

## Produktinformation

# Saturn-2D™ REDOX Labeling Kit 6R

Product no. PR412

NH DyeAGNOSTICS GmbH  
Weinbergweg 23  
D-06120 Halle

Technical Support  
Fon: +49 (0) 345-2799 6413  
e-mail: service@dyeagnostics.com  
www.dyeagnostics.com  
copyright © NH DyeAGNOSTICS ® 2017  
Stand 09/2017 (1)

FOR RESEARCH USE ONLY

## 1 Produkte und Inhalt

Pack 1		Pack 2	
S-Dye 200	2x 3R	Redox Matrix (ready to use, 50%)	1x
S-Dye 300	2x 3R	Redox Wash Buffer	1x
S-Dye Solvent	1x	Redox Labeling Buffer	1x
TCEP	1x		
ddH <sub>2</sub> O	1x		
Redox Stop Solution	1x		
Cysteine interacting compound (CinC)	2x 3R		
CinC solvent	1x		
<b>additionally</b>			
S-Dye Low-retention Tubes & Tipps			1x

## 2 Lagerung und Haltbarkeit

Lagern Sie die Redox Stop Solution, S-Dyes, S-Dye Solvent, CinC, CinC solvent, TCEP und ddH<sub>2</sub>O (Pack 1) unter Lichtausschluss bei -20°C bis -80°C.

Lagern Sie Redox Matrix, Redox Wash Buffer und Redox Labeling Buffer (Pack 2) bei +2 bis +8°C.

Mind. haltbar bis: Siehe Aufdruck Kitverpackung

Lösen Sie S-Dyes und CinC kurz vor der Verwendung. Lagern Sie S-Dye Working Solution kurzfristig (< 2 h) auf Eis. Lagern Sie nicht verwendete S-Dye und CinC Working Solution bei -20°C bis -80°C und verbrauchen Sie diese innerhalb von 3 Wochen. Vermeiden Sie wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen. Markierte Proteine können mind. drei Monate bei -80°C gelagert werden.

## 3 Gefahrenhinweis

S-Dye and CinC Solvent enthält Dimethylformamid (DMF, CAS No: 68-12-2) und ist beim Einatmen, beim Verschlucken oder bei Hautkontakt gesundheitsschädlich.

Die Redox-Matrix enthält Konservierungsstoffe (ätzend).

## 4 Sie benötigen zusätzlich:

- Saturn-2D™ kompatibler Probenpuffer (siehe 7.2)
- je Probe ca. 0,5 mg DTT (Dithiothreitol)
- 2D-Gelelektrophorese-System (inkl. Zubehör und Materialien)
- opt.: Niedrig-fluoreszierende Glaskassetten oder VELUM GOLD Precast 2D Gels (PR237, PR241)
- Imaging-System zur Detektion grüner und roter Fluoreszenz
- Software zur Prozessierung und Auswertung der Daten (z.B. Delta-2D; erhältlich unter [www.dyeagnostics.com](http://www.dyeagnostics.com))
- Tischzentrifuge (passend für 2 ml Reaktionsgefäße; mind. 800 xg)

## 5 Allgemeine Hinweise

Saturn-2D™ REDOX ist eine Neuentwicklung für die einfache Visualisierung der komplexen Antwort im Proteom von Zellen auf Stress. Mit Saturn-2D™ REDOX werden Probenspezies mit unterschiedlichem Redox-Potential spezifisch markiert und nachfolgend miteinander verglichen.

Die neue CinC™-Technologie (Cysteine interacting Compound) löst das Problem, dass durch die unterschiedliche Anzahl

Farbstoff-markierter Cysteine in den zu vergleichenden Proben ein Spotmatching nicht oder nur begrenzt möglich war. S-Dye200 und S-Dye300 sind etablierte Maleimid-aktivierte Hochleistungs-Fluoreszenzfarbstoffe für die Proteinmarkierung (Labeling). Die S-Dyes binden an reduzierte Cysteine von Proteinen. Diese können dann elektrophoretisch aufgetrennt und durch die spezifischen S-Dye-Fluoreszenzen detektiert werden. In Kombination mit einer 2D-Auswertungssoftware (<http://www.dyeagnostics.com/site/technology/software/>) sind die S-Dyes ideal für die Verwendung von Multiplex-Fluoreszenz 2D-Gelanalysen geeignet. Dabei können mit einem Saturn-2D™ REDOX 6R Kit je 6x 5 µg Protein mit S-Dye200 und mit S-Dye300 markiert werden.

## 6 Übersicht: Saturn-2D™ REDOX Analysen

1. Experimentelles Design
2. Lösen der Proteine in einem Saturn-2D™ REDOX kompatiblen Puffer
3. Herstellung der TCEP-Reduktionslösung
4. Herstellung der S-Dye Working Solution
5. Herstellung der CinC Working Solution
6. Redox-Labeling
7. Entfernung überschüssiger CinC Moleküle
8. Herstellung des Internen Standards (IS)
9. Fluoreszenz-Imaging

Bei Fragen kontaktieren Sie uns unter [service@dyeagnostics.com](mailto:service@dyeagnostics.com).

## 7 Detailliertes Protokoll für Saturn-2D™ REDOX Analysen

### 7.1 Experimentelles Design

Für die Vergleiche von zwei Proben (z.B. Probe A Kontrolle, Probe B gestresst) benötigen Sie zwei 2D Gele plus entsprechende Replikate. Jede Probe wird zunächst mit dem CinC markiert, anschließend reduziert und mit dem S-Dye markiert (vgl. Abbildung 1). Der CinC blockiert alle ursprünglich reduzierten Cysteine und der S-Dye markiert und zeigt so alle ursprünglich oxidierten Cysteine (Ausnahme: zu Sulfin- oder Sulfonsäure oxidierte Cysteine). Pro Gel tragen Sie eine Probe und den internen Standard (IS) auf. Der IS repräsentiert eine Mischung aus allen Proteinproben (vollständig reduziert) Ihres Experimentes im gleichen Verhältnis und ermöglicht Ihnen eine einfache gel-übergreifende Auswertung. Ein Dye-Swap ist nicht erforderlich. Um auszuschließen, dass Unterschiede im Redox-Muster auf der differentiellen Regulation der Proteinexpression beruhen, führen Sie abschließend ein Saturn-2D™ Experiment durch.

### 7.2 Lösen der Proteine in einem Saturn-2D™ REDOX kompatiblen Probenpuffer

Um eine optimale Markierung der Proteine mit den S-Dyes zu gewährleisten empfehlen wir, die Proteinproben in einem Saturn-2D™ kompatiblen Probenpuffer (z.B. basierend auf 10-100 mM Tris oder 10-100 mM HEPES) zu lösen. Vermeiden Sie die Verwendung von Thiolen oder primären Aminen. Achten Sie darauf,

dass der pH-Wert der Probe kleiner als 8,0 ist (optimal pH 7,5). Die Proteinkonzentration sollte mindestens 1 mg/ml betragen.

*Hinweis: Sollte die Proteinkonzentration außerhalb dieses Bereiches liegen, fällen Sie die Probe und nehmen Sie diese anschließend in einem geringeren Volumen an Probenpuffer auf bzw. verdünnen Sie die Probe in Probenpuffer.*

### 7.3 Herstellung der TCEP-Reduktionslösung

- Geben Sie 400 µl ddH<sub>2</sub>O in das Reaktionsgefäß mit TCEP.
- Vortexen und zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz.
- Ihre TCEP-Reduktionslösung ist nun für die weitere Verwendung bereit.

*Hinweis: Für die Reduktion der Proteine empfehlen wir die Verwendung des mitgelieferten TCEP anstelle von DTT. DTT interagiert mit den S-Dyes und muss bei Verwendung vor der eigentlichen Labelingreaktion wieder entfernt werden (z.B. durch Dialyse).*

### 7.4 Herstellung der S-Dye Working Solution

*Hinweis: Lösen Sie S-Dyes kurz vor der Verwendung. Lagern Sie gelöste S-Dyes kurzfristig (< 2h) auf Eis. Lagern Sie nicht verwendete S-Dyes bei -20°C bis -80°C und verbrauchen Sie diese innerhalb von 3 Wochen. Vermeiden Sie wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen.*

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

- Lassen Sie die S-Dye Reaktionsgefäße bis auf Raumtemperatur erwärmen.
- Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße kurz.
- Lösen Sie die S-Dyes:

S-Dye 200 / 300 for 3 reactions (3R):

in 16 µl S-Dye Solvent je Reaktionsgefäß (PR412)

- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Die S-Dye Working Solution ist nun für die weitere Verwendung bereit.

## 7.5 Herstellung der CinC Working Solution

*Hinweis: Lösen Sie CinC kurz vor der Verwendung. Lagern Sie gelöste CinC kurzfristig (< 2h) auf Eis. Lagern Sie nicht verwendete CinC bei -20°C bis -80°C und verbrauchen Sie diese innerhalb von 3 Wochen. Vermeiden Sie wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen.*

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

- Lassen Sie die CinC Reaktionsgefäße bis auf Raumtemperatur erwärmen.
- Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße kurz.
- Lösen Sie die CinC:

CinC for 3 reactions (3R):

in 16 µl S-Dye Solvent je Reaktionsgefäß (PR412)

- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Die CinC Working Solution ist nun für die weitere Verwendung bereit.

## 7.6 Redox Labeling (siehe auch Tabelle 1)

Alle Arbeiten mit Proteinproben sollten auf Eis vorgenommen werden.

1. Stellen Sie die Proteinkonzentration Ihrer Probe auf 0,55 µg/µl mit Redox Labeling Buffer ein.
2. Geben Sie zu 9 µl Proteinprobe (entsprechend 5 µg Protein) 3 µl CinC-Working Solution.\*\*
3. Inkubieren Sie den Ansatz für 1 Stunde bei 35°C.\*\*
4. Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von 3 µl Redox Stop Solution.\*\*
5. Inkubieren Sie den Ansatz für 10 min bei 35°C.\*\*
6. Entfernen Sie überschüssigen CinC (vgl. Punkt 7).
7. Geben Sie 2,5 µl TCEP-Reduktionslösung zu Ihrem Ansatz. \*\*
8. Inkubieren Sie den Ansatz für 1 Stunde bei 35°C.\*\*
9. Geben Sie 5 µl S-Dye300 Working Solution zu Ihrem Reaktionsansatz.\*\*
10. Inkubieren Sie den Ansatz für 1 Stunde bei 35°C. \*\*

11. Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von 6 µl Redox Stop Solution. \*\*

12. Inkubieren Sie den Ansatz für 10 min bei 35°C. \*\*

13. Nach Zugabe des entsprechenden Volumens Rehydratisierungspuffers kann die Probe direkt auf den IPG-Steifen aufgetragen werden.

\*\* Mischen (Vortex) und zentrifugieren sie anschließend kurz.

## 7.7. Entfernung überschüssiger CinC-Moleküle

### 7.7.1 Vorbereitung der Säule:

- Mischen Sie die Redox-Matrix gründlich, so dass eine homogene Suspension entsteht.

- Beladen Sie die leere Spin-Säule. Verwenden Sie die in der Tabelle 2 (siehe unten) angegebenen Volumen an Matrix je nach Größe Ihres Ansatzes. Teilen Sie ggf. Ihren Ansatz und verwenden Sie mehrere Säulen.

- Setzen Sie die beladene Säule auf ein 2 ml Reaktionsgefäß und zentrifugieren Sie für 2 min bei 800 x g.

- Verwerfen Sie den Durchlauf.

### 7.7.2 Equilibrieren der Säule:

- Geben Sie 500 µl Wash Buffer auf die Säule.

- Zentrifugieren Sie für 1 min bei 800 x g.

- Verwerfen Sie den Durchlauf.

- Wiederholen Sie den Equilibriervorgang zweimal und verlängern Sie dabei den letzten Zentrifugationsschritt auf 2 min.

### 7.7.3 Laden der Probe:

- Setzen Sie die Säule auf ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß.

- Geben Sie Ihre Probe langsam und mittig auf die Matrix.

### 7.7.4 Eluieren der Probe:

- Zentrifugieren Sie für 2 min bei 800 x g.

- Vereinigen Sie ggf. die Durchläufe geteilter Ansätze.

- Bestimmen Sie das genaue Durchlaufvolumen (z.B. mit einer Pipette).

Ansatz	1R	2R	3R	4R	5R	6R
Volumen Probe (µl)	15	30	45	60	75	90*
Volumen Matrix pro Säule (µl)	288	288	432	576	720	432
Säulen	1	1	1	1	1	2
Ansatz	1R	2R	3R	4R	5R	6R
Volumen Interner Standard (µl)	15	30	45	60	75	90*
Volumen Matrix pro Säule (µl)	288	288	432	576	720	432
Säulen	1	1	1	1	1	2

\* Ansatz auf 2 Säulen aufteilen.

Tab. 2: Benötigte Mengen Redox Matrix

## 7.8 Herstellung des Internen Standards (IS)

Der interne Standard (IS) ist eine Mischung aus allen Proteinproben (vollständig reduziert) Ihres Experimentes im gleichen Verhältnis. Der IS sollte parallel zu Ihren anderen Ansätzen hergestellt werden und wird wie die eigentliche Probe behandelt (inkl. CinC-Removal). Pro Gel benötigen Sie 5 µg Proteingemisch als IS.

### 7.8.1 Herstellung des IS:

- Mischen Sie für die Herstellung des IS alle Proben des Experimentes im gleichen Verhältnis.
- Stellen Sie die Proteinkonzentration des IS auf 0,55 µg/µl mit Redox Labeling Buffer ein. Pro Gel benötigen Sie 5 µg (entsprechend 9 µl) Proteingemisch.

### 7.8.2 Labeling des IS:

Im Folgenden ist das Labeling eines IS für ein Gel (5 µg Protein in 9 µl) beschrieben. Für das Labeling des IS für mehrere Gele skalieren Sie den Ansatz entsprechend.

- Geben Sie 3 µl CinC Solvent zu 9 µl IS \*\*
- Inkubieren Sie den Ansatz für 1 h bei 35°C \*\*.
- Geben Sie 3 µl ddH<sub>2</sub>O hinzu \*\*
- Inkubieren Sie den Ansatz für 10 min bei 35°C \*\*
- Führen Sie, wie in Abschnitt 7.7 beschrieben, CinC Removal durch.
- Geben Sie 2,5 µl TCEP-Reduktionslösung zu.\*\*

- Inkubieren Sie den Ansatz für 1 Stunde bei 35°C.\*\*
- Geben Sie 5 µl S-Dye200 Working Solution (je 5 µg Protein) dazu. \*\*
- Inkubieren Sie den Ansatz für 1 Stunde bei 35°C.\*\*
- Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von 6 µl Redox Stop Solution (je 5 µg Protein).\*\*
- Inkubieren Sie den Ansatz für 10 min bei 35°C. \*\*
- Nach Zugabe des entsprechenden Volumens Rehydratisierungspuffers kann die Probe direkt auf den IPG-Steifen aufgetragen werden.

\*\* Mischen (Vortex) und zentrifugieren sie anschließend kurz.

## 7.9 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).

Weitere Informationen finden Sie online unter [www. http://www.dyeagnostics.com/](http://www.dyeagnostics.com/)

### S-Dye Anregungs- und Emissions-Eigenschaften

S-Dye	max. Anregung [nm]	max. Emission [nm]
S-Dye200	555	576
S-Dye300	649	664

## 8 Post-elektrophoretische Anwendungen

Saturn-2D™ REDOX 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 Fertiggelen beachten Sie bitte die Hersteller-Angaben.

Die Markierung von Cysteinen mit S-Dyes hat keinen Einfluss auf die spätere Identifizierung durch massenspektrometrische Analysen. Es beeinflusst weder die Effizienz enzymatischer Verdauung noch die Sequenzabdeckung im Vergleich zu unmarkierten Proteinen.

Zur Identifizierung redox-sensitiver Proteine nach Saturn-2D™ REDOX-Analysen empfehlen wir die Anfertigung eines präparativen Gels (Verwenden Sie hierfür den Saturn-2D™ Labeling Kit 8S Prep; PR33). Geben Sie bei der Analyse der massenspektrometrischen Daten die Farbstoffmarkierung als Modifikation der Cysteine an (delta-mass auf Anfrage).

S-Dye markierte Proteine können geblottet und mit allen üblichen Färbungen zusätzlich detektiert werden (beachten Sie dabei die Detektionsgrenzen der Färbungen sowie die benötigten Detektionsswellenlängen; Färbungen können das S-Dye-Signal maskieren).

		Labeling I						CinC-Removal		
An-satz	Volumen Protein-probe (µl)	CinC (µl)	CinC Solvent (µl)		Redox Stop Solution (µl)	ddH <sub>2</sub> O		Gesamt-Volumen (µl)	Volumen Matrix (µl)	Gesamt-Volumen (µl)
Probe	9	3	---	Inkubieren Sie für 1h bei 35°C.	3	---	Inkubieren Sie für 10 min bei 35°C.	15	288	15
IS	9	---	3		---	3		15	288	15

Forts.	Reduktion		Labeling II					
An-satz	TCEP Reducing Solution (µl)		S-Dye 200 (µl)	S-Dye 300 (µl)		Redox Stop Solution (µl)	Gesamt-volumen (µl)	
Probe	2,5	Inkubieren Sie für 1h bei 35°C.	---	5	Inkubieren Sie für 1h bei 35°C.	6	Inkubieren Sie für 10 min bei 35°C.	28,5
IS	2,5		5	---		6		28,5

Tab. 1: Pipettierschema für Saturn-2D™ REDOX Analysen

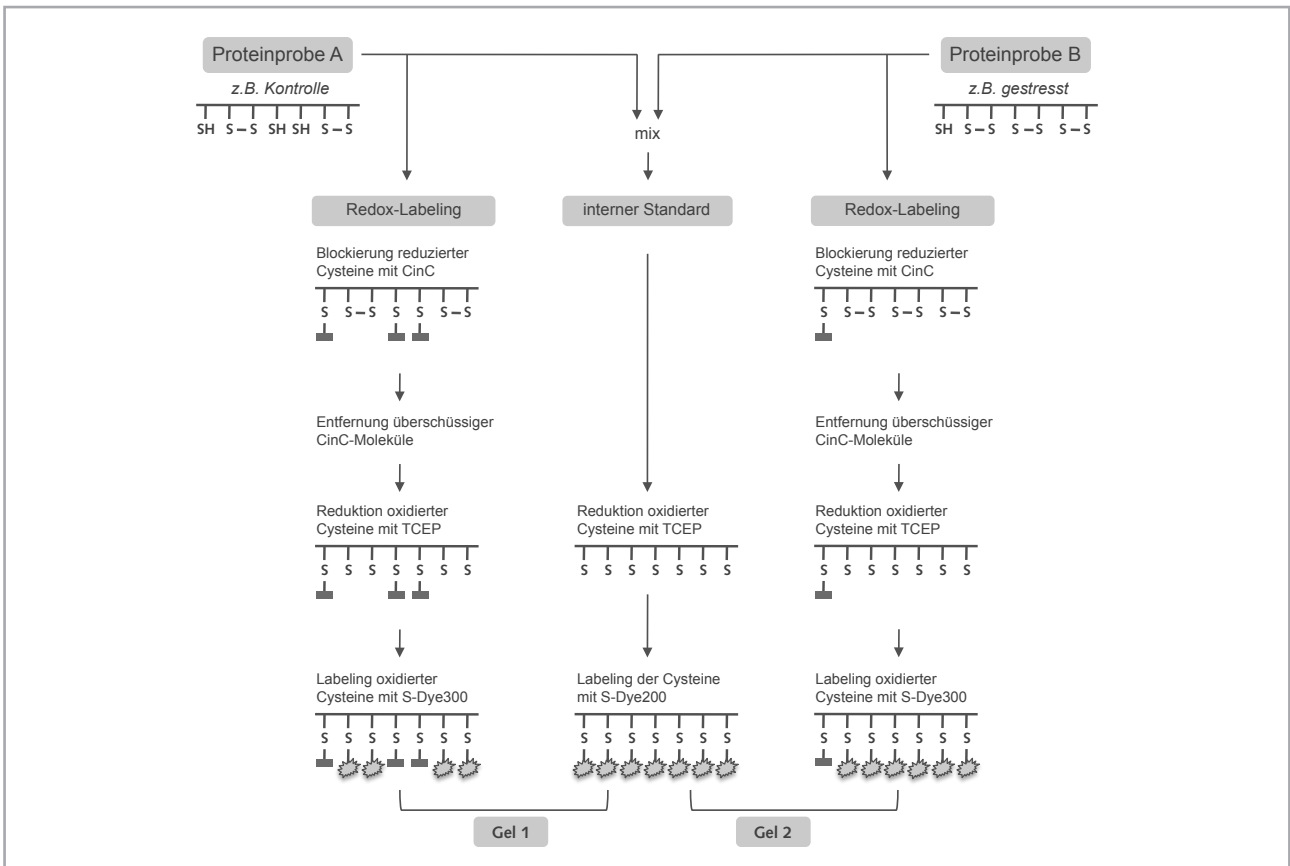


Abb. 1: Experimentelles Design für Saturn-2D™ REDOX Analysen