

## Produktinformation

# T-Rex Protein Labeling Kit

Product no. PR06

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. 02/2018 (1)

FOR RESEARCH USE ONLY

### 1 Produkte und Inhalt

- 20 Reaktionsgefäße mit T-Rex Fluorescent Dye für die Markierung von jeweils 50 µg Protein
- 4 Reaktionsgefäße mit T-Dye Solvent

### 2 Lagerung und Haltbarkeit

Lagern Sie die T-Rex und T-Dye Solvent unter Lichtausschluss bei -20°C bis -80°C.

Mind. haltbar bis: Siehe Aufdruck Kitverpackung

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

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

### 4 Sie benötigen zusätzlich:

- 2D-Gelelektrophorese-System (inkl. Zubehör und Materialien)
- opt.: Niedrig-fluoreszierende Glaskassetten oder VELUM GOLD Precast 2D Gels (PR237, PR241)
- Imaging-System zur Detektion roter Fluoreszenz
- Software zur Prozessierung und Auswertung der Daten (z.B. Delta-2D; erhältlich unter [www.dyeagnostics.com](http://www.dyeagnostics.com))

### 5 Allgemeine Hinweise

Die T-Rex Fluoreszenzfarbstoffe verfügen über einen NHS-Ester für eine kovalente Bindung an einen Lysinrest z.B. in Aminosäuren von Proteinen. Durch die hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften können T-Rex markierte Proteine bei Einsatz eines adäquaten Imaging-Systems bis zu 0,05 ng detektiert werden.

T-Rex ist kompatibel mit konventionellen Färbungen wie Silbernitrat oder Coomassie Brilliantblau und stellen keinerlei Einschränkung für die massenspektrometrische Analyse dar.

### 6 Detailliertes Protokoll für das T-Rex Labeling

#### 6.1 Probenvorbereitung

Lösen Sie Ihre Proteine in einem geeigneten Probenpuffer. Für eine genaue Quantifizierung der Fluoreszenzsignale (linearer Bereich des Fluoreszenzsignals und der eingesetzten Proteinmenge) sollte die Proteinkonzentration für das Protein-Labeling 1 - 5 µg/µl betragen. Ein Protein-Labeling ist allerdings bis zu einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 15 µg/µl möglich.

#### 6.1.1 Empfehlungen für Probenpuffer

Für ein effizientes Protein-Labeling ist ein pH-Wert > 8,0 und die Abwesenheit von primären Aminen zwingend erforderlich. Die Labeling-Kompatibilität folgender Substanzen wurde getestet:

Substanz	kompatibel
Tris	ja (≤ 100 mM)
HEPES	ja (≤ 100 mM)
Phosphat	ja (≤ 100 mM)
Harnstoff	ja (≤ 8 M)
Thioharnstoff	ja (≤ 2 M)
SDS	ja (≤ 5 %)
Triton X-100	ja (≤ 1 %)
CHAPS	ja (≤ 4 %)
DTT	ja (≤ 5 mM)
Mercaptoethanol	ja (≤ 1 %)
EDTA	ja (≤ 5 mM)

Substanz	kompatibel
NaCl	ja ( $\leq 150$ mM)
KCl	ja ( $\leq 50$ mM)
Glycerin	ja ( $\leq 15$ %)
Zucker	ja ( $\leq 12$ %)
Aminosäuren	nein
Bromphenolblau	nein
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich)	ja ( $\leq 1$ %)

Um die Kompatibilität von nicht getesteten Reagenzien oder Konzentrationen zu überprüfen, empfehlen wir 50 µg eines Standard-Proteins (z.B. BSA) in 30 mM Tris-HCl (pH 8,5) und der zu überprüfenden Substanz/Konzentration zu markieren. Trennen Sie 0,25 µg markiertes Protein mittels 1D SDS-PAGE und überprüfen Sie das Fluoreszenz-Signal. Als Positivkontrolle (Referenz) dient der gleicher Ansatz ohne zusätzliches Reagenz.

### 6.1.2 Empfehlungen für 1D SDS-PAGE oder andere Anwendungen

Sollte Ihre Analyse Reduktionsmittel erfordern, führen Sie den Reduktionsschritt nach dem T-Rex Labeling durch oder entfernen Sie das Reduktionsmittel vor dem Labeling durch Dialyse oder Gelfiltration. Geben Sie für die 1D SDS-PAGE den Bromphenolblau und /oder Reduktionsmittel enthaltenden Ladepuffer erst nach dem Labeling der Proteine hinzu.

### 6.1.3 Empfohlener Probenpuffer für 2D Gele

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.

## 6.2 Protein Labeling

- Lassen Sie das T-Rex Reaktionsgefäß bis auf Raumtemperatur erwärmen (ca. 5 min).
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz.
- Lösen Sie den Farbstoff in 2 µl T-Rex Solvent.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.

- Geben Sie 50 µg Protein (optimal: 10 µl) zu.
- Geben Sie ggf. noch Probenpuffer zum Reaktionsansatz bis zu einem Gesamtvolumen von 12 µl zu.
- Mischen (Vortex) und zentrifugieren Sie kurz.
- Inkubieren Sie das Reaktionsgemisch für 30 Minuten auf Eis.
- Die Proteinprobe ist nun mit T-Rex markiert und kann verwendet werden.

## 6.3 Detektion

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 ermitteln. Beachten Sie dabei, dass die Signalintensität der stärksten Proteinspots knapp unterhalb der Sättigung liegt (Sättigung: 65.535 Graustufen bei 16-Bit).

### T-Rex Anregungs- und Emissions-Eigenschaften

	max. Anregung [nm]	max. Emission [nm]
T-Rex	650	665

Nutzen Sie für T-Rex die empfohlenen Filtereinstellungen Ihres Imaging-Systems für z.B. G-Dye300, Cy5, Alexa 647.

## 7 Post-elektrophoretische Anwendungen

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 T-Rex 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.

T-Rex 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 T-Rex-Signal maskieren).