

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA IPG *BlueStrips*



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. SERVA IPG <i>BlueStrips</i>	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lieferumfang	2
1.3. Lagerbedingungen	2
2. SERVA IPG <i>BlueStrips</i>	3
3. Rehydratisierung der IPG <i>BlueStrips</i>	4
3.1. Rehydratisierungs- / Probenpuffer	4
3.2. Durchführung der Rehydratisierung	4
4. Probenauftrag	5
5. Probenkonzentration	6
6. Fokussierung der IPG <i>BlueStrips</i>	6
6.1. Vorbereitung der IEF in einer IPG-Fokussierungseinheit	6
6.2. Fokussierungsbedingungen	7
6.2.1. Fokussierungsbedingungen für weite IPG-Gradienten	7
6.2.2. Fokussierungsbedingungen für enge IPG-Gradienten	7
6.2.3. Fokussierungsbedingungen über Nacht	8
6.2.4. Fokussierungsbedingungen über Tag	8
7. Troubleshooting	10
8. Reagenzien und Geräte für die 1D- / 2D-Gel-Elektrophorese	17
9. Literatur	17

1. SERVA IPG *BlueStrips*

1.1. Allgemeine Hinweise

Die SERVA IPG *BlueStrips* finden Anwendung in der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese und garantieren einen stabilen, reproduzierbaren Gradienten für die Isoelektrische Fokussierung.

Die homogene Acrylamidmatrix mit immobilisiertem pH-Gradienten ist kovalent an die Trägerfolie GEL-FIX™ gebunden. Dies gibt dem Gel mechanische Stabilität und erleichtert die Handhabung. Zusätzlich schützt eine nichtbindende Abdeckfolie (GEL-FIX for Covers™) das Gel vor Beschädigungen und Verunreinigungen.

SERVA IPG *BlueStrips* sind getrocknet und müssen vor der Verwendung mit einem speziellen IEF 2D-Probenpuffer rehydratisiert werden.

Der jeweilige pH -Gradient ist auf den Streifen aufgedruckt. Die Anodenseite ist mit einem „+“ markiert. Jeder Gelstreifen ist mit einer eigenen Lotnummer versehen und damit geeignet für die Dokumentation gemäß GMP/GLP.

Alle Streifen einer Packung stammen aus demselben Ursprungs-Gel und garantieren höchste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

1.2. Lieferumfang

Packungsgröße: 12 Gelstreifen SERVA IPG *BlueStrips*
Gelgröße: Breite 3 mm, Geldicke 0,5 mm
Längen: 70 mm, 110 mm, 170 mm, 180 mm, 240 mm
pH-Gradienten: 3-10, 3-10 NL*, 4-7, 6-10, 3-6, 5-8

* NL = nicht-linear, d.h. im Bereich pH 5-7 zeigt der Gradient ein Plateau mit erhöhter Trennleistung

Spezial-Gradienten nach Anfrage

1.3. Lagerbedingungen

Die empfohlene Lagertemperatur der IPG *BlueStrips* ist - 20 °C. Bei Lagerung bei der empfohlenen Temperatur sind die Strips mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

SERVA IPG *BlueStrips* müssen konstant bei - 20 °C gelagert werden.

Das wiederholte Auftauen und Einfrieren der Strips führt zu Veränderungen der Gelmatrix und in der Folge zur Ablösung des Gels von der Trägerfolie.

Die Gelablösung tritt bereits beim Entfernen der Abdeckfolie oder während der Rehydratisierung auf. Aus diesem Grund sind Auftau-Einfrier-Zyklen zu vermeiden. Entnehmen Sie bitte nur so viele Strips aus der Verpackung, wie für das anstehende Experiment benötigt werden und verwahren Sie die restlichen Strips gefroren und fest verschlossen bei - 20°C.

2. SERVA IPG *BlueStrips*

Kat.-Nr.	pH-Gradient	Länge
43001	3-10	7 cm
43002	3-10NL	7 cm
43003	4-7	7 cm
43004	6-10	7 cm
43005	3-6	7 cm
43006	5-8	7 cm
43031	3-10	11 cm
43032	3-10NL	11 cm
43033	4-7	11 cm
43034	6-10	11 cm
43035	3-6	11 cm
43036	5-8	11 cm
43041	3-10	17 cm
43042	3-10NL	17 cm
43043	4-7	17 cm
43044	6-10	17 cm
43045	3-6	17 cm
43046	5-8	17 cm
43011	3-10	18 cm
43012	3-10NL	18 cm
43013	4-7	18 cm
43014	6-10	18 cm
43015	3-6	18 cm
43016	5-8	18 cm
43021	3-10	24 cm
43022	3-10NL	24 cm
43023	4-7	24 cm
43024	6-10	24 cm
43025	3-6	24 cm
43026	5-8	24 cm
43027	3,5-4,5	24 cm

3. Rehydratisierung der IPG *BlueStrips*

3.1. Rehydratisierungs- / Probenpuffer

Die optimale Pufferzusammensetzung ist abhängig von der eingesetzten Probe. In Tabelle 1 ist ein für viele Proben geeigneter Puffer angegeben. Als Hilfestellung für die Optimierung schwieriger Proben ist ein Konzentrationsbereich für alle Pufferkomponenten angegeben.

Die Streifen werden entweder in einer speziellen Rehydrationskammer (Kat.-Nr. 43091) oder direkt in den IEF-Systemen für die 1D-Elektrophorese der verschiedenen Hersteller rehydratisiert. Hierzu folgen Sie bitte den Anleitungen der Hersteller.

Tabelle 1:

Komponenten	Kat.-Nr.	Konzentrationsbereich	Mengen
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
SERVA HPE™ IPG strip buffer	43368	0,5 % (v/v)	50 µl
Wasser dest.			ad 10 ml

* kann zu 25 % durch Thioharnstoff ersetzt werden

Hinweis: der Probenpuffer kann in passenden Portionen bei –20 °C ca. 3 Monate aufbewahrt werden.

3.2. Durchführung der Rehydratisierung

Die Menge an Rehydratisierungspuffer richtet sich nach der Länge der IPG-Streifen.

Tabelle 2:

Streifenlänge (mm)	Volumen/Streifen (µl)
70	130
110	200
170	320
180	340
240	450

- Die IPG-Streifen werden jeweils einzeln in den 12 Kanälen der Rehydrationskammer rehydratisiert.
- Dazu wird die entsprechende Menge Rehydratisierungspuffer entlang der inneren Kante in den Kanal pipettiert und dabei etwa in der Länge des Streifens verteilt.

- Der Streifen wird mit der Gelseite nach unten (Beschriftung lesbar) an einer Seite in den Puffer getaucht und dann langsam abgesenkt, so dass sich der Puffer **luftblasenfrei** über die gesamte Länge des Streifens verteilt und das Gel gleichmäßig benetzt wird.
Hinweis: Der Streifen sollte locker auf der Flüssigkeit liegen und nicht am Boden des Kanals anhaften.
- Wenn der Puffer vom Gelstreifen aufgesogen ist (nach ca. 5-10 min), wird mit 1 bis 2 ml SERVA HPE™ IPG Cover Fluid (Kat.-Nr. 43397) überschichtet, um die Austrocknung des Streifens zu verhindern.
- Abhängig von Probe und Pufferzusammensetzung sollte mindestens 6 Std. lang (besser über Nacht) **bei Raumtemperatur** rehydratisiert werden.

4. Probenauftrag

Es gibt zwei Methoden, die Probe auf den Gelstreifen aufzutragen. Über die Wahl der Methode entscheiden verschiedene Faktoren, wie z.B. Probenkonzentration, Probeneigenschaften, Streifenlänge, pH-Gradient und das verwendete Nachweissystem (z.B. Coomassie™-, Silberfärbung).

- **Sample in-Gel-Rehydratisierung:**
Probe wird im Rehydratisierungspuffer gelöst und darin der Gelstreifen inkubiert.
Probenvolumen und Rehydratisierungspuffer ergeben in der Summe die in Tabelle 2 vorgegebenen Volumina zum Rehydratisieren.
Vorteil:
 - Unkomplizierte Anwendung
 - Geeignet für Probe in großer Verdünnung**Nachteil:**
 - Probenverluste in der Kammer
 - pH-unspezifischer Probenauftrag
- **Cup Loading:**
Streifen wird ohne Probe rehydratisiert und die Probe während der IEF mit Hilfe eines Cups auf den Gelstreifen aufgetragen. Der Applikationsort ist abhängig von Gradient und Probe.
Vorteil:
 - Variabler Applikationsort
 - Kaum Probenverluste
 - Geeignet für geringe Probenkonzentration**Nachteil:**
 - Präzipitat bei hoher Probenkonzentration
 - undichtes Cup führt zu Störungen
 - Fokussierungszeit verlängert wegen langsameren Probeneintritts

5. Probenkonzentration

Die aufzutragende Probenmenge muss für jede Probe individuell optimiert werden. Sie variiert je nach Streifenlänge, Gradient und Auftragsmethode und ist natürlich abhängig vom verwendeten Nachweissystem. Für Silberfärbung oder Fluoreszenz – Farbstoffe wie z.B. SYPRO Ruby werden geringere Proteinmengen benötigt als für die Färbung mit Coomassie™ Blue.

Um eine hohe Auflösung zu erreichen, ist eine Überladung der Probe grundsätzlich zu vermeiden.

Nur in Einzelfällen ist eine Überladung zu erwägen, z.B. um Proteine, die nur in geringer Konzentration vorhanden sind, wiederzufinden.

Richtwerte zur Beladung der verschiedenen Streifenlängen:

IPG *BlueStrip* - 7 cm Länge: 5 - 300 µg Gesamtprotein

IPG *BlueStrip* - 11 cm Länge: 5 - 450 µg Gesamtprotein

IPG *BlueStrip* - 17 cm Länge: 50 - 750 µg Gesamtprotein

IPG *BlueStrip* - 18 cm Länge: 50 - 750 µg Gesamtprotein

IPG *BlueStrip* - 24 cm Länge: 80 - 1000 µg Gesamtprotein

Hinweis: Harnstoffhaltige Proben sollten nicht über 30 °C erwärmt werden, um Veränderungen der pIs zu vermeiden (pI-Shift durch Carbamylierungen).

6. Fokussierung der IPG *BlueStrips*

6.1. Vorbereitung der IEF in einer IPG-Fokussierungseinheit

Beispiel: Hoefler IEF 100

- Kühler auf **20 °C** temperieren.
- Die Gelstreifen aus der Rehydrationskammer nehmen und mit der **Gelseite nach oben** in die einzelnen Kanäle der Fokussier-Kammer legen.
- Das mit **+** gekennzeichnete Ende des Streifens zur **Anode** ausrichten
- Auf die Gelen den jedes Streifens ein leicht angefeuchtetes Filterpapier (3mm breit, 10 mm lang) legen und darauf die Platinelektrode plazieren.
- Im Falle von Cup-loading anschließend die Cups auf die Streifen setzen und gut andrücken.
- Um das Austrocknen der Streifen während der Fokussierung zu verhindern, die Streifen mit ausreichend SERVA HPE™ IPG Cover Fluid (Kat.-Nr. 43397) überschichten.

- Die Probe mit Rehydrationspuffer verdünnen und mit Bromphenolblau anfärben. Das maximale Probenvolumen ist abhängig von der Streifenlänge und liegt bei 50 - 150µl Probe/Cup. Probe mit 50 µl SERVA HPE™ IPG Cover Fluid überschichten.

Hinweis: Die blau eingefärbte Probe zeigt empfindlich jede Undichtigkeit des Cups. Undichtigkeit ist beim *Cup-loading* unbedingt zu vermeiden, da sich hierbei ein Teil der Probe seitlich entlang des Strips verteilen kann. Dadurch ergeben sich einerseits Probenverluste und andererseits zeigt sich in der 2. Dimension vermehrt horizontale Streifenbildung.

6.2. Fokussierungsbedingungen

Die Fokussierungsbedingungen variieren je nach verwendeter Streifenlänge, Gradient, Probenkomplexität, Art der Probenaufgabe und vorhandener Geräteausrüstung. Sofern Sie spezielle 1D-Elektrophorese-Systeme anderer Hersteller verwenden, folgen Sie bitte den Angaben in den dazugehörigen Bedienungsanleitungen. Die folgenden Elektrophorese-Bedingungen dienen lediglich als Richtlinie und können zur Optimierung der Probentrennung verändert werden.

6.2.1. Fokussierungsbedingungen für weite IPG-Gradienten: pH 3-10; 3-10NL; 6-10

Strip-Länge	Anfangsspannung	Endspannung	Volt-Stunden
7 cm	150 *	3000 V	7 - 8 kVh
11 cm	150 *	6000 V	15 - 20 kVh
17 cm / 18 cm	150 *	10000 V **	30 - 40 kVh
24 cm	150 *	12000 V **	60 - 80 kVh

6.2.2. Fokussierungsbedingungen für enge IPG-Gradienten: pH 4-7; 3-6; 5-8

Strip-Länge	Anfangsspannung	Endspannung	Volt-Stunden
7 cm	150 *	3000 V	8 - 10 kVh
11 cm	150 *	6000 V	20 - 35 kVh
17 cm / 18 cm	150 *	10000 V **	40 - 60 kVh
24 cm	150 *	12000 V **	60 - 80 kVh

* bei der IEF 100 von Hoefer ist der niedrigste einzustellende Spannungswert 250 V

** einige Geräte erreichen eine Maximalspannung von 8000 V bzw. 10000 V

6.2.3. Fokussierungsbedingungen über Nacht

(geeignet für Probenaufgabe mittels *Cup loading*, In-Gel-Rehydratation und Papierbrücken sowie für alle kritischen Proben)

Temperatur : 20 °C					
Stromstärke / Strip : bis zu 70 µA					
Geeignet für alle IPG-Gradienten ⁽¹⁾					
Strip-Längen:			11 cm ⁽²⁾	17 / 18 cm	24 cm
Schritt 1	Stufe	150 V*	3 h	3 h	3 h
2	Stufe	300 V	3 h	3 h	3 h
3	Gradient	1000 V	6 h	6 h	6 h
4	Gradient	10000 V**	1 h	1 h	1 h
5	Stufe	12000 V**	1 h	2,5 h	4,5 h
Gesamtzeit / Gesamt Vh			14 h / ~ 17 kWh	15,5 h / ~ 32 kWh	17,5 h / ~ 52 kWh

⁽¹⁾ bei den basischen IPG-Gradienten 6-10, 5-11 die Stufe 5 um 0,5 -1 h verkürzen

⁽²⁾ bei 11 cm Strips Maximalspannung auf 6000 V limitieren

* bei der IEF 100 von Hoefer ist der niedrigste einzustellende Spannungswert 250 V

** einige Geräte erreichen eine Maximalspannung von 8000 V bzw. 10000 V

6.2.4. Fokussierungsbedingungen über Tag

(geeignet für Probenaufgabe mittels *Cup loading*, In-Gel-Rehydratation und Papierbrücken sowie für alle kritischen Proben)

Temperatur : 20 °C				
Stromstärke / Strip : bis zu 70 µA				
Geeignet für alle IPG-Gradienten ⁽¹⁾				
Strip-Längen:			7 cm ⁽²⁾	11 cm
Schritt 1	Stufe	150 V*	1 h	1 h
2	Stufe	300 V	1 h	1 h
3	Gradient	1000 V	1 h	1 h
4	Gradient	3000 ⁽²⁾ / 6000 V	2 h	2 h
5	Stufe	3000 ⁽²⁾ / 6000 V	2 h	2,5 h
Gesamtzeit / Gesamt Vh			7 h / ~ 10 kWh	7,5 h / ~ 20,5 kWh

⁽¹⁾ bei den basischen IPG-Gradienten 6-10, 5-11 die Stufe 5 um 0,5 h verkürzen

⁽²⁾ bei 7 cm Strips Maximalspannung auf 3000 V limitieren

* bei der IEF 100 von Hoefer ist der niedrigste einzustellende Spannungswert 250 V

Hinweise:

- Um gleiche Voltstundenwerte zu erreichen, kann die Fokussierungsdauer variieren, da die vorgegebene Spannung im Programm nicht immer sofort erreicht wird.
- Bei Verwendung einer Multiphor sind die Fokussierungszeiten entsprechend zu verlängern, da hier nur eine Maximalspannung von 3000 V angelegt werden kann.
- Bei präparativer Probenbeladung (> 1 mg) sollte der Endfokussierungsschritt um 15 % der vorgegebenen Zeit erhöht werden.
- Wenn am Ende der Fokussierung die Streifen nicht sogleich entnommen werden können, empfiehlt es sich, statt einem Halteschritt mit niedriger Spannung, die Diffusion zuzulassen und die Strips vor der Entnahme noch einmal für 15 min. bei Höchstspannung nach zu fokussieren. Die Erfahrung hat gezeigt, dass dadurch die Gefahr der Probenaggregation verringert wird.
- Sollen einzelne IPG Streifen nach der Elektrophorese zu Kontrollzwecken angefärbt werden, müssen sie vor dem Färbeschritt in **20 % Trichloressigsäure** für mind. 20 Min. fixiert werden und anschließend z.B. mit SERVA Violet 17 Färbekit (Kat.-Nr. 35074; weitere Informationen siehe www.serva.de) angefärbt werden.

7. Troubleshooting

Problem	Grund	Abhilfe
Ungleichmäßig verteilte Rehydratisierungslösung auf den IPG-Streifen	Belag/Verunreinigung innerhalb des Rehydratisierungstrays bzw. der Striphalterung der IEF-Einheit	Gründliche Reinigung mit Spülmittel und anschließendem Spülen mit dest. Wasser
	Ungleichmäßiges Pipettieren der Rehydratisierungslösung	Gleichmäßiges Pipettieren in einer Linie
	Rehydratisierungstray bzw. IEF-Einheit steht uneben	Ausrichtung auf dem Labortisch
Reste von Rehydratisierungslösung im Tray oder der Striphalterung	Zu kurz rehydratisiert	Mindestens 6 h ohne Probe (<i>Cup-loading</i>) bzw. 12 h mit Probe (<i>In-Gel-Rehydration</i>)
	Zu großes Volumen	Die Empfehlungen des Herstellers beachten
	Falsche Lagerung der IPG-Streifen	IPG-Streifen immer bei -15 °C bis -25 °C lagern; niemals zu lang bei Raumtemperatur belassen
Ablösung des basischen Bereichs des Gels	Beschädigung der Geloberfläche beim Abziehen der Deckfolie	Immer an der sauren Seite mit dem Abziehen beginnen
Spannung zu gering (8 oder 10 kV nicht erreicht)	Kurze Streifen (7 cm/ 11 cm): 8 kV werden nur mit bestimmtem Proben unter bestimmten Bedingungen erreicht	Kein Grund zur Beunruhigung, aber um die entsprechende IEF Dauer (kVh) zu erreichen, muss die Zeit verlängert werden
	Schlechte Qualität des Harnstoffs bzw. Thioharnstoffs	Verwendung hochqualitativen Harnstoffs bzw. Thioharnstoffs; ggf. Beseitigung von Ionen mit einem Mischbettionentauscher
	Zuviel Salz in der Probe	Entsalzung mittels Mikrodialyse oder Präzipitation. PBS zum Waschen von Zellen durch Lösungen wie 250 mM Saccharose / 1 mM Tris ersetzen
	Reste von TCA nach	Waschen mit 90 % Aceton/

	Präzipitation	10 % Wasser
Problem	Grund	Abhilfe
Bromphenolblau- Bande wanderte nicht vollständig zur Anode	Zuviel Salz in der Probe	Siehe zuvor
Durchbrennen des IPG Streifens	Zuviel Salz in der Probe	Siehe zuvor
Auslaufen des IPG Cover Fluids aus dem Cup während der IEF	Diffusion von Wasser durch hohe Protein- und/oder Salzkonzentrationen und Mitschleppen des Öls	Reduktion der Anfangsspannung und Verlängerung der ersten Niedrigvolt-Schritte. Alternativ, Verwendung einer Einheit mit größere Toleranz bezügl. hoher Protein und/oder Salzkonzentrationen
Mechanische Instabilität durch Quellen des basischen Teils der Streifen während der IEF	Viele Kationen, z. B. Tris, in der Probe	Vermeidung von zuviel Tris-Base; Ersetzen durch 25 mM Spermin-Base, Mikrodialyse der Probe; Auflegen von dest. Wasser getränkten IEF Streifen zwischen Gel und Elektrode zur Aufnahme der Ionen.
Harnstoffkristallisation und Austrocknen der Streifen während der IEF	Zu wenig IPG Cover Fluid (Paraffinöl)	3 ml IPG Cover Fluid für 18 / 24 cm Streifenhalter 100 ml für ein IPGphor-Manifold.
	Auslaufen des Cover Fluids	Reduktion der Anfangsspannung und Verlängerung der ersten Niedrigvolt-Schritte
	Temperatur nicht korrekt	Rehydratisierung und IEF bei 20 °C
„Segel“-artiger Hintergrund im basischen Abschnitt des Gels	Basische Trägerampholyte nicht komplett bei Färbung ausgewaschen	Nur Servalyte® als IPG Puffer verwenden, da geringere Molekülgröße als andere Trägerampholyte

Problem	Grund	Abhilfe
Vertikale Streifen	Ungenügende Äquilibration der IPG Streifen a) Äquilibrationsschritte zu kurz b) Zu wenig Äquilibrationlösung verwendet c) Reduzierende Agenzien	a) Äquilibration: 2x15 min b) 24 cm-Streifen: 6 ml; 18 cm-Streifen: 5 ml; 11 cm-Streifen: 3 ml; 7 cm-Streifen: 2 ml c) im 2. Schritt: Alkylierungsreagenz, z.B. Iodacetamid, verwenden
	Silikonöl als Overlay der IPG Streifen verwendet	SERVA Cover Fluid als Overlay bei Rehydratisierung und IEF-Lauf verwenden
Sehr wenige oder keine Spots	Zu geringe Proteinkonzentration	Proteinquantifizierung; Überprüfung des Protokolls mit einem Standard, z.B. <i>E.coli</i> Lyophilisat; Optimierung des Protokolls zur Probenextraktion
	Bildung von Proteinkomplexen, die nicht ins Gel einwandern	Optimierung der Probenvorbereitung; Probenreinigung durch Präzipitation
	Probleme bei der Silberfärbung	Überprüfung des Färbeprotokolls und der Reagenzien; Verwendung von Glas- oder Metallfärbeschalen, kein Plastik
Fehlende Proteine im Hochmolekularbereich	Bildung von Aggregaten in der ersten Phase der IEF	Geringe Anfangsspannung wählen und damit auch Zeitdauer verlängern
	Zu kurze Äquilibration der IPG Streifen	Verlängerung auf 2 x 20 min
	Ungenügende Äquilibration der IPG-Streifen	Äquilibrationspuffer: SDS auf 6 % (w/v) erhöhen
Fehlende Proteine	Probenapplikation auf die IPG-Streifen nicht optimal	Alternativen testen, auch <i>Cup loading</i> auf unterschiedlichen Seiten
	Ungenügende Äquilibration	Äquilibrationspuffer: SDS auf 6 % (w/v) erhöhen

Problem	Grund	Abhilfe
Vertikale Streifen und verwischte Muster im sauren Bereich nach Verwendung von Thioharnstoff in der 1. Dimension	Verunreinigte Reagenzien	Verwendung einer anderen Lot / besseren Qualität des Thioharnstoffs
	Fokussierung von Thioharnstoff in Gegenwart anderer Reagenzien	Verringerung der Voltstunden (Vh); Herstellerangaben bei den IPG-Streifen befolgen
Vertikale Lücken	Luftblasen zwischen IPG-Streifen (1. Dimension) und dem vertikalen Gel der 2. Dimension	IPG-Streifen sorgfältig auf das vertikale SDS Gel legen und mit Agarose fixieren
	Amphotere Puffer aus der Zellkultur, z. B. HEPES, blockieren einen Teil des pH-Gradienten	Vermeiden amphoterer Puffer
Mehrfachspots in der Vertikalen präparativer Gele	Ungenügende Menge DTT	Mehr DTT beim ersten Äquilibrierungsschritt einsetzen
Spotwolke im Niedermolekularbereich	Teilweiser Abbau von Proteinen zu Peptiden	Verwendung von Protease-Inhibitoren während der Proteinextraktion; Probenapplikation mittels <i>Cup loading</i> , <i>Paper bridge loading</i> oder <i>Active rehydration loading</i> bei angelegter Spannung; Probenreinigung durch Präzipitation
Horizontale Streifen	Unlösliche Bestandteile in der Probe	Zentrifugation vor Probenauftrag auf den IPG- Streifen; falls notwendig auch länger
	Nicht ausfokussiert	Erhöhung der Voltstunden (Vh) des letzten IEF-Schritts.
	Zu lange Fokussierung: instabile Proteine degradieren an ihrem pI, besonders ausgeprägt im basischen Bereich	Verringerung der Voltstunden (Vh) des letzten IEF-Schritts.

Problem	Grund	Abhilfe
Horizontale Streifen	Harnstoff- und/oder Detergenzkonzentration zu gering	Erhöhung der Konzentrationen auf: Harnstoff: 9 M CHAPS: 4 %
	Präzipitationsprotokoll ungeeignet	Keine Ammoniumsulfat-Fällung; entweder <i>Clean-up</i> Kits oder Protokoll nach Wessels und Flügge (Methanol / Chloroform) verwenden
	Ungenügende Rehydratisierung der IPG-Streifen	Prüfen des Protokolls/der Bedingungen
	Nach Fällung noch TCA Reste in der Probe	2 -3 zusätzliche Waschschr itte mit eiskaltem 90 % Aceton/10 % Wasser
	Falsche Probenapplikation führt zu Proteininstabilität	Alternativen testen, z.B. <i>Cup loading</i> am basischen oder sauren Ende des IPG- Streifens
	In großen Mengen vorhandene Proteine bilden Grate, werden aus der Gelmatrix heraus-gedrückt und verteilen sich über die Streifenoberfläche.	IPG-Streifen nur mit Gelseite nach oben laufen lassen
	Horizontale Streifen im sauren Bereich	Probe enthält Nukleinsäuren
Verarmung an DTT im basischen Bereich des Gradienten		IPG-Streifen mit Hydroxylethyldisulfid prä-hydratisieren; reduzierte Probe mittels <i>Cup loading</i> anodisch auftragen
Probenvorbereitung mit Hydroxylethyldisulfid (HED)		Proben niemals mit Hydroxylethyldisulfid behandeln; das HED darf nur für die IPG-Streifen verwendet werden Proben mit reduzierenden Agenzien behandeln.

Problem	Grund	Abhilfe
Horizontale Streifen im sauren Bereich	Bildung von 2-Mercaptoethanol durch Mischen von Hydroxylethyl-disulfid und reduzierenden Agenzien	Niemals Hydroxylethyl-disulfid und reduzierende Agenzien mischen
Horizontale Streifen im sauren und basischen Bereich mit guter Trennung in der Mitte	Salzgehalt der Probe zu hoch	Entsalzung der Probe mittels Mikrodialyse oder Fällung
	Effekte durch Elektroendosmose am Ende von IPG-Streifen mit engem pH-Gradienten aufgrund Anreicherung von Proteinen mit höheren bzw. niedrigeren pls	Auflegen von dest. Wasser- getränkten Filterpapier-stücken zwischen Elektroden und Gel während des letzten IEF-Schrittes
Horizontale Streifen in der Gelmitte mit guter Trennung im sauren und basischen Bereich	Nichteinheitliche Rehydratisierung des IPG-Streifen (ungenügend in der Mitte)	Rehydratisierungslösung muss gleichmäßig über den Streifen verteilt sein; alternativ kann auch vertikale Rehydratisierungskassette verwendet werden
Horizontale, perlenschnurartige Anordnung von Proteinspots	Unterschiedliche Carbamylierung einiger Proteine in Gegenwart von Isothiocyanat	Probe nicht erhitzen; (Thio-) Harnstofflösungen nicht bei Raumtemperatur lagern; nur hoch qualitativen (Thio-) Harnstoff verwenden; ggf. Beseitigung von Ionen mit einem Mischbettionentauscher
	Unterschiedlich glykosylierte Lagerproteine in Pflanzenextrakten	Kein Artefakt.
Wolkige Front und/oder Hintergrund	Mizellenbildung zwischen SDS und nicht- oder zwitterionischen Detergenzien	CHAPS-Gehalt reduzieren (max. 2 %) oder Alternativdetergenz für die Rehydratisierungslösung verwenden
Verwischte und streifige Spotmuster im präparativen Gelen	IEF Bedingungen nicht ausreichend zum Ausfokussieren der Probe	Erhöhen der Voltstunden (Vh) im letzten IEF Schritt um 15 %

Problem	Grund	Abhilfe
Verwischte und streifige Spotmuster in präparativen Gelen	DTT Verarmung in präparativen, basischen Gelen	Zugabe von 2,5 % DTT, 20 % Isopropanol, 5 % Glycerin zur Rehydratierungslösung; bei 2D-Flachbett-Gelen: Auflegen eines in Rehydratierungslösung plus 3,5 % DTT getränkten Elektrodendochts an der Kathode; Zugabe von Hydroxylethylendisulfid
Verlust von sehr basischen Proteinen	Zu lange Dauer/zu viele Voltstunden (Vh) für den basischen Gradienten; Autohydrolyse basischer Puffergruppen im Gel	Verringerung der Voltstunden im letzten IEF-Schritt
Identifikation von Fremdproteinen, z.B. aus Organismen, die nicht auf das Gel aufgetragen wurden	Kontamination durch vorangegangene Proben oder Proteinen aus der Laborumgebung	Verwendung von hoch qualitativen und reinen Reagenzien; gründliches Reinigen der Laborgeräte, insbesondere Rehydratierungstray und IPG-Streifenhalter; Membranfiltration der verwendeten Lösungen
Keine Fokussierung der Proteine	Rehydrations-/Probenpuffer ist mit CO ₂ gesättigt und führt zu extrem hoher Leitfähigkeit	Rehydrations-/Probenpuffer sollte nicht mit Trockeneis gekühlt bzw. eingefroren werden.

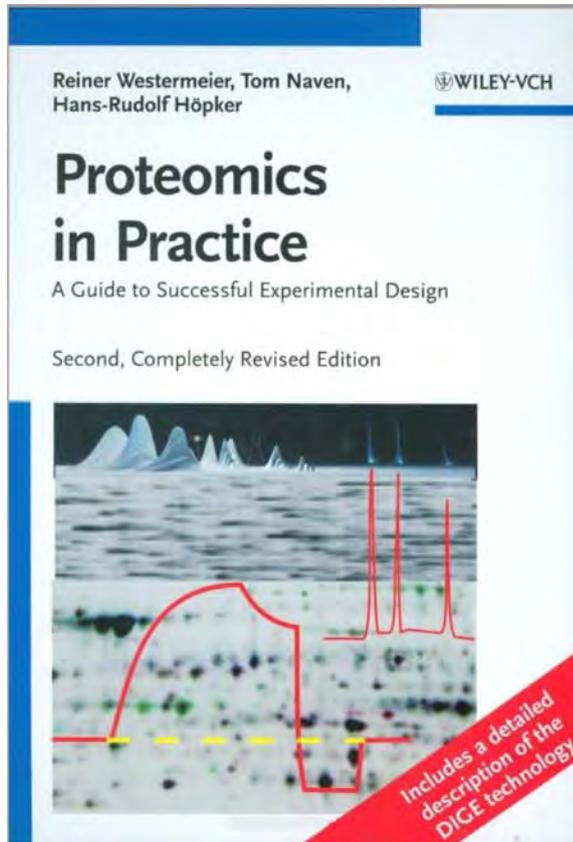
8. Reagenzien und Geräte für die 1D- / 2D-Gel-Elektrophorese

Produkt	Kat.-Nr.
SERVA HPE™ IPG Cover Fluid	43397
Urea	24524
Dithiothreitol (DTT)	20710
CHAPS	17038
SERVA HPE™ IPG strip buffer	43368
SERVA Proteome Markers	39220
Trichloroacetic acid, 20 % solution	36913
Triton® X-100	39795
Glycerol from plant	23176
SDS, 20 % solution	39575
Bromophenol Blue-Na-salt	15375
Iodoacetamide	26710
Acrylamid/Bis Solution 37.5:1 (40 % w/v), 2.6 % C	10681
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	35925
Ammonium persulfate	13375
Laemmli Buffer 10X, for SDS-PAGE	42556
Rehydration tray for IPG Blue Strips	43091
BlueHorizon™ Super Cool Flatbed System	BH-2C
BluePower 3000 power supply	BP-3000
Circulatory Refrigerator Bath WK 230	WK230

9. Literatur

- The Current State of Two-dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients,
A. Görg, C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, W. Weiss, *Electrophoresis* 2000 Apr; 21(6): 1037-53
- Altland, K., *Electrophoresis* 1986, 7, 251-259; *Electrophoresis* 1990, 11, 140-147
- Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Weiss, W., *Electrophoresis* 1998, 19, 1516-1519
- Altland, K., *Electrophoresis* 1990, 11, 140-147

Weiterführende Literatur:



Westermeier R, Naven T, Hoepker HR.
Proteomics in Practice. 2nd ed.
WILEY-VCH, Weinheim (2008).
ISBN 978-3-527-31941
(Direkt zu beziehen über SERVA Electrophoresis)