

T-Rex

Produktinformation

T-Rex Protein Labeling Kit

NH DyeAGNOSTICS GmbH
Weinbergweg 23
D-06120 Halle

Technischer Support
Fon: +49 (0) 345-2799 6413
E-Mail: service@dyeagnostics.com
www.dyeagnostics.com

copyright © NH DyeAGNOSTICS © 2014
Stand 08/2014

T-Rex Protein Labeling Kit

Die T-Rex Fluoreszenzfarbstoffe verfügen über einen NHS-Ester für eine kovalente Bindung an einen Lysinrest z.B. in Aminosäuren von Proteinen. Durch die hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften können T-Rex markierte Proteine bei Einsatz eines adäquaten Imaging-Systems bis zu 0,05 ng detektiert werden.

T-Rex ist kompatibel mit konventionellen Färbungen wie Silbernitrat oder Coomassie Brilliantblau und stellen keinerlei Einschränkung für die massenspektrometrische Analyse dar.

Dieses Labeling-Protokoll ermöglicht quantitative 1D- und 2D-Gel-Analysen, da nur ca. 3% aller Proteine mit jeweils einem Farbstoffmolekül gelabelt werden.

Inhalt

- 20 Reaktionsgefäße mit T-Rex Fluorescent Dye für die Markierung von jeweils 50 µg Protein
- 4 Reaktionsgefäße mit T-Rex Solvent jedes ausreichend für 20 Labeling-Reaktionen

Wichtiger Hinweis

Das T-Rex Solvent enthält Dimethylformamid (DMF, $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$, CAS No: 68-12-2) und ist beim Einatmen, beim Verschlucken oder bei Hautkontakt gesundheitsschädlich.

1 2 3 Easy & Fast Labeling

Zur Vermeidung von Pipettierverlusten empfehlen wir die Verwendung von *Low Retention* Mass Spec kompatiblen Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen (z.B. NH DyeAGNOSTICS Produkt Nr. PR052).

1 Probenvorbereitung

Lösen Sie Ihr Protein in einem geeigneten Probenpuffer. Für eine genaue Quantifizierung der Fluoreszenzsignale (linearer Bereich des Fluoreszenzsignals und der eingesetzten Proteinmenge) sollte die Proteinkonzentration für das Protein-Labeling 1 - 5 µg/µl betragen. Ein Protein-Labeling ist allerdings bis zu einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 15 µg/µl möglich.

Empfehlungen für Probenpuffer

Für ein effizientes Protein-Labeling ist ein pH-Wert > 8,0 und die Abwesenheit von primären Aminen zwingend erforderlich. Die Labeling-Kompatibilität folgender Substanzen wurde getestet:

Substanz	kompatibel
Tris	ja (≤ 100 mM)
HEPES	ja (≤ 100 mM)
Phosphat	ja (≤ 100 mM)
Harnstoff	ja (≤ 8 M)
Thioharnstoff	ja (≤ 2 M)
SDS	ja (≤ 5 %)
Triton X-100	ja (≤ 1 %)
CHAPS	ja (≤ 4 %)
DTT	ja (≤ 5 mM)
Mercaptoethanol	ja (≤ 1 %)
EDTA	ja (≤ 5 mM)
NaCl	ja (≤ 150 mM)
KCl	ja (≤ 50 mM)
Glycerin	ja (≤ 15 %)
Zucker	ja (≤ 12 %)
Aminosäuren	nein
Bromphenolblau	nein
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich)	ja (≤ 1 %)

Um die Kompatibilität von nicht getesteten Reagenzien oder Konzentrationen zu überprüfen, empfehlen wir 50 µg eines Standard-Proteins (z.B. BSA) in 30 mM Tris-HCl (pH 8,5) und der zu überprüfenden Substanz/Konzentration zu markieren. Trennen Sie 0,25 µg markiertes Protein mittels 1D SDS-PAGE und überprüfen Sie das Fluoreszenz-Signal. Als Positivkontrolle (Referenz) dient der gleicher Ansatz ohne zusätzliches Reagenz.

Empfehlungen für 1D SDS-PAGE oder andere Anwendungen

Sollte Ihre Analyse die Reduktionsmittel erfordern, führen Sie den Reduktionsschritt nach dem T-Rex Labeling durch oder entfernen Sie das Reduktionsmittel vor dem Labeling durch Dialyse oder Gelfiltration. Geben Sie für die 1D SDS-PAGE den Bromphenolblau und /oder Reduktionsmittel enthaltenden Ladepuffer erst nach dem Labeling der Proteine hinzu.

Empfohlener Probenpuffer für 2D Gele (IEF- und Labeling-kompatibel)

Reagenz	Konzentration	Menge
Tris	30 mM	0,18 g
Harnstoff	7 M	21,00 g
Thioharnstoff	2 M	7,60 g
CHAPS	4% (w/v)	2,00 g

Zugabe von deionisiertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 ml; pH 8,5 einstellen.

Puffer nicht erhitzen! In kleinen Aliquots bei -20°C lagern.

2 Labeling Protokoll

1. Lassen Sie das T-Rex Reaktionsgefäß sich bis auf Raumtemperatur erwärmen (ca. 5 min).
2. Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz.
3. Lösen Sie den Farbstoff in 2 µl T-Rex Solvent.
4. Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
5. Transferieren Sie ein 50 µg Protein entsprechendes Volumen (ideal bis 10 µl, max. 20 µl) Ihrer zu markierenden Probe in das Reaktionsgefäß.
6. Geben Sie ggf. noch Probenpuffer zum Reaktionsansatz bis zu einem Gesamtvolumen von 12 µl hinzu.
7. Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
8. Inkubieren Sie das Reaktionsgemisch für 30 Minuten auf Eis.
9. Die Proteinprobe ist nun mit T-Rex markiert und kann verwendet werden.

3 Detektion

Um die bestmöglichen Fluoreszenz-Leistungen der T-Rex zu erreichen, empfehlen wir grundsätzlich für jedes Gel einen Vorscan. Hierbei ermitteln Sie die ideale Belichtungszeit Ihrer Kamera bzw. die optimale Detektionsspannung des Photomultipliers, indem die Signalintensität der stärksten Proteinbande/ Proteinspot knapp **unterhalb** der Sättigung liegt.

Anregungs- und Emissions-Eigenschaften

	max. Anregung [nm]	max. Emission [nm]
T-Rex 330	650	665

Nutzen Sie für T-Rex die empfohlenen Filtereinstellungen Ihres Imaging-Systems für z.B. G-Dye300, Cy5, Alexa 647.

Lagerung von Gelen mit T-Rex markierten Proteinen

Um Diffusions-Effekten vorzubeugen, sollten Sie gelabelte Proteine immer unmittelbar nach nach Beendigung der SDS-PAGE mit einem geeignetem Fluoreszenz-Imaging System detektieren. Wenn Sie Ihre Proteine in niedrig fluoreszierenden Glaskassetten trennen (NH Dye-AGNOSTICS Produkt-Nr. PR03, PR04), können diese in den Kassetten noch bis zu 6 h nach Beendigung der SDS-PAGE detektiert werden.

Für eine Lagerung der Gele fixieren Sie diese für 30 min in einer Lösung bestehend aus 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure.

Lagern Sie die Gele im Dunklen in einer Lösung bestehend aus 25 % Ethanol und 3% Glycerin.

Für Fertiggele lesen Sie bitte die Empfehlungen des Herstellers.

Lagerung

Lagern Sie die Reaktionsgefäße mit T-Rex-Lyophilisat unter Lichtabschluss trocken bei -20°C bis -80°C. Markierte Proteine können bis zu 3 Monate bei -80°C gelagert werden.

Mindesthaltbarkeit: Siehe Aufdruck Kitverpackung.