

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA Ge/™ TG PRiME™, 2D

Precast Vertical Gels for Electrophoresis

(Kat.-Nr.43281)



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. SERVAGEL™ TG PRIME™, 2D | 2 |
| 1.1. Allgemeine Hinweise | 2 |
| 1.2. Lieferumfang und Produktbeschreibung | 3 |
| 1.3. Zusammensetzung der Gele | 3 |
| 1.4. Lagerbedingungen | 3 |
| 2. HANDHABUNG DER GELKASSETTEN/DURCHFÜHRUNG DER | 4 |
| ELEKTROPHORESE | 4 |
| 3. ELEKTROPHORESE | 5 |
| 3.1. Äquilibrieren des IPG-Streifens | 5 |
| 3.1.1. Reagenzien und Lösungen | 5 |
| 3.1.2. Durchführung | 5 |
| 3.2. Durchführung der 2. Dimension – vertikale SDS-PAGE | 6 |
| 3.2.1. Herstellen des Laufpuffers | 6 |
| 3.2.2. SDS-PAGE | 6 |
| 4. FÄRBEPROTOKOLLE | 7 |
| 4.1. Färbung mit SERVA Blau R | 8 |
| 4.1.1. Reagenzien und Lösungen | 8 |
| 4.1.2. Durchführung | 8 |
| 4.2.1. Reagenzien und Lösungen | 9 |
| 4.2.2. Durchführung | 9 |
| 5. PROTEINTRANSFER | 10 |
| 5.1. Tankblotting | 11 |
| 5.2. Semi-Dry Blotting | 11 |
| 6. KURZANLEITUNG FÜR 1. DIMENSION MIT SERVA IPGBLUE STRIPS | 13 |
| 6.1. Rehydratation (in der Rehydrationskammer) | 13 |
| 6.2. In-Gel-Rehydratation der Probe | 13 |
| 7. PROBLEMLÖSUNGEN | 14 |
| 8. BESTELLINFORMATIONEN | 15 |

Ver. 02/13

1. SERVAGe™ TG PRiME™, 2D

1.1. Allgemeine Hinweise

SERVAGe™ TG PRiME™ Gele sind gebrauchsfertige Tris-Glycin-Gele für die vertikale Gelelektrophorese. Sie sind für die schnelle (35 min) diskontinuierliche Trennung nach Laemmli (Nature 277, 680 [1970]) geeignet und zeichnen sich durch lange Haltbarkeit aus.

Vorteile des Produktes 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 BlueVertica™ PRiME™, Hoefer Mighty Small™ SE 260, Hoefer miniVE™ SE 300, 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, diese Lot-Nummer zusammen mit der Katalog-Nummer anzugeben.

1.2. Lieferumfang und Produktbeschreibung

Packungsgröße:

| | |
|-------------------|------------------|
| Kat.-Nr. 43281.01 | Box mit 10 Gelen |
| Kat.-Nr. 43281.03 | Box mit 2 Gelen |

Jedes Gel ist einzeln in einem Aluthenbeutel verpackt. Es ist durch eine mit Gelpuffer benetzte Lage Filterpapier gegen Austrocknung geschützt. Ein Schlüssel zum Öffnen der Kassetten ist jeder Packung Gele beigelegt.

Kassette:

| | |
|-------------------------|----------------|
| Außenmaß | 10 cm x 10 cm |
| Anzahl der Probenaschen | eine 2D Tasche |

Gel:

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

1.3. Zusammensetzung der Gele

SERVAGe™ TG PRiME™ Gele enthalten **kein SDS**. Der Trennbereich der Gele für denaturierte Proteine ist der Tabelle 3.1. zu entnehmen.

Acrylamid-Konzentration (T): 8 – 16 %

1.4. Lagerbedingungen

Lagern Sie die Gele bei 2 – 8 °C. Frieren Sie die Gele **nicht** ein und/oder setzen Sie die Gele nicht längere Zeit 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 und 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 Kassetten 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 Transfer eingesetzt werden.

3. Elektrophorese

Die zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese beinhaltet die Reduktion und Alkylierung der auf dem IPG-Streifen fokussierten Proteine in Äquilibriumspuffer, das Auflegen des Streifens auf das Gel der 2. Dimension und die Durchführung der SDS-PAGE.

Sicherheitshinweis:

Tragen Sie aus Sicherheitsgründen grundsätzlich geeignete Schutzhandschuhe und -kleidung, wenn Sie mit den Gelen, IPG-Streifen und den dazugehörigen Lösungen arbeiten.

3.1. Äquilibrieren des IPG-Streifens

3.1.1. Reagenzien und Lösungen

Äquilibrium-Lösung (50 mM Tris/HCl pH 8,8, 6M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau)

| Komponenten | Konzentration | Menge (auf 100 ml) |
|---|---------------|--------------------|
| 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 | 0,05 M | 3,3 ml |
| Harnstoff (Kat.-Nr. 24524) | 6,0 M | 36 g |
| 100 % Glycerin (Kat.-Nr. 23176) | 30 % | 30 g |
| 20 % SDS-Lösung (Kat.-Nr. 20767) | 2 % | 10 ml |
| Bromphenolblau-Na-Salz (Kat.-Nr. 15375) | 0,01 % | 10 mg |
| H ₂ O dest. | | Ad 100 ml |

Füllen Sie die Lösung in 10 ml-Portionen ab und lagern Sie sie bei –20 °C für max. 3 Monate. Einmal aufgetaute, **nicht verbrauchte** Lösung **verwerfen!**

Reduktionsreagenz: 1 % (w/v) Dithiothreitol (DTT, Kat.-Nr. 20710)

Alkylierungsreagenz: 5 % (w/v) Jodacetamid (Kat.-Nr. 26710)

3.1.2. Durchführung

Die Äquilibriumsschritte erfolgen jeweils in einem festverschlossenen Plastikröhrchen unter leichtem Schütteln auf einem Schüttler.

1. Äquilibriumsschritt

Inkubieren Sie den Streifen 10 – 15 Min. in Äquilibrium-Lösung + 1 % (w/v) DTT bei Raumtemperatur.

Dekantieren Sie die Lösung.

2. Äquilibrierschritt

Äquilibrier-Lösung + 5 % (w/v) Jodacetamid (= 260 mM) (Kat.-Nr. 26710) zufügen und Streifen für 10 – 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.

Dekantieren Sie die Lösung und verwenden Sie die äquilibrierten IPG-Streifen sofort für die SDS-PAGE.

3.2. Durchführung der 2. Dimension – vertikale SDS-PAGE

3.2.1. Herstellen des Laufpuffers

Verdünnen Sie den 10x Laemmli Buffer for SDS PAGE 1:10 (Kat.-Nr. 42556; Zusammensetzung siehe Tabelle), der pH-Wert liegt bei ca.8,8.

| Komponenten | Konzentration | Menge |
|-------------|---------------|---------|
| Tris | 0,25 M | 30 g/l |
| Glycin | 1,92 M | 144 g/l |
| SDS | 1 % | 10 g/l |

3.2.2. SDS-PAGE

1. 0,5 % Agarose in 1x Lämmli-Elektrophorese-Laufpuffer aufkochen und auf 60 °C abkühlen lassen. Agaroselösung bis zur Verwendung warm halten.
2. SERVAGe™ TG PRiME™ 2D-Gel 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.
3. Geltasche mit Laufpuffer ausspülen, danach entleeren
4. 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.
5. Den äquilibrierten IPG-Streifen kurz in 1x Lämmli-Elektrophoreselaufpuffer tauchen.
6. Den Streifen mit Hilfe eines dünnen Spatels in die Kassette auf das Gel schieben und so ausrichten, dass der Streifen luftblasenfrei am Gel aufliegt.
7. Vorsichtig mit der 0,5 %igen Agaroselösung bis zum Kassettenrand auffüllen und damit den Streifen fixieren.

8. Wenn die Agarose erstarrt ist, Elektrophoresepuffer in die Pufferkammern einfüllen.
9. Elektrophoresekammer schließen und mit der Spannungsquelle verbinden. Spannungsquelle einschalten und Elektrophorese starten.

Bedingungen:

| | |
|--------------------------------|--|
| Einstellung Spannung | 300 V |
| Einstellung Stromstärke | 10 min: 10 mA / Gel ca. 50 min: 25 mA / Gel |
| Zeit | ca. 60 min |

10. Nach Beendigung der Elektrophorese Spannungsquelle ausschalten, Verbindung zur Elektrophoresekammer unterbrechen, Elektrophoresepuffer entfernen und Kassette entnehmen.
11. 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.
12. 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.

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 SDS PAGE (Kat.-Nr. 35076.01) bzw. für native Gele den SERVA Silver Staining Kit Native PAGE (Kat.-Nr. 35077.01).

Sie können auch andere wie z.B. die in Abschnitt 4.1. beschriebenen Färbeprotokolle einsetzen:

4.1. Färbung mit SERVA Blau R

4.1.1. Reagenzien und Lösungen

| | |
|---------------------------|--|
| 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/Färbung | Fixierung und Färbung erfolgen in einem Schritt. 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 1 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. |

4.2. Silberfärbung (Blum et al., modifiziert)

(Electrophoresis 1987, 8, 93-99)

4.2.1. Reagenzien und Lösungen

| | |
|----------------------------|--|
| Fixierlösung | 20 % (v/v) Ethanol (Kat.-Nr. 11094), 5 % (v/v) Essigsäure |
| Waschlösung | 30 % (v/v) Ethanol |
| Vorbereitungslösung | 0,02 % Natriumthiosulfat-Lösung ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 200 mg/l) |
| Färbelösung | 0,2 % Silbernitrat-Lösung (AgNO_3 , 2 g/l) |
| Entwicklungslösung | 6 % Natriumcarbonat-Lösung (Na_2CO_3 , 60 g/l, Kat.-Nr. 30181) + 100 μl Formaldehyd (37 %) auf 200 ml Lösung |
| Stopplösung | 10 % (v/v) Essigsäure |
| Konservierungslsg. | 3 % (w/v) Glycerin (Kat.-Nr. 23176) |

4.2.2. Durchführung

Sicherheitshinweis: Die Chemikalien sind leicht entzündlich, toxisch und umweltgefährdend. Die Vorschriften beim Umgang mit Gefahrstoffen sind zu beachten. Während der gesamten Prozedur sollte grundsätzlich Schutzbrille, Handschuhe und entsprechende Arbeitskleidung getragen werden.

Für ein optimales Färbeergergebnis beachten Sie bitte folgende Hinweise:

- Für die Handhabung der Gele nur Handschuhe benutzen, die mit deionisiertem Wasser gespült wurden.
- Nur saubere Färbeschalen (idealerweise aus Glas) verwenden.
- Benutzen Sie die Färbeschalen nur für die Silberfärbung.
- Stellen Sie sicher, dass das Gel in der Färbeschale während des Schüttelns frei beweglich und vollständig in der Lösung untergetaucht ist.
- Berühren Sie das Gel nicht mit bloßen Händen oder Metallgegenständen und üben Sie keinen Druck auf das Gel aus während der Handhabung oder beim Austausch der Lösungen.
- Verwenden Sie Teflon-Magnetrührer und saubere Glasbehälter für die Herstellung der Lösungen.
- Färbelösung und Entwickler kurz vor Gebrauch herstellen.

Die folgenden Färbeschritte werden mit je 100 ml Lösung pro Gel auf einem Schüttler durchgeführt (50 – 100 rpm).

| Schritte | Lösungen | Dauer |
|------------------|---|-----------------------------|
| 1. Fixieren | 20 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure | ≥ 40 Min. |
| 2. Waschen | 30 % (v/v) Ethanol | 2 x 20 Min. |
| 3. Vorbehandeln | 0,02 % Natriumthiosulfat-Lösung (Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O, 200mg/l) | exakt 2 Min. |
| 4. Waschen | H ₂ O dest. | 3 x 20 Sek. |
| 5. Färben | 0,2 % Silbernitrat-Lösung | 40 Min. |
| 6. Waschen | H ₂ O dest. | 2 x 20 Sek. |
| 7. Entwickeln | 6 % Natriumcarbonat-Lsg. + 100 µl/200 ml Formaldehyd (37 %) | nach Sicht, ca. 2 - 10 Min. |
| 8. Waschen | H ₂ O dest. | 1 x 20 Sek. |
| 9. Abstoppen | 10 % (v/v) Essigsäure | 10 Min. |
| 10. Konservieren | 3 % (w/v) Glycerin | 20 Min./über Nacht |

5. Proteintransfer

Sicherheitshinweis:

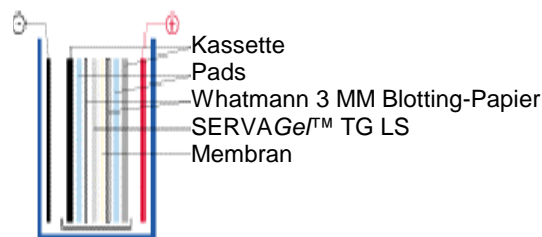
Tragen Sie aus Sicherheitsgründen grundsätzlich geeignete Schutzhandschuhe und -kleidung, wenn Sie mit Gelen und Pufferlösungen arbeiten.

SERVAGe™ TG PRIME™ Gele können im Tankblotter oder im Semi-Dry-Blotsystem geblottet werden. Dabei können kontinuierliche und diskontinuierliche Puffersysteme zum Einsatz kommen.

Hinweis: Beachten Sie bitte bezüglich der Transferparameter und Dauer die Angaben des Geräteherstellers (insbesondere die Angaben bezüglich max. Stromstärke und max. Spannung des Gerätes). Die Blottingdauer ist abhängig von Größe und Ladung der zu transferierenden Proteine und muss bei jeder Probe optimiert werden. Bei Markerproteinen mit mittleren Molekulargrößen ist eine Transferzeit von 60 min ausreichend.

5.1. Tankblotting

1. Schneiden Sie die Transfermembran und vier Blatt Whatmann 3 MM Papier auf Gelgröße (7 x 8 cm).
2. Äquilibrieren Sie die Membran in Transferpuffer (Towbin-Puffer, Kat.-Nr. 42558). Bei der Verwendung von PVDF-Membranen zunächst für 2 Minuten in Methanol und anschließend für weitere 5 Minuten in Transferpuffer äquilibrieren.
3. Befeuchten Sie die porösen Pads sowie die vier Blatt Whatmann 3 MM Papier ebenfalls mit Transferpuffer.
4. Entnehmen Sie das Gel der Kassette (siehe Abschnitt 2) und äquilibrieren Sie das Gel für 5 Minuten in Transferpuffer.
5. Bauen Sie das Transfersandwich auf und setzen Sie es in den Tankblotter.



6. Der Transfer erfolgt bei Raumtemperatur bei 250 mA bzw. ca. 60 V für ca. 1 - 2 Stunden (für Standardmarkerproteine).

5.2. Semi-Dry Blotting

1. Schneiden Sie die Transfermembran und vier Blatt Whatmann 3 MM Papier auf Gelgröße (7 x 8 cm).
2. Äquilibrieren Sie die Membran in Transferpuffer (Towbin-Puffer, Kat.-Nr. 42558) bzw. bei der Verwendung von PVDF-Membranen zunächst für 2 Minuten in Methanol und anschließend für weitere 5 Minuten in Transferpuffer.
3. Befeuchten Sie die vier Blatt Whatmann 3 MM Papier ebenfalls mit Transferpuffer.
3. Entnehmen Sie das Gel der Kassette (siehe Abschnitt 2) und äquilibrieren Sie das Gel für 5 Minuten in Transferpuffer.
4. Bauen Sie das Transfersandwich analog zum Tankblot-Sandwich auf, und platzieren Sie es im Semi-Dry-Blotter.

5. Der Transfer erfolgt bei Raumtemperatur mit 0,8 - 1,5 mA/cm² Gelfläche für ca. 1 Stunde (für Standardmarkerproteine).

Beim Transfer von unterschiedlich großen Proteinen empfiehlt sich der Einsatz eines diskontinuierlichen Blotting-Puffersystems (SERVA Semi-Dry Blotting Kit, Kat.-Nr. 42559.01).

Nach dem Transfer können die Proteine auf der Membran angefärbt werden:

- **Nachweis mit Ponceau S-Lösung** (0,2 %, Kat.-Nr. 33427): Die gewaschene Membran mit der gebrauchsfertigen Ponceau S-Lösung überschichten und ca. 5 Min. lang unter leichtem Schütteln färben. Den Hintergrund mit H₂O dest. entfärben bis die roten Banden klar sichtbar sind.
- **Färben mit Amidoschwarz**: Dazu werden die Membranen für 5 Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung (1 % Amidoschwarz in 40 % Ethanol und 10 % Eisessig 1:10 verdünnen) inkubiert und anschließend in Entfärbelösung (40 % Ethanol, 10 % Eisessig und 2 % Glycerin) entfärbt.
Hinweis: Amidoschwarz ist keine reversible Färbung, jedoch empfindlicher im Nachweis als Ponceau S, vergleichbar mit einer Coomassie[®] Brilliant Blau R Färbung.

6. Kurzanleitung für 1. Dimension mit SERVA IPG *Blue* Strips

SERVA IPG *Blue* Strips werden für hochauflösende 2D-Gelelektrophorese eingesetzt und garantieren einen stabilen, reproduzierbaren Gradienten für IEF. Eine ausführliche Anleitung für die SERVA IPG *Blue* Strips finden Sie auf unserer Webseite www.serva.de oder kontaktieren Sie unseren Technischen Service.

6.1. Rehydration (in der Rehydrationskammer)

Rehydrations-/Probenpuffer:

Zur Optimierung der Rehydration schwieriger Proben ist in Klammern ein Konzentrationsbereich für die Pufferkomponenten angegeben.

| Components | Cat. No. | Concentration | Amount |
|-------------|----------|--------------------|----------|
| Harnstoff* | 24524 | 8 M (8 - 9 M) | 4.8 g |
| CHAPS | 17038 | 1 % (1 - 4 %) | 100 mg |
| DTT | 20710 | 13 mM (13 -100 mM) | 20 mg |
| Servalyt** | | | |
| pH 3-10 | 42940 | 0.5 % (absolut) | 50 µl |
| pH 4-7 | 42948 | | |
| pH 6-9 | 42913 | | |
| pH 3-6 | 42944 | | |
| pH 5-8 | 42949 | | |
| Water dest. | | | ad 10 ml |

*ersetzbar mit bis zu 25 % Thioharnstoff

**40 %, passend zum pH-Bereich des IPG *Blue* Strips

1. Streifen in **130 µl Rehydrationspuffer** so eintauchen, dass die Flüssigkeit gleichmäßig und Luftblasen-frei über die gesamte Länge des Streifens verteilt wird.
2. Nach Absorption der Lösung (ca. 5-10 Min.) überschichten Sie den Streifen mit 1 - 2 ml Serva HPE IPG Cover Fluid (Kat.-Nr. 43397) und rehydratisieren für mind. 6 Stunden (vorzugsweise über Nacht) bei Raumtemperatur.

6.2. In-Gel-Rehydration der Probe

5 - 300 µg Gesamtprotein in Rehydrationspuffer lösen und inkubieren Sie den Gelstreifen darin.

Cup Loading

Rehydratisieren Sie den Streifen ohne Probe, vor der IEF laden Sie **5 - 300 µg Gesamtprotein** auf den Gelstreifen mittels einer Silikonauftragstasche oder ähnlichem (Applikationsort ist abhängig vom Gradient und der Probe).

7. 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 |
| Spots sind unscharf | 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 |
| | Streifen auf Gel verschoben | Streifen nach Erstkontakt mit Gel nicht mehr verschieben |
| Streifenbildung | lipophile Substanzen oder Nukleinsäuren in der Probe | Substanzen vor der 1. Dimension entfernen, evtl. SDS-Konzentration erhöhen |

8. Bestellinformationen

| Fertiggele | Kat-Nr. |
|--|----------------|
| SERVA Gel™ Neutral HSE 2D (10 Fertiggele) | 43247.01 |
| SERVA Gel™ Neutral HSE 2D (2 Fertiggele) | 43247.03 |
| SERVA Gel™ TG PRiME™ 12 2D (10 Fertiggele) | 43268.01 |
| SERVA Gel™ TG PRiME™ 12 2D (2 Fertiggele) | 43268.03 |
| SERVA Gel™ TG PRiME™ 14 2D (10 Fertiggele) | 43271.01 |
| SERVA Gel™ TG PRiME™ 14 2D (2 Fertiggele) | 43271.03 |
| SERVA Gel™ TG PRiME™ 8-16 2D (10 Fertiggele) | 43281.01 |
| SERVA Gel™ TG PRiME™ 8-16 2D (2 Fertiggele) | 43281.03 |
| SERVA IPG BlueStrip 3-10/7 cm | 43001.01 |
| SERVA IPG BlueStrip 3-10 NL/7 cm | 43002.01 |
| SERVA IPG BlueStrip 3-6/7 cm | 43005.01 |
| SERVA IPG BlueStrip 4-7/7 cm | 43003.01 |
| SERVA IPG BlueStrip 5-8/7 cm | 43006.01 |
| SERVA IPG BlueStrip 6-10/7 cm | 43004.01 |
| | |
| Geräte | |
| BlueVertical™ PRiME™ Mini Slab Gel System | BV 104 |
| Blue Power 500x4 Power Supply | BP-500x4 |
| BlueFlash Semi-Dry Blotter Medium (15 x 15 cm) | BF-M |
| Rehydration tray for IPG BlueStrips | 43091 |
| BlueHorizon™ Super Cool Flatbed System | BH-2C |
| BluePower 3000x4 power supply | BP-3000x4 |
| Circulatory Refrigerator Bath WK 230 | WK230 |
| | |
| Proteinmarker | |
| SERVA Protein Test Mixture 6 for SDS PAGE (6.5 – 97.4 kDa) | 39207.01 |
| SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker (6 – 200 kDa) | 39215.01 |
| SERVA Prestained SDS PAGE Protein Marker (6 – 200 kDa) | 39216.01 |
| SERVA Recombinant SDS PAGE Protein Marker (10 – 150 kDa) | 39217.01 |
| SERVA Recombinant SDS PAGE Protein Marker PLUS (10 – 150 kDa) | 39218.01 |
| Protein MW Standards for Native PAGE (12 – 450 kDa) | 39064.01 |
| SERVA Proteome Markers | 39220.01 |
| | |
| 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 SDS PAGE (25 Minigele) | 35076.01 |
| 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/SDS electrophoresis buffer (10x) | 42529 |
| SERVA Tris-Glycine/SDS sample buffer (2x) | 42527 |
| SERVA Tris-Glycine native electrophoresis buffer (10x) | 42530 |
| SERVA Tris-Glycine native sample buffer (2x) | 42528 |
| Laemmli buffer for SDS PAGE (10x) | 42556 |
| 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 |
| Brompophenol blue, sodium salt | 15375 |
| Dithiothreitol | 20710 |
| Iodoacetamide | 26710 |
| Ethanol, undenatured, absolute | 11093 |
| Glycerol | 23176 |
| 2-Mercaptoethanol | 28625 |
| SDS in Pellets | 20765 |
| SDS solution, 20 % (w/v) | 20767 |
| Trichloroacetic acid, 20 % solution | 36913 |
| Silicone DC 200 fluid 10 cst | 35132 |
| Urea | 24524 |
| CHAPS | 17038 |
| Triton® X-100 | 39795 |
| SERVALYT™ pH 3-10 | 42940 |
| SERVALYT™ pH 4-7 | 42948 |
| SERVALYT™ pH 5-8 | 42949 |
| SERVALYT™ pH 6-9 | 42913 |
| SERVALYT™ pH 3-6 | 42944 |
| | |
| Membranen | |
| Immobilon (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.