



Produktinformation

Refraction-2D™ QPLEX Labeling Kit

Produkt-Nr. PR60, PR61, PR62

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 © 2013
Stand 05/2013

Refraction-2D™ QPLEX Labeling Kit

Inhalt

Die Anzahl 4G, 8G und 12G der Labeling Kits entspricht der Anzahl von großen 2D-Gelen, die mit dem Kit durchgeführt werden können.

- G-Dye100 – High Performance Fluorescent Dye
- G-Dye200 – High Performance Fluorescent Dye
- G-Dye300 – High Performance Fluorescent Dye
- G-Dye400 – High Performance Fluorescent Dye
- G-Dye Labeling Stop Solution
- G-Dye Solvent
- G-Dye *Low Retention* Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße zur Vermeidung von Pipettierverlusten (Massenspektrometrie kompatibel)

Zusätzlich für Kitgröße 12G - 72G

- 1 Reaktionsgefäß mit G-Dye100 (3G) für das Labeling von 150 µg Protein - für einfaches und schnelles Spotpicking

Spotpicking Guide download:
www.dyeagnostics.com/site/wp-content/uploads/2011/01/SPG_DetailedGuide_de_V2_170412.pdf

Achtung

Das G-Dye 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.

Geprüfte Qualität und kontinuierliche Kontrolle

Um Ihnen eine gleichbleibende Qualität Ihrer Analysen zu sichern, unterliegen alle G-Dyes und die dazugehörigen Refraction-2D™ QPLEX Protein Labeling Kits strengsten Qualitätskontrollen. Jedes Batch wird auf Sensitivität und Labeling-Effizienz hin überprüft und nur erfolgreich getestete Kits verlassen unser Haus. Alle Batches werden bis zum Ablauf des von uns empfohlenen Verwendungsdatums 2-wöchentlich überwacht.



Refraction-2D™ QPLEX Labeling Kit

Allgemeine Hinweise

Entwickelt für modernste 2D Gel-basierte Top Down Proteomics Analysen ermöglicht Ihnen Refraction-2D™ QPLEX mehrere Protein-Proben in einem Gel mit hoher Sensitivität miteinander zu vergleichen (Sample Multiplexing). Es vereinfacht zudem den Vergleich von Gelen unter-einander und ermöglicht Ihnen, Kandidaten-Proteine direkt und ohne nachträgliche Färbungen zu isolieren (siehe Spot Picking Guide).

Die im Kit enthaltenen G-Dye Hochleistungs-Fluoreszenzfarbstoffe sind extrem photostabil, so dass Arbeiten in lichtarmer Umgebung der Vergangenheit angehören. Refraction-2D™ QPLEX-Gele können - nach Fixierung - auch Wochen später in hoher Qualität gescannt werden. Dank der herausragenden Fluoreszenzeigenschaften der G-Dyes können markierte Proteine bei Einsatz eines adäquaten Imaging-Systemes bis zu 0,03 ng detektiert werden.

Die Hochleistungs-Fluoreszenzfarbstoffe G-Dye100, G-Dye200, G-Dye300 und G-Dye400 verfügen über einen aktivierten NHS-Ester für die kovalente Bindung an Lysinreste von Proteinen. Durch das Refraction-2D Labeling wird nur jeweils ein Lysinrest von etwa 3% des Gesamtproteins markiert. Dies ermöglicht die quantitative Multiplex-Fluoreszenz 2D-Gel-Analyse.

Durch unterschiedliche Molekulargewichte der G-Dyes wird eine verminderte Interferenz der einzelnen Fluoreszenz-Emissionen erreicht, was mit einer Steigerung der Fluoreszenz-Performance einhergeht.

Zur Auswertung der drei Fluoreszenz-Gelbilder eignen sich alle am Markt erhältlichen 2D-Auswerteprogramme (www.dyeagnostics.com/site/de/technology/software).

Die G-Dyes sind kompatibel mit konventionellen Färbungen wie Silbernitrat oder Coomassie Brilliantblau und stellen keinerlei Einschränkung für die massenspektrometrische Analyse dar.

Genereller Ablauf von Refraction-2D™ QPLEX Analysen

1. Experimentelles Design
2. Lösen der Proteine in einem kompatiblen Puffer
3. Verwendung eines internen Standards (IS)
4. Herstellung der G-Dye Working Solution
5. Markierung von Proteinproben für Refraction-2D™ QPLEX
6. Fluoreszenz-Imaging

Für weitere Informationen, Hinweise und Tipps kontaktieren Sie uns unter service@dyagnostics.com.

1. Experimentelles Design

Für die Vergleiche von drei Proben (z.B. Probe A Kontrolle, Probe B Behandlung 12h, Probe C Behandlung 24h) benötigen Sie ein 2D Gel plus entsprechende Replikate. Tragen Sie dabei pro Gel jeweils drei Proben und den internen Standard (IS) auf. Der interne Standard repräsentiert eine Mischung aus allen Proteinproben Ihres Experimentes im gleichen Verhältnis und ermöglicht Ihnen eine einfache Gel-übergreifende Auswertung.

Um induzierte biologische Veränderungen im Proteom von natürlichen Varianzen Ihrer Probe unterscheiden zu können, erfordert Ihre Analyse die Verwendung von biologischen Replikaten. Da alle Fluoreszenzfarbstoffe generell eine leicht unterschiedliche Bindungsaffinität zu Proteinen besitzen, empfehlen wir zudem einen sogenannten "Dye-Swap" durchzuführen.

Markieren Sie für ein Refraction-2D™ QPLEX Gel (Größe ca. 22 x 24 cm, 4 Proben, 200 µg Protein gesamt) jede Probe (50 µg Protein) mit 1G Farbstoff. 1G entspricht 1 µl G-Dye Working Solution des jeweiligen G-Dye.

Beispiel Dye-Swap:

- Gel 1: Probe A (50 µg) markiert mit **G-Dye200** + Probe B (50 µg) markiert mit **G-Dye300** + Probe C (50 µg) markiert mit **G-Dye400** + IS (50 µg) markiert mit G-Dye100
- Gel 2: Probe A (50 µg) markiert mit **G-Dye300** + Probe B (50 µg) markiert mit **G-Dye200** + Probe C (50 µg) markiert mit **G-Dye400** + IS (50 µg) markiert mit G-Dye100
- Gel 3: Probe A (50 µg) markiert mit **G-Dye400** + Probe B (50 µg) markiert mit **G-Dye200** + Probe C (50 µg) markiert mit **G-Dye300** + IS (50 µg) markiert mit G-Dye100

2. Lösen der Proteine in einem kompatiblen Puffer

Um eine optimale Markierung der Proteine mit den G-Dyes zu gewährleisten, empfehlen wir, die Proteinproben in einem Refraction-2D™ kompatiblen Probenpuffer zu lösen (siehe unten). Die Proteinkonzentration der Proben sollte dabei idealerweise 5 µg/µl betragen¹. Stellen Sie sicher, dass der pH-Wert Ihrer Proteinlösung vor der Markierung größer 8,0 ist.

¹ Die geringste von uns empfohlene Proteinkonzentration beträgt 1 µg/µl. Verwenden Sie hier weiterhin 1 µl der G-Dye Working-Solution sowie 1 µl der Labeling Stop Solution. Bei geringeren Proteinkonzentrationen empfehlen wir eine Aufkonzentrierung.

Refraction-2D™ QPLEX kompatibler Probenpuffer

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

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.

3. Verwendung eines internen Standards (IS)

Die Verwendung eines internen Standards ermöglicht Ihnen eine gelübergreifende Auswertung. Zur Markierung des internen Standards empfehlen wir die Verwendung des G-Dye100.

Der interne Standard repräsentiert eine Mischung aus allen Proteinproben Ihres Experimentes im gleichen Verhältnis. Für n (n = Anzahl) 2D Gele stellen Sie eine Mischung aus gleichen Proteinmengen aller im Experiment enthaltenen Proben her und stellen die Proteinkonzentration mit einem Refraction-2D™ QPLEX kompatiblen Puffer (siehe Probenpuffer) auf 5 µg/µl ein. Markieren Sie dieses Gemisch mit 1G G-Dye100.

Beispiele:

n = 1; Proben A, B und C

Vereinigen Sie 16,7 µg Protein der Probe A mit 16,7 µg Protein der Probe B und 16,7 µg Protein der Probe C, stellen Sie die Proteinkonzentration auf 5 µg/µl mit Probenpuffer ein und labeln Sie dieses Gemisch mit 1G (=1 µl) G-Dye100.

n = 5; Proben A, B und C

Vereinigen Sie 83,3 µg Protein der Probe A mit 83,3 µg Protein der Probe B und 83,3 µg Protein der Probe C, stellen Sie die Proteinkonzentration auf 5 µg/µl mit Probenpuffer ein und labeln Sie dieses Gemisch mit 5G (=5 µl) G-Dye100. Verteilen Sie den gelabelten IS auf 5 Gele bzw. IPG-Streifen a 50 µg Protein.

4. Herstellung der G-Dye Working Solution

Hinweis: Zur Vermeidung von Pipettierverlusten empfehlen wir, die im Kit enthaltenen G-Dye Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße zu verwenden.

1. Lassen Sie die G-Dye Reaktionsgefäße bis auf Raumtemperatur erwärmen (ca. 5 min).
2. Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße kurz.
3. Lösen Sie die G-Dyes in
 - 4,5 µl** G-Dye Solvent für Refraction-2D™ QPLEX **4G, 8G** Kit (Produkt PR60, PR61).
 - 12,5 µl** G-Dye Solvent für Refraction-2D™ QPLEX **12G** Kit (Produkt PR62).
4. Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz. Die G-Dye Working Solution ist nun für die weitere Verwendung bereit.

5. Markierung von Proteinproben für Refraction-2D™ QPLEX

Hinweis: Alle Arbeiten mit Proteinproben sollten auf Eis vorgenommen werden.

1. Transferieren Sie 50 µg Proteinprobe (≤10 µl) in ein G-Dye Reaktionsgefäß.
2. Geben Sie ggf. Probenpuffer zum Reaktionsansatz bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl hinzu.
3. Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
4. Geben Sie 1 µl G-Dye Working Solution hinzu. Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
5. Inkubieren Sie das Reaktionsgemisch für 30 Minuten auf Eis.
6. Stoppen Sie die Markierungsreaktion durch Zugabe von 1 µl G-Dye Labeling Stop Solution.
7. Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz. Inkubieren Sie das Reaktionsgemisch für 10 Minuten auf Eis.
8. Die Proteinprobe kann nun für weitere Analysen verwendet werden (z.B. IEF).

6. Fluoreszenz-Imaging

Jeder Fluoreszenzfarbstoff benötigt für seine optimale Leistung eine spezifische Anregungsenergie. Des Weiteren beeinflussen die Beschaffenheit Ihrer Probe und Gele die notwendige Anregungsenergie.

Um eine bestmögliche Fluoreszenz-Detektion zu erreichen, sollten Sie vor dem eigentlichen Scan einen Vorscan durchführen, bei dem Sie die optimale Detektionsspannung des Photomultipliers (PMT) bzw. die Belichtungszeit der CCD-Kamera für den Fluoreszenz-Farbstoff bei der geringsten Auflösung ermitteln. Beachten Sie dabei, dass die Signalintensität der stärksten Proteinspots knapp unterhalb der Sättigung liegt (Sättigung: 65.535 Graustufen bei 16-Bit).

Refraction-2D™ QPLEX Gele können fixiert und gelagert werden, ohne dass das Imaging beeinträchtigt wird. Gele können vor dem Scannen bis zu 24 h in den Glaskassetten aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung fixieren Sie das Gel für 30 min in einer Lösung aus 40% Ethanol und 10% Essigsäure. Lagern Sie Ihre Gele in einer Lösung aus 25% Ethanol und 3% Glycerol. Für ein erneutes Scannen, inkubieren Sie Ihr Gel vorher für 15 min in Wasser. Bei Verwendung von Fertiggelel beachten Sie bitte die Hersteller-Angaben.

Weitere Informationen finden Sie online unter [www. http://www.diagnostics.com/site/products/refraction-2d/](http://www.diagnostics.com/site/products/refraction-2d/) im Bereich "Weitere Informationen".

G-Dye Anregungs- und Emissions-Eigenschaften

G-Dye	max. Anregung [nm]	max. Emission [nm]
G-Dye100	498	524
G-Dye200	554	575
G-Dye300	648	663
G-Dye400	736	760

Lagerung

Lagern Sie die G-Dyes unter Lichtausschluss bei -20°C bis -80°C. Markieren Sie die Proteine innerhalb von drei Wochen nach dem Lösen der G-Dyes. Markierte Proteine können bis zu drei Monate bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Mindesthaltbarkeit

Siehe Aufdruck Quality-Label

Disclaimer

Refraction-2D™ ist eine neue Technologie für die Multiplex-Fluoreszenz 2D-Gelelektrophorese. Anders als die von GE Healthcare angebotene Ettan® DIGE-Analyse verwendet die Refraction-2D™ Technologie keine Farbstoffe, die in ihrer elektrophoretischen Mobilität aufeinander angepasst sind. Dadurch ermöglicht die Refraction-2D™ Technologie sowohl eine höhere Sensitivität als auch ein besseres Spotpicken.