

Produktinformation

Refraction-2D™ Labeling Kit

Product no. PR08, PR08G, PR09

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 ® 2018
Rev. 01/2018 (1)

FOR RESEARCH USE ONLY

1 Produkte und Inhalt

	RF-2D Kit 4G	RF-2D Kit 8G	RF-2D Kit 12G
Produkt-Nr.	PR08	PR08G	PR09
G-Dye 100	1x 4G	2x 4G	1x 12G
G-Dye 200	1x 4G	2x 4G	1x 12G
G-Dye 300	1x 4G	2x 4G	1x 12G
G-Dye Solvent	1x	2x	1x
G-Dye Labeling Stop Solution	1x	2x	1x
G-Dye Low- retention Tubes* & Tipps	1x	1x	1x
Extra G-Dye 100	---	---	1x 3G

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

**Achtung: Verwenden Sie nur passende Rotor-Einsätze.*

2 Lagerung und Haltbarkeit

Lagern Sie die G-Dyes, G-Dye Solvent und G-Dye Labeling Stop Solution unter Lichtausschluss bei -20°C bis -80°C.

Mind. haltbar bis: Siehe Aufdruck Kitverpackung

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

Geprüfte Qualität und kontinuierliche Kontrolle

Um Ihnen eine gleichbleibende Qualität Ihrer Analysen zu sichern, unterliegen alle G-Dyes und die dazugehörigen Refraction-2D™ 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 überwacht.

3 Gefahrenhinweis

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

4 Sie benötigen zusätzlich:

- Refraction-2D™ kompatibler Probenpuffer (siehe 2.7)
- 2D-Gelelektrophorese-System (inkl. Zubehör und Materialien)
- opt.: Niedrig-fluoreszierende Glaskassetten oder VELUM GOLD Precast 2D Gels (PR237, PR241)
- Imaging-System zur Detektion blauer, grüner und roter Fluoreszenz
- Software zur Prozessierung und Auswertung der Daten (z.B. Delta-2D; erhältlich unter www.dyeagnostics.com)

5 Allgemeine Hinweise

Entwickelt für modernste 2D Gel-basierte Top Down Proteomics Analysen ermöglicht Ihnen Refraction-2D™ 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™-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 und G-Dye300 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.

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

6 Übersicht: Refraction-2D™ Labeling

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

7 Detailliertes Protokoll für das Refraction-2D™ Labeling

7.1 Experimentelles Design

Für die Vergleiche von zwei Proben (z.B. Probe A gesund, Probe B krank) benötigen Sie ein 2D Gel plus entsprechende Replikate. Tragen Sie dabei pro Gel jeweils zwei 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. Umfasst Ihr Experiment eine Anzahl von ≤ 12 Proben, ist es für eine statistisch verlässliche Analyse notwendig, technische Replikate mit einzubeziehen. 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™ Gel (Größe ca. 22 x 24 cm, 3 Proben, 150 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 +
 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 +
 IS (50 µg) markiert mit G-Dye100

7.2 Lösen der Proteine in einem Refraction-2D™ kompatiblen Probenpuffer

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 2 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.

Achtung: Für geringe Proteinkonzentrationen (< 2 µg/µl) sind Anpassungen des Labelingansatzes nötig. Kontaktieren Sie bitte unseren Service unter service@dyeagnostics.com.

Refraction-2D™ 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.

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 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™ kompatiblen Puffer (siehe Probenpuffer) auf 5 µg/µl ein. Markieren Sie dieses Gemisch mit G-Dye100.

Beispiele:

n = 1; Proben A und B
 Vereinen Sie 25 µg Protein der Probe A mit 25 µg Protein der Probe B, 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 und B

Vereinigen Sie 125 µg Protein der Probe A mit 125 µg Protein der Probe B, 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.

7.4 Herstellung der G-Dye Working Solution

Hinweis: Lösen Sie G-Dyes kurz vor der Verwendung. Lagern Sie gelöste G-Dyes kurzfristig (< 2h) auf Eis. Lagern Sie nicht verwendete G-Dye Working Solution 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 G-Dye Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße zu verwenden.

- Lassen Sie die G-Dye Reaktionsgefäße bis auf Raumtemperatur erwärmen (ca. 5 min).
- Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße kurz.
- Lösen Sie die G-Dyes in
 - 4,5 µl G-Dye Solvent für Refraction-2D™ 4G, 8G Kit (Produkt PR08, PR08G).
 - 12,5 µl G-Dye Solvent für Refraction-2D™ 12G Kit (Produkt PR09).
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz. Die G-Dye Working Solution ist nun für die weitere Verwendung bereit.

7.5 Markierung von Proteinproben für Refraction-2D™ Analysen

Alle Arbeiten mit Proteinproben sollten auf Eis vorgenommen werden.

- Transferieren Sie 50 µg Proteinprobe (optimal: ≤10 µl; max: 25 µl) in ein G-Dye Reaktionsgefäß.

Achtung: Für Proteinkonzentrationen unter 2 µg/µl sind Anpassungen des Labelingansatzes nötig. Kontaktieren Sie bitte unseren Service unter service@dyeagnostics.com.
- Geben Sie ggf. Probenpuffer zum Reaktionsansatz bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl hinzu.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz*.
- Geben Sie 1 µl G-Dye Working Solution hinzu. Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz*.

- Inkubieren Sie das Reaktionsgemisch für 30 Minuten auf Eis.
- Stoppen Sie die Markierungsreaktion durch Zugabe von 1 µl G-Dye Labeling Stop Solution.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz*. Inkubieren Sie das Reaktionsgemisch für 10 Minuten auf Eis.
- Die Proteinprobe kann nun für weitere Analysen verwendet werden (z.B IEF).
- Optional können Sie die Markierung mittels 1D-SDS-PAGE überprüfen (empfohlene Proteinmenge: 0,1 µg pro Spur).

**Achtung: Verwenden Sie nur passende Rotor-Einsätze.*

7.6 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).

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

8 Post-elektrophoretische Anwendungen

Refraction-2D™ Gele können fixiert und gelagert werden, ohne dass das Imaging beeinträchtigt wird. Gele können vor dem Imaging 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 mit G-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.

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