

GEBRAUCHSANLEITUNG

FocusGel

**Fertiggele für horizontale isoelektrische Fokussierung
(Flatbed IEF)**

(Kat.-Nr. 43327, 43328, 43330, 43332, 43334, 43335, 43387)



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..... | 2 |
| 1.1. Allgemeine Hinweise | 2 |
| 1.2. Lagerungsbedingungen | 2 |
| 2. DURCHFÜHRUNG DER ELEKTROPHORESE..... | 2 |
| 2.1. Probenvorbereitung | 2 |
| 2.3. Isoelektrische Fokussierung | 3 |
| 3. FÄRBUNG DES GELS..... | 5 |
| 3.1. Heißfärbung mit Coomassie Blue G 250 | 5 |
| 3.1.1. Stammlösungen..... | 5 |
| 3.1.2. Färbeprotokoll..... | 5 |
| 3.2. Silberfärbung | 6 |
| 4. PROBLEMLÖSUNGEN FÜR DIE ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG | 7 |
| 5. BESTELLINFORMATIONEN..... | 8 |

1. FocusGel

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 Acrylamidmonomeren sind aus der Matrix entfernt worden. Deshalb sind FocusGels ungiftig und können mit Probenaufgabewannen ausgestattet werden, ohne dass die Iso pH-Linien gestört werden. Die Gele enthalten eine spezielle Trägerampholytmischung um einen optimalen pH-Gradienten zu erzielen. Beim FocusGel werden keine Elektrodenstreifen und Elektrodenlösungen verwendet. Die Elektroden werden direkt auf die Geloberfläche aufgelegt. FocusGels 24S enthalten 24 vorgeformte Probestaschen für ein Maximalprobenvolumen von 25 µl. Die anderen Geltypen besitzen keine Probestaschen. Hier werden Applikatorstreifen zum Probenauftrag verwendet.

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 folgende Proteinkonzentration ca. **1 µg / 1 ml** mit destilliertem Wasser eingestellt werden.

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

2.2. Vorbereitung des Gels

Die Tüte wird mit einer Schere aufgeschnitten und das Gel entnommen. Anschließend vorsichtig die Deckfolie entfernen. Sollte die Geloberfläche sehr feucht sein, ist es ratsam das Gel vorsichtige mit einem Filterpapier zu trocknen. Die Deckfolie 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).

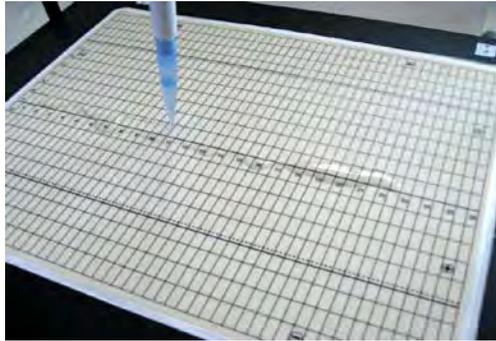


Abb. 1

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 Probestaschen 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.

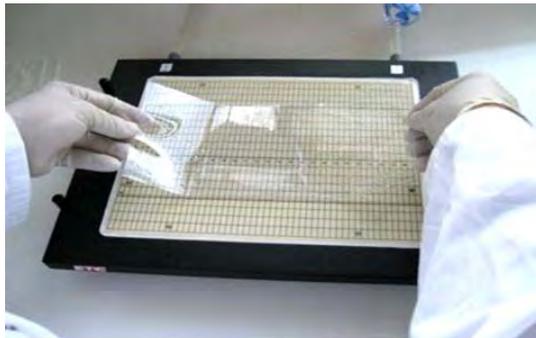


Abb. 2

2.3. Isoelektrische Fokussierung

- **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 die 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 Vorfokussierungsschritte 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.

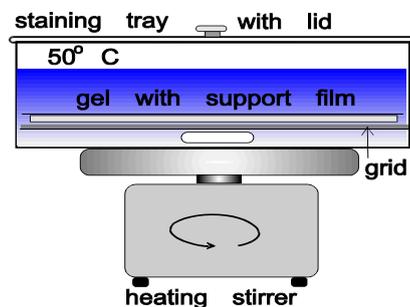


Abb. 4

- **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

| 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 x 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 x 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, 10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (w/v) Glycerin | 3x 200 ml | 20 °C | 3x10 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.

4. Problemlösungen für die isoelektrische Fokussierung

| Symptom | Grund | Abhilfe |
|---|---|--|
| Spannung angelegt, aber kein Stromfluss. Proben und Farbstoff bleiben in den Wannen. | 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. |
| 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 | | |
| Cooling Contact Fluid | 50 ml | 43371.01 |
| | 3x 50 ml | 43371.02 |
| Glycerol from plant | 1 L | 23176.01 |
| Färbereagenzien | | |
| 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 |
| 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 |