

GEBRAUCHSANLEITUNG

FocusGel 6-11

Fertiggele für horizontale isoelektrische Fokussierung
(Flatbed IEF)

(Kat.-Nr.43329, 43333)



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. FOCUSGEL 6-11	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lagerungsbedingungen	2
2. DURCHFÜHRUNG DER ELEKTROPHORESE.....	2
2.1. Probenvorbereitung	2
2.2. Vorbereitung des Gels	2
2.3. Isoelektrische Fokussierung von Liquor und Serum	3
2.3.1. Verdünnung von Liquor- und Serumproben.....	3
2.3.2. Probenaufgabe.....	4
2.4. Isoelektrische Fokussierung	5
3. FÄRBUNG DES GELS.....	7
3.1. Heißfärbung mit Coomassie Blue G 250	7
3.1.1. Stammlösungen	7
3.1.2. Färbeprotokoll	7
3.2. Silberfärbung	8
3.2.1. Ammonikalische Silberfärbung	9
3.2.2. Färbung mit SERVA CSF Silver Staining Kit (Kat.-Nr. 43398).....	10
4. PROBLEMLÖSUNGEN FÜR DIE ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG OLIGOKLONALER IGGS	12
5. BESTELLINFORMATIONEN	13

1. FocusGel 6-11

1.1. Allgemeine Hinweise

FocusGele sind foliengestützte 0,65 mm dicke Polyacrylamidgele mit 5 % Gelkonzentration und 3 % Vernetzung für die isoelektrische Fokussierung.

Katalysatoren und andere nichtpolymerisierte Substanzen wie Acrylamidmonomere sind aus der Matrix entfernt worden. Aus diesem Grund sind FocusGels ungiftig. Die Gele können mit Probenaufgabewannen ausgestattet werden, ohne dass die Iso pH-Linien gestört werden. Die Gelmatrix enthält eine spezielle Trägerampholytmischung um einen optimalen pH-Gradienten 6 - 11 zu erzielen.

Beim FocusGel werden keine Elektrodenstreifen und Elektrodenlösungen verwendet. Die Elektroden werden direkt auf die Geloberfläche aufgelegt.

1.2. Lagerungsbedingungen

Lagern Sie die Gele bei 2 °C bis 8 °C (35 °F – 46 °F).

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. Durchführung der Elektrophorese

2.1. Probenvorbereitung

Für die Färbung des Gels mit **Coomassie® Blue** sollte die Probe auf ca. **1 µg / 1 ml** Proteinkonzentration mit destilliertem Wasser eingestellt werden.

Bei nachfolgender **Silberfärbung** sollte die Proteinkonzentration ca. **0,1 µg / 5 ml** destilliertem Wasser betragen.

Für Serum und Liquor Proben: Hier ist die Probenverdünnung kritischer als bei anderen Proben, siehe daher die Spezialanleitungen in Abschnitt 2.3.

2.2. Vorbereitung des Gels

Die Tüte wird mit einer Schere aufgeschnitten und das Gel entnommen. Anschließend vorsichtig die Deckfolie entfernen. Diese Folie dient später zur Abdeckung des getrockneten Gels und vereinfacht die Aufbewahrung. Das Gel ist nun gebrauchsfertig.

2 ml "Cooling Fluid" werden auf die Kühlplatte der Fokussierkammer pipettiert, so dass ein guter Kühlkontakt zu erzeugt wird (Abb. 1).

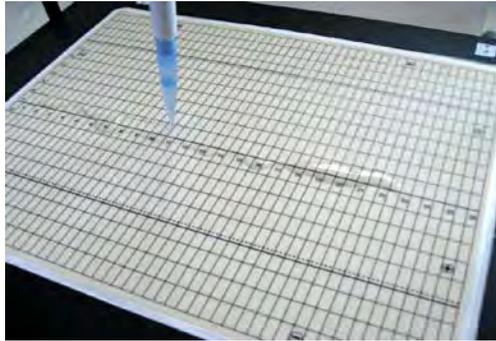


Abb. 1

Wichtig: Bis zum Abschluss der Probenaufgabe den Umlaufkryostaten nicht einschalten, um die Kondensation von Wasser auf der Geloberfläche zu verhindern; oder das Kühlschlauchventil auf Umleitung stellen.

Auflegen des Gels auf die Kühlplatte erfolgt mit der Oberfläche nach oben und in der Mitte beginnend (Abb. 2). Die Probenaschen müssen sich auf der anodischen Seite befinden. Der Einschluss von Luftblasen sollte vermieden werden. Beim HPE™ FlatTop Tower sollten die Folienkanten auf den Linien 4 und 16 liegen, bei der Multiphor II auf den Linien 3 und 15.

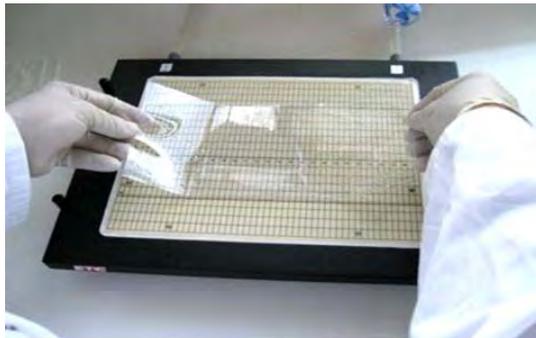


Abb. 2

2.3. Isoelektrische Fokussierung von Liquor und Serum

2.3.1. Verdünnung von Liquor- und Serumproben

Alle Seren werden zunächst vorverdünnt: 5 µl Serum + 495 µl *Sample Diluter*.

WICHTIG:

Alle Verdünnungen (incl. die 1:100 Vorverdünnung der Seren) erfolgen mit dem **Sample Diluter**. **Verwenden Sie auf keinen Fall PBS (Phosphate Buffered Saline) oder 0,9 % NaCl!**

Die IgG-Konzentrationen werden vorher mit einem Nephelometer bestimmt! Alle Liquorproben werden direkt auf die gleichen Proteinkonzentrationen wie die Serumproben eingestellt.

Probenverdünnungen für die verschiedenen Visualisierungsmethoden oligoklonaler Banden

Allgemeine Silberfärbung:

Dies ist die optimale Routinemethode. Die Färbung ist nicht IgG-selektiv, da alle Probenproteine detektiert werden.

- Bestes Auflösungsvermögen und höchste Nachweisempfindlichkeit
- Seren und Liquors auf 20 mg/l IgG einstellen

Immunfixation mit Fluorescence Imaging:

- IgG-selektiver Nachweis, sehr empfindlich
- Fluoreszenz Imager wird benötigt
- Seren und Liquors auf 15 mg/l IgG einstellen

Immunfixation mit nachfolgender Silberfärbung:

- IgG-selektiver Nachweis, sehr empfindlich.
- Zusatzschritt über Nacht (Auswaschung der Antikörper)
- Seren und Liquors auf 5 mg/l IgG einstellen

Blotting mit immunologischem Nachweis:

- IgG-selektiver Nachweis
- Zusätzlicher Blottingschritt
- Seren und Liquors auf 20 mg/l IgG einstellen

2.3.2. Probenaufgabe

FocusGel 24S und 40S:

Die Position der vorgeformten Probentaschen ist speziell für die Aufgabe der Serum- und Liquorproben an der anodalen Seite des pH-Gradienten 6-11 optimiert (Abb. 3). Diese Position kann auch für andere Proben geeignet sein. Das Gel kann aber auch für Probenaufgabe an der kathodischen Seite gedreht werden.

25 µl (24S) oder 12 µl (40S) Serum und Liquor werden abwechselnd in die Taschen pipettiert.

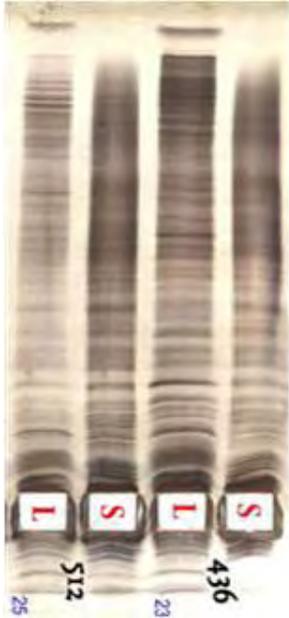


Abb. 3

25 μ l (24S) oder 12 μ l (40S) Serum und Liquor werden abwechselnd in die Taschen pipettiert.

Wichtig: Alle Taschen müssen gefüllt werden!

Pipettieren Sie 25 μ l (bzw. 12 μ l) des Probenverdünners (*Sample Diluter*) in die nicht verwendeten Taschen.

2.4. Isoelektrische Fokussierung

- **Aufsetzen der Elektroden**

Vor und nach der IEF, sollten die Platindrähte sorgfältig mit einem feuchten Papiertuch abgewischt werden.

Verschieben Sie die Platinelektroden bis sie über den Gelkanten sitzen.

Setzen Sie den Elektrodenhalter auf der Geloberfläche ab und stecken Sie die Elektrodenkabel in die Kontakte der Kammer ein. Dann schließen Sie den Sicherheitsdeckel und starten die Fokussierung (siehe Tabelle 1).

Vorsicht: Die Platindrähte müssen auf den Gelkanten liegen, nicht auf der Folie.

Wichtig: Keine Elektrodenlösungen und -streifen verwenden!

- **Temperatur**

Die isoelektrische Fokussierung muss bei definierter und konstanter Temperatur erfolgen, da sowohl der pH-Gradient im Gel als auch die isoelektrischen Punkte der Proteine temperaturabhängig sind. Schalten Sie jetzt den Kryostaten ein, eingestellt auf 10 °C.

- **Laufbedingungen**

Während der isoelektrischen Fokussierung ändert sich die elektrische Leitfähigkeit des Gels sehr stark. Für einige Proben ist es daher empfehlenswert eine Fokussierung des Gels vor dem Probenauftrag durchzuführen.

Phase	SET	SET	SET	Zeit	Schritt
0.1	1000 V	50 mA	10 W	20 min	Vorfokussierung ohne Probe

Allerdings sollte dieser Vorfokussierungsschritt nicht bei der CSF-Analytik von Serum- und Liquorproben durchgeführt werden.

In der Endphase herrscht niedrige Stromstärke - und Leistung - die eingestellten Maximalwerte limitieren dann den Spannungswert.

Die drei Phasen müssen direkt hintereinander laufen!

Idealerweise sollte man einen programmierbaren Stromversorger, z. B. SERVA BluePower 3000x4 Power Supply (BP-3000x4), verwenden.

Phase	SET	SET	SET	Zeit	Schritt
1	500 V	30 mA	10 W	30 min	Proben-einwanderung
2	1500 V	18 mA	20 W	1 h 30 min	Fokussierung
3	2000 V	15 mA	25 W	30 min	Bandenschärfung

Für ein halbes Gel werden die gleichen Spannungswerte (V), aber die halben Stromstärke- (mA) und Leistungsparameter (W) einprogrammiert.

Achtung:

Diese Laufbedingungen gelten nur für Aluminiumoxidkeramik-Kühlplatten!

Bei Metall und/oder Glas-Kühlplatten dürfen 10 W nicht überschritten werden!

3. Färbung des Gels

3.1. Heißfärbung mit Coomassie Blue G 250

3.1.1. Stammlösungen

- 20 % Trichloressigsäure (TCA): 52 ml einer 77% (w/v) TCA werden mit dest. H₂O auf 200 ml aufgefüllt.
Zur Herstellung einer 77 % (w/v) TCA-Lösungen empfiehlt sich 300 ml dest. H₂O zu einer 1 kg-Flasche TCA zu geben. Die TCA sollte vollständig gelöst werden.
- Lösung A: 0,2 % (w/v) CuSO₄ / 20 % (v/v) Essigsäure
(2 g CuSO₄ in 1 L of 20 % (v/v) Essigsäure)
- Lösung B: 0,04 % (w/v) Coomassie Blue G 250 in 60 % (v/v) Methanol
(0,4 g Coomassie G 250 in 1 L, 60 % (v/v) Methanol)
- Lösung C: 50 % (v/v) Methanol

3.1.2. Färbeprotokoll

- **Fixierung:** 15 min in 200 ml 20 % (w/v) TCA bei Raumtemperatur
- **Waschen:** 2 × 1 min in 200 ml Waschlösung
(Mischung aus gleichen Volumina Lösung A und Lösung C)
- **Färben:** 45 min in 200 ml Färbelösung (Mischung aus gleichen Volumina Lösung A und Lösung B). Erwärmen der Lösung unter Rühren auf 50 °C (Abb. 4).
Passende Färbebehälter aus Stahl sind in Abschnitt 5. aufgeführt.

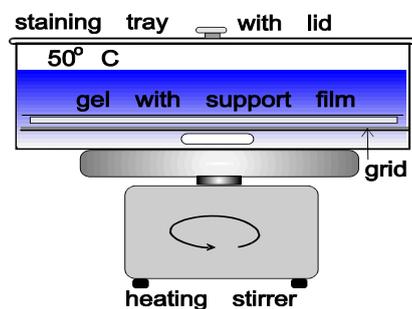


Abb. 4

- **Waschen:** 2 × 5 min in 200 ml Waschlösung (Mischung aus gleichen Volumina Lösung A und Lösung C)
- **Entfärben:** 2-3 × 15 min in Waschlösung
- **Imprägnieren:** 5 min in 200 ml 5 % (v/v) Glycerinl
- **Trocknen:** Lufttrocknen bei Raumtemperatur

3.2. Silberfärbung

Es gibt zwei verschiedene Konzepte für die empfindliche Silberfärbung:

- Silbernitrat Rezepturen
- Ammoniakalische Rezepturen mit Silberdiamin

SERVA bietet einen speziell für die Detektion oligoklonaler IgGs in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) entwickelten und optimierten Silberfärbekit (**SERVA CSF Silver Staining Kit Kat.-Nr. 43398**) an. Dieser Färbekit erlaubt die Proteindetektion in Polyacrylamidgelen mit hoher Sensitivität.

Da es viele Verwender von FocusGelen gibt, die ihre Standardprozedur nicht aufgeben wollen, enthält diese Anleitung auch das Protokoll für eine alternative ammoniakalische Silberfärbung.

3.2.1. Ammonikalische Silberfärbung

Schritt	Lösung	Volumen	Temp	Zeit
1. Fixierung	20 % TCA: 52 ml einer 77% Lösung* TCA	200 ml	20 °C	45 min
2. Waschen	H ₂ O dest	200 ml	20 °C	5 min
3. Spülung I	50 % Methanol / 10 % (v/v) Essigsäure	200 ml	20 °C	40 min
4. Spülung II	5% Methanol / 7 % (v/v) Essigsäure	200 ml	20 °C	20 min
5. Inkubation	2,5 % Glutaraldehyd	200 ml	20 °C	15 min
6. - 9. Waschen	H ₂ O dest	4 × 200 ml	20 °C	20 min 15 min 10 min 10 min
10. Silberschritt (frisch zubereiten!)	<u>Lösung 1:</u> 250 mg AgNO ₃ in 1 ml H ₂ O dest. <u>Lösung 2:</u> 40 ml H ₂ O dest. + 4 ml NaOH (1M) + 2,5 ml NH ₃ (25%) Tropfen von Lösung 1 in 2 unter Rühren, Auffüllen auf 200 ml mit dest. H ₂ O	200 ml	20 °C	40 min
11.-12. Waschen	H ₂ O dest (kalt!)	2 × 200 ml	20 °C	1 min 5 min
13. Entwicklung (frisch zubereiten!)	0,0025 % (w/v) Zitronensäure + 100 µl Formaldehyd Auffüllen auf 200 ml mit H ₂ O dest	200 ml	20 °C	2-5 min Pieper aktivieren: Schritt 12 Beobachten und stoppen, wenn Hintergrund gelb wird!
14.-16. Stoppen und Konservierung	10 % (v/v) Ethanol, 1 % (w/v) Glycin, 5 % (w/v) Glycerin	3 x 200 ml	20 °C	3 x10 min

Trocknung: Lufttrocknen des Gels auf der Folie, dann wird die Polyester Deckfolie (mit dem Gel geliefert) auf die Oberfläche gerollt. *Gesamte Färbezeit: Etwa 4 Stunden*

Verwenden Sie bitte nur Reagenzien in p.A.-Qualität. Hochqualitatives, demineralisiertes Wasser ist ebenfalls wichtig für beste Färbeergebnisse.

* Zur Herstellung einer 77% Lösung von TCA empfehlen wir 300 mL Wasser zu einer 1 kg TCA Flasche zuzugeben und die TCA komplett aufzulösen.

3.2.2. Färbung mit SERVA CSF Silver Staining Kit (Kat.-Nr. 43398)

Kitkomponenten:

Komponente	Menge
Fixierungslösung I (Fixing Solution I)	1 L
Ethanol (denatured for Fixing Solution II and Wash Solution)	1 L
Fixierungslösung III (Fixing Solution III)	500 ml
Lösung A (Solution A)	2x 55 ml
Lösung B (Solution B)	2x 55 ml
Lösung C (Solution C)	2x 1 ml
Lösung D (Solution D)	2x 1,5 ml
Lösung E (Solution E)	5x 2 g

Benötigte Lösungen:

Zur Färbung von 1 Gel (12 cm x 25 cm) werden 200 ml der jeweiligen Lösungen in den Färbeschritten eingesetzt.

- Lösung für Fixierung II:
(30 % (v/v) Ethanol) 60 ml Ethanol, denatured
ad 200 ml dH₂O
- Lösungen für Fixierung III: 80 ml Fixierungslösung III
ad 200 ml dH₂O
- Waschlösung:
(5 % (v/v) Ethanol) 10 ml Ethanol, denatured
ad 200 ml dH₂O
- Färbelösung: 20 ml Solution A
20 ml Solution B
ad 200 ml dH₂O
- Entwickler: 50 µl Solution C
200 µl Solution D
ad 200 ml dH₂O
- Stopplösung:
(1 % (w/v) Glycin) 2 g Solution E
ad 200 ml dH₂O
- Konservierungslösung: 12 ml Glyzerin (85 %)
ad 200 ml dH₂O

Hinweis:

Bei Verwendung eines Färbeautomaten ist darauf zu achten, dass das Gel luftblasenfrei in der Färbewanne liegt. Mit Hilfe von Magnetstäbchen lässt sich das Gel entsprechend fixieren.

Schritt	Lösung	Inkubationszeit
1. Fixierung I	Fixierungslösung I	20 min
2. Fixierung II (1)	Lösung für Fixierung II: 30 % (v/v) Ethanol	10 min
3. Fixierung II (2)	Lösung für Fixierung II: 30 % (v/v) Ethanol	10 min
4. Waschen (1)	Waschlösung: 5 % (v/v) Ethanol	10 min
5. Waschen (2)		10 min
6. Fixierung III	Lösung für Fixierung III	20 min
7. Waschen (1)	Waschlösung: 5 % (v/v) Ethanol	10 min
8. Waschen (2)		10 min
9. Spülen (1)	Je 200 ml dH ₂ O	10 min
10. Spülen (2)		10 min
11. Spülen (3)		10 min
12. Färben	Färbelösung: 20 ml Solution A + 20 ml Solution B ad 200 ml dH ₂ O	30 min
13. Spülen (1)	Je 200 ml dH ₂ O	2 min
14. Spülen (2)		5 min
15. Entwickeln	Entwickler: 50 µl Solution C+ 200 µl Solution D ad 200 ml dH ₂ O	2 bis 3 min (nach Sicht)
16. Stoppen	Stopplösung: 1 % (w/v) Glycin	5 min
17. Spülen (1)	Je 200 ml dH ₂ O	5 min
18. Spülen (2)		5 min
19. Konservieren	Konservierungslösung	5 min
20. Trocknen	Gel lufttrocknen und anschließend die Deckfolie, die mit dem Gel geliefert wird, auf Geloberfläche rollen.	Einige Stunden

Verwenden Sie bitte nur Reagenzien in p.A.-Qualität. Hochqualitatives, demineralisiertes Wasser ist ebenfalls wichtig für beste Färbeergebnisse.

4. Problemlösungen für die isoelektrische Fokussierung oligoklonaler IgGs

Symptom	Grund	Abhilfe
Spannung angelegt, aber kein Stromfluss. Proben und Farbstoff bleiben in den Wannern.	Keine interne Verbindung in der Kammer. Die Elektroden haben keinen Kontakt mit der Geloberfläche.	Überprüfen Sie die Kabelkontakte in der Kammer. Legen Sie die Elektroden auf die Geloberfläche. Folgen Sie dem Manual.
Trennspuren sind unterschiedlich breit. Seren und Liquors färben sich unterschiedlich an.	Seren und Liquors sind falsch verdünnt worden.	Verwenden Sie den Sample-Diluter für alle Probenverdünnungen. Nicht die Vorverdünnung der Seren vergessen!
Trennspuren laufen ungerade.	Es wurden nicht alle Probenaschen gefüllt.	Pipettieren Sie mind. 25 µl bzw. 12 µl Sample Diluter ein. Lassen Sie keine Tasche leer.
An der Kathode brennt das Gel.	Salzbelastung des Gels zu hoch. Elektrodenlösungen und –streifen wurden verwendet.	Tragen Sie nicht ausschließlich Liquors auf, sondern immer Seren dazwischen. Verwenden Sie kein PBS zur Verdünnung der Proben! Verwenden Sie keine Elektrodenstreifen!
Silberfärbung funktioniert nicht.	Ungenügende Reagenzienqualität.	Verwenden Sie nur Chemikalien von bester Qualität.
Silberfärbung hat (fast) keinen Kontrast.	Formaldehyd-haltige Lösungen und / oder die Zitronensäure-Lösung waren älter als 1 Tag.	Überprüfen Sie Chemikalien- und Wasserqualität. Gegebenenfalls spülen Sie regelmäßig die Schläuche des Färbeautomats.

5. Bestellinformationen

Produkt	Menge	Kat.-Nr.
Reagenzien		
IgG Sample diluter IEF	100 ml	43336.01
Cooling Contact Fluid	50 ml	43371.01
	3x 50 ml	43371.02
Glycerol from plant	1 L	23176.01
Färbekits und -reagenzien		
SERVA CSF Silver Staining Kit	1 Kit	43398.01
Trichloroacetic acid, 20 % solution	500 ml	36913.01
	1 L	36913.02
Silver nitrate	25 g	35110.01
	100 g	35110.02
Citric acid	500 g	38640.01
	1 kg	38640.02
	5 kg	38640.03
Glycine	500 g	23390.02
	1 kg	23390.04
	5 kg	23390.03
Coomassie® Brilliant Blue G 250	25 g	17524.01
	100 g	17524.02
SERVA Blue G	5 g	35050.01
	25 g	35050.02
	100 g	35050.03
Geräte		
HPE™ Tower System		HPE-TS1
HPE™ FlatTop Tower		HPE-T01
HPE™ Cooling Unit		HPE-CU1
SERVA BluePower™ 3000x4 Power Supply		BP-3000x4
Steel Tray Large + Grid + Lid		HPE-A20
Steel Tray Multi 6		HPE-A21