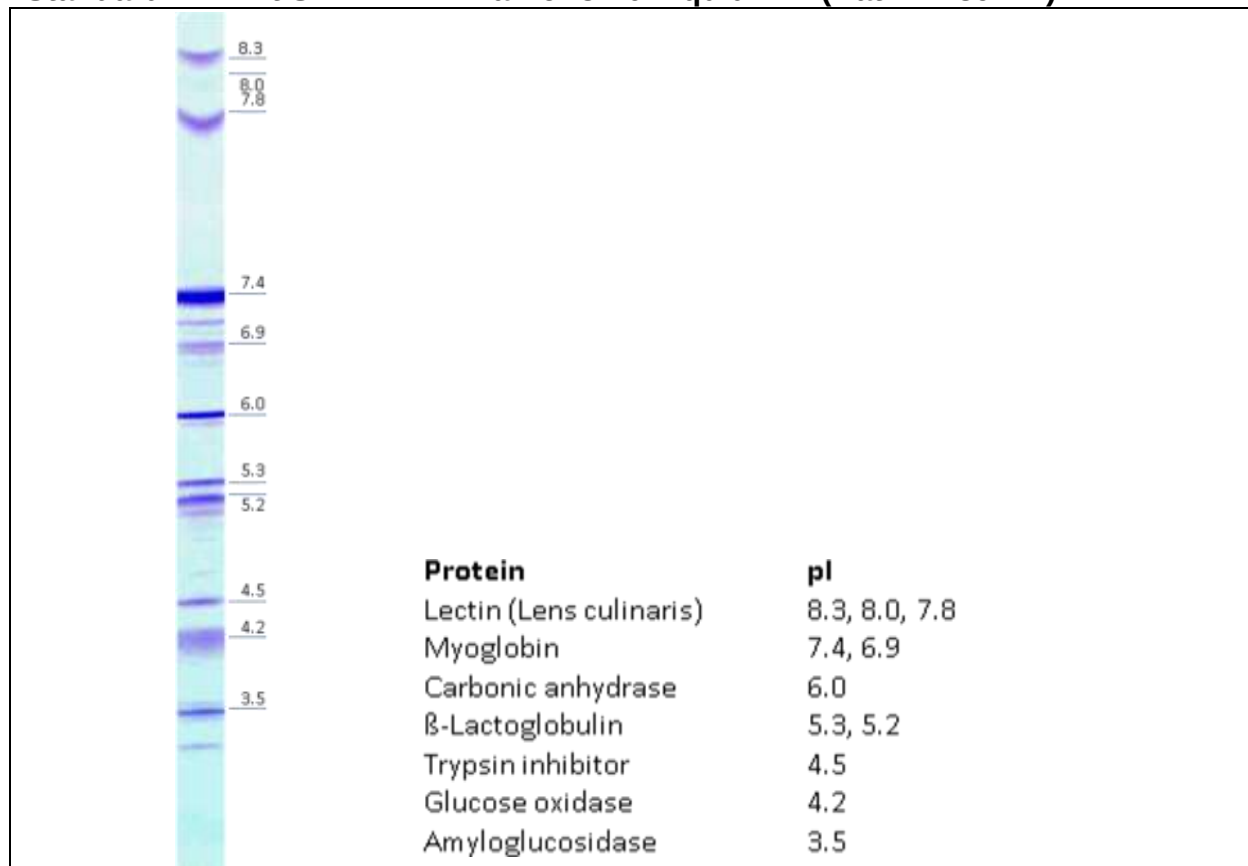
5.2. Durchführung

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.

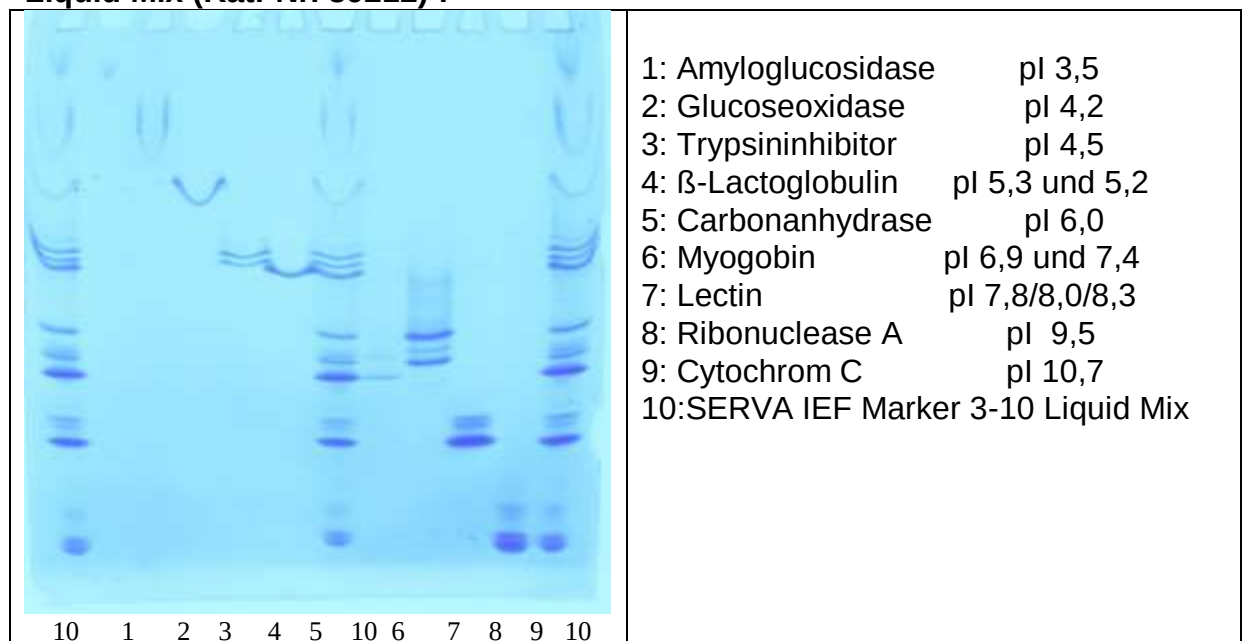
Fixierung:	Fixieren sie das Gel in 20 % (w/v) Trichloressigsäure für 20 Min., dann vor dem Färben für 1 Min. in H ₂ O dest. waschen.
Färbung	Stammlösungen 1 und 2 werden zu gleichen Teilen gemischt und das Gel 10 Min. und länger darin inkubiert.
Entfärben	Gel nach dem Färbebad eine Minute mit dest. Wasser spülen und anschließend in Entfärber geben bis der Hintergrund klar ist.
Konservieren	Gel über Nacht in Konservierungslösung inkubieren. Das Gel kann anschließend in einem Trocknungsrahmen getrocknet werden.

6. Appendix

Standard-IEF mit SERVA IEF Marker 3-10 Liquid Mix (Kat.-Nr. 39212) :



NEPHGE mit verschiedenen Markerproteinen und SERVA IEF Marker 3-10 Liquid Mix (Kat.-Nr. 39212) :



7. Bestellinformationen

Produkt	Kat.-Nr.
Fertiggele	
SERVAGel™ IEF 3-10, 12 wells (10 Fertiggele)	43240.01
SERVAGel™ IEF 3-10, 12 wells (2 Fertiggele)	43240.03
SERVAGel™ IEF 3-10, 10 wells (10 Fertiggele)	43242.01
SERVAGel™ IEF 3-10, 10 wells (2 Fertiggele)	43242.03
SERVAGel™N 3-12, Vertical Native Gel 3-12 % 12 wells (10 Fertiggele)	43250.01
Weitere Informationen zu den SERVAGel™ Fertiggele finden Sie auf unserer Website www.serva.de	
Geräte	
BlueVertical PriME™ Mini Slab Gel System BV 102	BV 102
Blue Power 500x4 Power Supply	BP-500x4
BlueFlash Semi-Dry Blotter Medium (15 x 15 cm)	BF-M
Proteinmarker	
SERVA IEF Marker 3-10, Liquid Mix	39212.01
Protein Test Mixture for pI-Determination pH 3-10, lyophil.	39211.01
Färbereagenzien und -kits:	
SERVA DensiStain 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.	
SERVAGel™ IEF Running Buffer Kit	42539.01
IEF Sample Buffer (2 x)	42537.01
Towbin buffer 10x, for Western Blotting	42558
Semi-Dry Blotting Buffer kit (3 x 500 ml)	42559
Membranen	
Immobilon™-P-membrane (PVDF), 26,5 cm x 3,75 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42574.01
Fluorobind (PVDF), 25 cm x 3 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42571.01

Mighty Small™ and miniVE™ sind Warenzeichen von Hoefer Inc.
 Coomassie® ist ein Warenzeichen von ICI Ltd.
 Immobilon™ ist ein Warenzeichen von Millipore Corp.