

Produktinformation

Saturn-2D™ Labeling Kit XS Titration Kit

Product no. PR30

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

Saturn-2D™ XS Titration Kit	
Produkt-Nr.	PR30
S-Dye 200	1x XS (for 3 reactions)
S-Dye Solvent	1x
TCEP	1x
ddH ₂ O	1x
S-Dye Low-retention Tubes & Tipps	1x

2 Lagerung und Haltbarkeit

Lagern Sie die S-Dyes, S-Dye Solvent, TCEP und ddH₂O unter Lichtausschluss bei -20°C bis -80°C.

Mind. haltbar bis: Siehe Aufdruck Kitverpackung

Lösen Sie S-Dyes kurz vor der Verwendung. Lagern Sie S-Dye Working Solution kurzfristig (< 2 h) auf Eis. Lagern Sie nicht

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

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
- opt.: Software zur Prozessierung und Auswertung der Daten (z.B. Delta-2D; erhältlich unter www.dyeagnostics.com)

5 Allgemeine Hinweise

S-Dye200 ist ein Maleimid-aktivierter Hochleistungs-Fluoreszenzfarbstoff für die Proteinmarkierung (Labeling). Die Proteine können nach Markierung elektrophoretisch oder chromatografisch aufgetrennt und durch die spezifische S-Dye-Fluoreszenz detektiert werden.

S-Dyes binden kovalent an reduzierte Cysteine von Proteinen. Je nach REDOX-Status liegen Cysteine entweder reduziert und damit frei zugänglich für die Markierung vor oder oxidierte Cysteine werden durch ein starkes Reduktionsmittel (TCEP) reduziert und damit für die Farbstoffbindung zugänglich gemacht.

Da der Cystein-Gehalt je nach Probe stark variieren kann, muss für jeden Probentyp die optimale Menge an TCEP und S-Dye ermittelt werden (Labeling-Stufe). Der Titrations-Kit dient der Ermittlung der idealen Markierungsparameter für eine nachfolgende Saturn-2D™ Analyse.

Sie benötigen 20 µg Protein einer entsprechenden Probe und vier 2D-SDS-Gele (Titrationsgele, plus optional: ein 1D-SDS-Gel).

Bei Fragen kontaktieren Sie uns unter service@dyeagnostics.com.

6 Übersicht: Ermittlung der idealen Labeling Parameter (Labeling-Stufe)

1. Lösen der Proteine in einem Saturn-2D™ kompatiblen Probenpuffer
2. Herstellung der TCEP-Reduktionslösung
3. Herstellung der S-Dye Working Solution
4. Markierung von Proteinproben für Titrationsgele
5. Fluoreszenz-Imaging
6. Vergleich der Spotmuster der Titrationsgele

Bei Fragen kontaktieren Sie uns unter service@dyeagnostics.com.

7 Detailliertes Protokoll für die Ermittlung der optimalen Labeling Parameter (Labeling-Stufe)

7.1 Lösen der Proteine in einem Saturn-2D™ 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). Beachten Sie weiterhin, dass die Proteinkonzentration der Proben zwischen 0,55 und 10,0 mg/ml liegt.

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.

7.2 Herstellung der TCEP-Reduktionslösung

- Geben Sie 400 µl ddH₂O 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).

7.3 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 das S-Dye Reaktionsgefäß bis auf Raumtemperatur erwärmen.
- Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße kurz.
- Lösen Sie den S-Dye:

S-Dye 200 for 3 reactions (XS):

in 12 µl S-Dye Solvent je Reaktionsgefäß (PR30).

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

7.4 Markierung von Proteinproben für Titrationsgele

Alle Arbeiten mit Proteinproben sollten auf Eis vorgenommen werden.

Markieren Sie Ihre zu analysierende Probe/Probentyp/Mischprobe.

Gehen Sie wie folgt vor (siehe auch Tabelle 1, Seite 3):

- Stellen Sie Ihre Probe auf eine Proteinkonzentration von 0,55 µg/µl mit Saturn-2D™ kompatiblen Probenpuffer (siehe 7.1) ein.
- Geben Sie zu 9 µl (entsprechend 5 µg) Ihrer Proteinprobe die entsprechenden Mengen an TCEP-Reduktionslösung hinzu.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Inkubieren Sie den Ansatz für 1 Stunde bei 35°C.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Geben Sie die S-Dye Working Solution zu Ihrem Reaktionsansatz.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Inkubieren Sie den Ansatz für 1 Stunde bei 35°C.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Zum Abstoppen der Labeling-Reaktion stellen Sie eine DTT-Konzentration von 65 mM im Reaktionsansatz ein (z.B. durch Zugabe eines Volumenteils IEF-Ladepuffer, der 130 mM DTT enthält).

- Nach Zugabe des entsprechenden Volumens Rehydratisierungspuffers kann die Probe direkt auf den IPG-Steifen aufgetragen werden.
- Optional können Sie die Markierung mittels 1D-SDS-PAGE überprüfen (empfohlene Proteinmenge: 0,1 µg pro Spur).

7.5 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

7.6 Vergleich der Spotmuster der Titrationsgele

Vergleichen Sie die Spotmuster aller Titrationsgele. Durch den Masse- und Ladungseintrag der kovalent gebundenen S-Dye-Moleküle kann es bei unzureichendem Labeling (zu geringe S-Dye-/TCEP-Mengen) zur Ausbildung von horizontal/diagonal verlängerten Spots, Streaking bzw. zu Spot-Verschiebungen (Perlschnur-Effekt) kommen (Beispiele auf www.dyeagnostics.com).

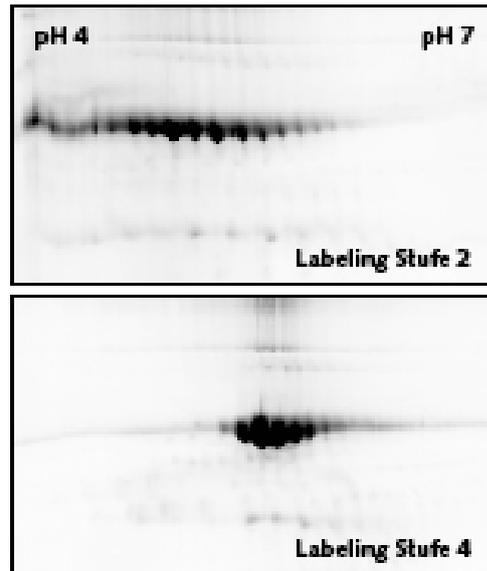


Abb. 1: Titrationsexperiment mit BSA. Bei unzureichenden TCEP-/S-Dye-Mengen (hier Labeling-Stufe 2) kommt es zu drastischen Verschiebungen im Spotmuster. Ein optimales Labeling wird bei Stufe 4 erreicht.

8 Post-elektrophoretische Anwendungen

Saturn-2D™ Gele können fixiert und gelagert werden, ohne das 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.

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.

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).

Tabelle 1: Ermittlung idealer Markierungsparameter

Labeling-Stufe	Protein zugeben		TCEP zugeben		S-Dye 200 zugeben		Stopp-Puffer* zugeben	Nr. 2D-Gel
1	5 µg	Mit Saturn-2D™ kompatibellem Probenpuffer (siehe 7.1) bis auf ein Volumen von 9 µl auffüllen.	0,5 µl	Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.	1,0 µl	Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.	10,5 µl	1
2	5 µg		1,0 µl		2,0 µl		12,0 µl	2
3	5 µg		1,5 µl	Inkubieren Sie für 1 h bei 35°C.	3,0 µl	Inkubieren Sie für 1 h bei 35°C.	13,5 µl	3
4	5 µg		2,0 µl		4,0 µl		15 µl	4

* siehe 7.4