

Produktinformation

Saturn-2D™ Labeling Kit

Product no. PR31, PR32, PR33

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™ Kit 4S	Saturn-2D™ Kit 8S	Saturn-2D™ Kit 8S Prep
Produkt-Nr.	PR31	PR32	PR33
S-Dye 200	1x 4S	2x 4S	2x 4S + 1x 40S
S-Dye 300	1x 4S	2x 4S	2x 4S
S-Dye Solvent	1x	1x	1x
TCEP	1x	1x	1x
ddH ₂ O	1x	1x	1x
S-Dye Low- retention Tubes & Tipps	1x	1x	1x

Die Kennzeichnung 4S und 8S der Labeling Kits entspricht der Anzahl von großen 2D-Gelen, die mit dem Kit angefertigt werden können.

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

5 Allgemeine Hinweise

S-Dye200 und S-Dye300 sind Maleimid-aktivierte Hochleistungs-Fluoreszenzfarbstoffe für die Proteinmarkierung (Labeling). Die S-Dyes binden an reduzierte Cysteine von Proteinen. Diese können dann elektrophoretisch oder chromatografisch 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 - je nach Ihren ermittelten Markierungsparametern - mit einem Saturn-2D™ 4S Kit mindestens 4x 5 µg Protein (Saturn-2D™ 8S Kit mind. 8x 5µg) mit S-Dye200 und mit S-Dye300 markiert werden.

6 Übersicht: Saturn-2D™ Labeling

1. Experimentelles Design
2. Lösen der Proteine in einem Saturn-2D™ kompatiblen Probenpuffer
3. Verwendung eines Internen Standards
4. Herstellung der TCEP-Reduktionslösung
5. Herstellung der S-Dye Working Solution
6. Vorversuch zur Ermittlung der idealen Markierungsparameter (Labeling-Stufe)
7. Markierung von Proteinproben für Saturn-2D™ Analysen
8. Fluoreszenz-Imaging

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

7 Detailliertes Protokoll für das Saturn-2D™ Labeling

7.1 Experimentelles Design

Für die Vergleiche von zwei Proben (z.B. Probe A gesund, Probe B krank) benötigen Sie zwei 2D Gele plus entsprechende Replikate. Tragen Sie dabei pro Gel jeweils eine Probe und einen 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. Ein Dye-Swap ist nicht erforderlich.

Beispiel:

Gel 1:

Probe A (5 µg Protein) markiert mit S-Dye300 +
IS (2,5 µg Probe A + 2,5 µg Probe B) markiert mit
S-Dye200

Gel 2:

Probe B (5 µg Protein) markiert mit S-Dye300 +
IS (2,5 µg Probe A + 2,5 µg Probe B) markiert mit
S-Dye200

7.2 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.

7.3 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 S-Dye200.

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 Proteinkonzentrationen aller im Experiment enthaltenen Proben her und stellen die Proteinkonzentration mit einem Saturn-2D™ kompatiblen Puffer (siehe 7.2) auf 0,55 µg/µl ein. Markieren Sie dieses Gemisch mit S-Dye200.

Beispiele:

n= 1; Proben A und B

Vereinen Sie 2,5 µg Protein der Probe A mit 2,5 µg Protein der Probe B, stellen Sie die Proteinkonzentration auf 0,55 µg/µl mit Probenpuffer ein und labeln Sie dieses Gemisch mit S-Dye200 entsprechend der ermittelten Labeling-Stufe.

n= 5; Proben A und B

Vereinen Sie 12,5 µg Protein der Probe A mit 12,5 µg Protein der Probe B, stellen Sie die Proteinkonzentration auf 0,55 µg/µl mit Probenpuffer ein und labeln Sie dieses Gemisch mit S-Dye200 entsprechend der ermittelten Labeling-Stufe. Verteilen Sie den gelabelten IS auf 5 Gele bzw. IPG-Streifen a 5 µg Protein.

7.4 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).

7.5 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 4 reactions (4S):

in 16 µl S-Dye Solvent je Reaktionsgefäß (PR31, PR32, PR33).

S-Dye 200 Prep for 40 reactions (40S):

in 160 µl S-Dye Solvent (PR33).
Je nach Cystein-Gehalt Ihrer Probe (siehe Vorversuch Punkt 7.6) können Sie damit 200 - 800 µg Protein markieren.

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

7.6 Vorversuch zur Ermittlung der idealen Markierungsparameter (Labeling-Stufe)

Da der Cystein-Gehalt verschiedener Proben stark variieren kann, muss für jeden Probentyp die optimale TCEP- und S-Dye-Menge ermittelt werden (Labeling-Stufe). Wir empfehlen dafür einen Vorversuch, für den Sie 20 µg Protein einer entsprechenden Proteinprobe sowie vier 2D-SDS-Gele (sowie optional ein 1D-SDS-Gel) benötigen.

Nutzen Sie zur Ermittlung optimaler Markierungsparameter Protein des gleichen Probentyps (gleicher Organismus, gleicher Zelltyp, usw.) oder Protein aus einem vereinigten Ansatz der zu analysierenden Proben. Stellen Sie die Proteinkonzentration Ihrer Probe auf 0,55 µg/µl mit Probenpuffer ein und teilen Sie die Probe gemäß Tabelle 1 (Seite 4) auf.

Vergleichen Sie die Spotmuster aller Vorversuchsgele. 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 finden Sie auf www.dyeagnostics.com/site/products/saturn-2d/ - Produktinformation Saturn-2D™ XS Titrations-Kit).

NEU

Nutzen Sie für diesen Vorversuch unseren neuen Saturn-2D™ XS Titrations-Kit (Produktnummer PR30).

7.7 Markierung von Proteinproben für Saturn-2D™ Analysen

Alle Arbeiten mit Proteinproben sollten auf Eis vorgenommen werden.

Markieren Sie nach Ermittlung der optimalen TCEP- und S-Dye-Mengen für Ihren jeweiligen Probentyp Ihre zu analysierende Probe. Folgen Sie dabei der folgenden Anleitung, die auch als Übersicht in Tabelle 2 (Seite 4) zusammengefasst ist.

- Stellen Sie Ihre Probe auf eine Proteinkonzentration von 0,55 µg/µl mit Saturn-2D™ kompatiblen Probenpuffer (siehe 7.2) ein.
- Geben Sie zu 9 µl (entsprechend 5 µg) Ihrer Proteinprobe die im Vorversuch (s. 7.6) ermittelte Menge an TCEP-Reduktionslösung.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Inkubieren Sie den Ansatz für 1 Stunde bei 35°C.

Hinweis: Wenn Sie mehr als 5 µg Protein markieren möchten, passen Sie den Markierungsansatz entsprechend an. Beachten Sie das ursprüngliche Verhältnis von Protein zu TCEP zu S-Dye.

- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Geben Sie die im Vorversuch (s. 7.6) ermittelte Menge an 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).

7.8 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™ 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 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.

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 7.2) 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 7.7

Tabelle 2: Übersicht zur Markierung von Proteinproben

Labeling-Stufe	Protein zugeben		TCEP zugeben		S-Dye 200 zugeben	S-Dye 300 zugeben		Stopp-Puffer* zugeben
1	5 µg	Mit Saturn-2D™ kompatibellem Probenpuffer (siehe 7.2) 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
	5 µg		0,5 µl		---	1,0 µl		10,5 µl
2	5 µg		1,0 µl	Inkubieren Sie für 1 h bei 35°C.	2,0 µl	---	Inkubieren Sie für 1 h bei 35°C.	12,0 µl
	5 µg		1,0 µl		---	2,0 µl		12,0 µl
3	5 µg		1,5 µl	---	3,0 µl	---	---	13,5 µl
	5 µg		1,5 µl		---	3,0 µl		13,5 µl
4	5 µg		2,0 µl	---	4 µl	---	---	15,0 µl
	5 µg		2,0 µl		---	4 µl		15,0 µl

* siehe 7.7