

Bedienungsanleitung: 1D Elektrophorese mit dem SERVA SDS Urine Gel Kit 25 S

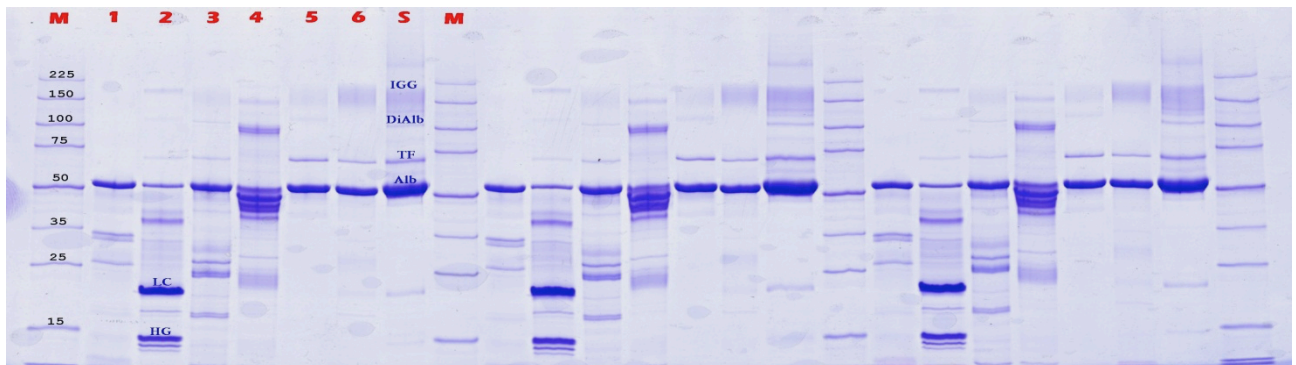


Abb. 1: Urinproteine getrennt in einem SDS-Gel 10% 25S (Proben von Dr. Chr. Weber, Krankenhaus Reinkenheide, Bremerhaven), M: Marker, S: Serum, 1,3: tubuläre Proteine, 2: Bence Jones Paraproteine, 4: nichtselektive glomeruläre und tubuläre Proteine, 5,6: glomeruläre Proteine. Coomassie Blau Färbung

Der SDS Urine Gel Kit 25 S enthält SDS-Polyacrylamid-Fertiggele, Laufpuffer, Elektrodendochte, und einen 10x konzentrierten Probenpuffer („sample diluter“). Die Gele sind auf eine Trägerfolie aufpolymerisiert, haben eine Größe von 25 x 12,5 cm und eine Dicke von 0,45 mm, und enthalten 25 Probenwannen für je 15 µL Probe („sample slots, 25S“). Um eine lange Haltbarkeit der Gele zu ermöglichen und für die optimale Auftrennung wird ein Tris-Tricine Puffersystem verwendet, bei welchem der Gelpuffer einen pH-Wert unter 7 hat.

Bestellinformation:

SDS Urine Gel Kit 25 S Kat.-Nr. 43391.01
4 Gele inkl. 10 x conc. Probenpuffer, Elektrodenpuffer und -dochte.

Cooling fluid 50 mL Kat.-Nr. 43371.01

SERVA HPE™ Coomassie Staining Kit, Kat.-Nr. 43396.01

Probenvorbereitung

Probenkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der Proben müssen für die elektrophoretische Trennung in einem bestimmten Bereich eingestellt werden. Wenn der Proteingehalt zu niedrig ist, können die Proteine nicht nachgewiesen werden; zu hoher Proteingehalt führt zu Überladungseffekten wodurch die Proteinbanden unscharf werden. Physiologischer Urin hat eine niedrige Proteinkonzentration, dann ist nur eine schwache Albuminbande detektierbar. Der eingesetzte Proteinkonzentrationsbereich hängt von der Empfindlichkeit der Färbetechnik ab:

Coomassie Blau Färbung:

Diese Methode ist nicht sehr empfindlich, aber die Proteine sind dabei quantifizierbar.
Proteinmenge pro Slot mit 15 µL Probenvolumen: 3 µg (200 mg/L = 20 mg/dL)

Silberfärbung:





Sehr hohe Empfindlichkeit, aber die Quantifizierung ist nicht zuverlässig.
Proteinmenge pro Slot mit 15 µL Probenvolumen: 0,3 µg (20 mg/L = 2 mg/dL)

Probenpuffer „10x conc“:

15 mL Probenpuffer 10x sind in diesem Kit enthalten. 10% (v/v) dieses „10 x conc“ Puffers wird zur Probe zugegeben (siehe Tabelle 1). Dadurch werden die Proben nur geringfügig verdünnt. Dieser Probenpuffer ist nicht reduzierend!

Bitte beachten Sie bei Proben mit hohem Proteingehalt: Geben sie nicht mehr als 5 µg pro Slot auf. Wenn nötig, können die Proben mit H₂O dest. verdünnt werden, um Überladungseffekte zu vermeiden. Anschließend werden 10% des 10x Probenpuffers zum Probenvolumen zugegeben. Reduzieren Sie die Urin-SDS-Protein nicht!

Tab. 1: Verdünnung der Urinproben Coomassie Blau Färbung

Protein Konzentration	Test - Stick	Urin	H ₂ O _{bidest}	10x Probenpuffer
negativ		90 µL	—	10 µL
0.3 g/L = 30 mg/dL		45 µL	45 µL	10 µL
1 g/L = 100 mg/dL		20 µL	70 µL	10 µL
5 g/L = 500 mg/dL		5 µL	85 µL	10 µL

Reduzieren Sie die Proben nicht

Eine Reduktion mit β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol löst die Quartärstruktur der Immunglobuline auf. Unter nichtreduzierenden Bedingungen haben die IgGs ein Molekulargewicht von 160 kDa; nach Reduzierung erhält man die schweren Ketten mit 43 kDa und die leichten Ketten mit 20 kDa.

Urinproteine sollen mit intakten IgG-Quartärstrukturen getrennt werden! Dabei ist aber zu beachten, dass die Laufstrecken der Protein nicht exakt proportional zum Logarithmus der Molekülgrößen sind: Weil die Schwefelbrücken nicht aufgespalten werden, können sich die Polypeptide nicht vollständig auffalten. Sie können zum Vergleich in einer Spur Humanalbumin und Immunglobuline mitlaufen lassen.

Erhitzen auf 95°C für 3 Minuten



Zur vollständigen Beladen der Proteine mit SDS sollten die SDS-Proben 3 Minuten auf 95 °C erhitzt werden. Am besten funktioniert das mittels einem 1,5 mL Mikroreagenzgefäß in einem passenden Heizgerät. Dadurch werden alle Proteine gleichmäßig mit negativer Ladungen versehen, so dass man nach der Elektrophorese die Molekülgrößen der über den Urin ausgeschiedenen Proteine abschätzen kann.

Elektrophorese

Wichtig: verwenden Sie ausschließlich die Elektrophoresepuffer aus dem SERVA Kit.

1. Legen Sie zwei Elektrodendochte in die Vertiefungen des PaperPool. Geben Sie 45 mL des jeweiligen Elektrodenpuffers auf die Dochte und verteilen Sie die Lösung gleichmäßig mit einem Roller (Abb. 2).

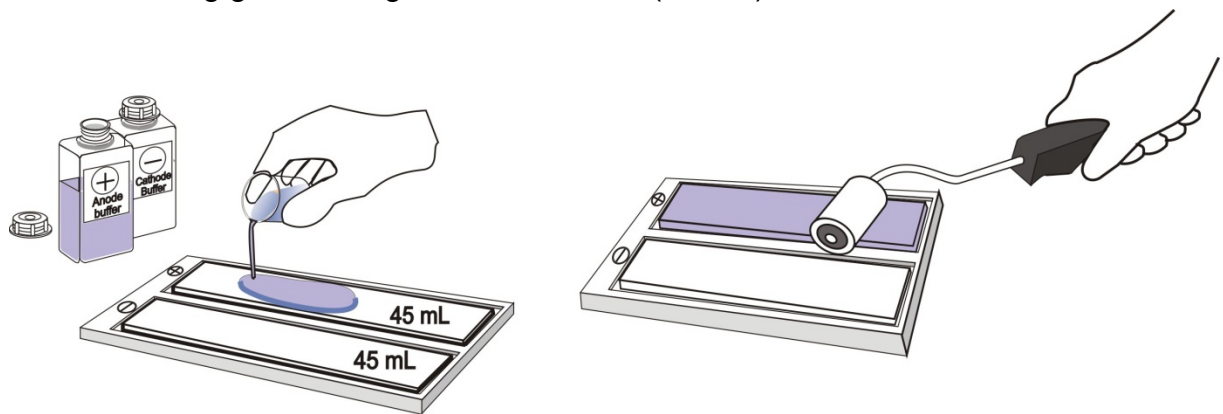


Abb. 2: Tränken der Elektrodendochte mit Laufpuffer und Ausrollen zur gleichmäßigen Verteilung.

2. Pipettieren Sie 3 mL Kühlkontaktflüssigkeit (Kerosin oder SERVA Cooling Contact Fluid) auf die Kühlplatte.
3. Nehmen Sie das Gel aus der Packung. Entfernen Sie die Deckfolie. Nehmen Sie das Gel (Gelfläche nach oben) an den beiden seitlichen Kanten der überstehenden Trägerfolie; biegen Sie das Gel zu einem "U" und verteilen Sie die Kühlkontaktflüssigkeit gleichmäßig auf der Kühlplatte indem Sie die Unterseite der Folie mehrfach nach links und rechts hin und her schieben (siehe Abbildung 3).

Entfernen Sie gegebenenfalls überschüssige Kühlkontaktflüssigkeit mit einem fusselfreien Papiertuch.

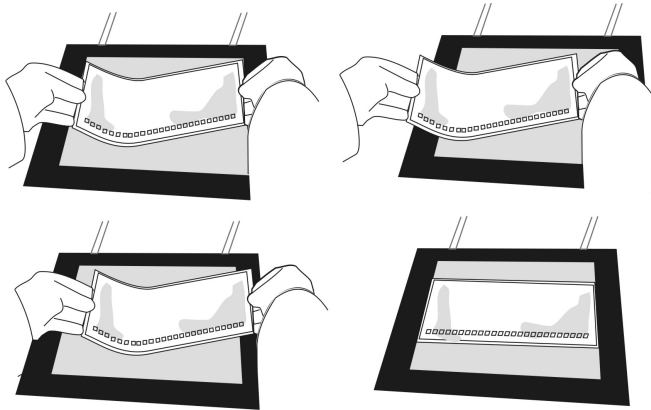


Abb. 3: Auflegen des Geles auf die Kühlplatte.

4. Entfernen Sie überschüssigen Elektrodenpuffer von den Dochten indem Sie die Dochte hochklappen und mit der unteren Kante auf den Boden des PaperPools klopfen (siehe Abbildung 4).

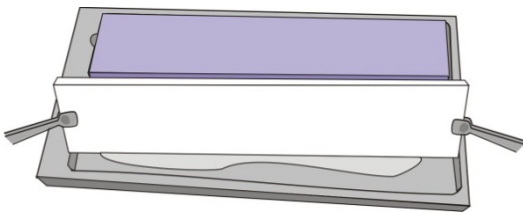


Abb. 4: Abklopfen des Elektrodendochts um überschüssigen Puffer zu entfernen.

5. Legen Sie die Elektrodendochte auf die Gelen, so dass sie mindestens 2 mm überlappen. Halten Sie die Dochte immer waagrecht, um zu vermeiden, dass sich der Puffer ungleichmäßig im Docht verteilt. Streichen Sie vorsichtig mit einer gebogenen Pinzette über die Dochte an den überlappenden Seiten um den luftblasenfreien Kontakt zu den Gelen sicherzustellen.
6. Pipettieren Sie 15 μL Probe in die Probenwannen.
7. Reinigen Sie die Elektrodendrähte vor (und nach) jedem Elektrophoreselauf mit einem feuchten Papierhandtuch.
8. Legen Sie die Elektrodendeckel auf die Dochte, schließen Sie den Deckel der Kammer (je nach Konstruktion der Elektrophoresekammer), verbinden Sie die Kammer mit dem Stromversorger, schalten Sie die Kühlung ein (15 °C).
9. Schalten Sie den Stromversorger ein und starten Sie den Elektrophoreselauf mit den eingestellten Maximalwerten nach Tabelle 2.

Tab. 2: Laufbedingungen (15°C): insgesamt 2 Std.

1 Gel:	maximal V	maximal mA	Set W	Zeit
Schritt 1	600 V	42 mA	30 W	1 h
Schritt 2	1000 V	50 mA	60 W	1 h

Anfärbung der Proteine

Die besten Ergebnisse erhält man mit der Coomassie Blau Kolloidalfärbung :
SERVA HPE™ Coomassie Staining Kit (Kat.-Nr. 43396.01)

SERVA Electrophoresis GmbH
Carl-Benz-Str. 7
D-69115 Heidelberg
Germany.

Phone +49 6221 13840-0
Fax +49 6221 13840-10
E-Mail: info@serva.de