

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA Lightning Sci2
(Kat.-Nr. 43404)

SERVA Lightning Sci3
(Kat.-Nr. 43405)

SERVA Lightning Sci5
(Kat.-Nr. 43406)

SERVA Lightning SciDye Set
(Kat.-Nr. 43407)

Fluoreszenzfarbstoffe für Proteindetektion

SERVA
Electrophoresis

SERVA Electrophoresis GmbH - Carl-Benz-Str. 7 - 69115 Heidelberg
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
e-mail: info@serva.de - <http://www.serva.de>

Inhaltsübersicht

1. SERVA LIGHTNING SCIDYES	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lagerungsbedingungen	2
2. MARKIERUNG VON PROTEINEN	3
2.1. Fließschema zur Proteinmarkierung	3
2.2. Probenvorbereitung	3
2.3. Lösen der SERVA Lightning SciDyes	4
2.4. Minimalmarkierung der Lysine	4
2.4.1. Herstellen der SciDye-Stocklösung	4
2.4.2. Herstellen der SciDye-Arbeitslösung	5

1. SERVA Lightning SciDyes

1.1. Allgemeine Hinweise

Die Minimalmarkierung von Proteinen mit SciDyes von SERVA erlaubt die Detektion in Polyacrylamid-Gelen mit hoher Sensitivität, und ist besonders gut geeignet für Folien-gestützte HPE™ Gele nach zweidimensionalen Trennungen, z. B. 2D-Differenz-Gelelektrophorese (DIGE). Die Farbstoffe sind sowohl ladungs- als auch größen-angepasst. Identische Proteine zeigen daher unabhängig von der Markierung gleiches Lauf- bzw. Trennverhalten, wenn sie auf demselben Gel aufgetrennt werden. Somit wird eine hochauflösende und effiziente Detektion ermöglicht.

SERVA Lightning Sci2 ist kompatibel mit allen Detektionssystemen für Cy2®. SERVA Lightning Sci3 ist entsprechend kompatibel mit Cy3®- und SERVA Lightning Sci5 mit Cy5®-Detektionssystemen (Details hierzu siehe Tabelle).

Cy2®, Cy3®, Cy5®: Markenzeichen der *GE Healthcare Company*

Produkt	Eigenschaften	Menge	Kat.-Nr.
SERVA Lightning Sci2	Fluoreszenzfarbe: grün	5 nmol	43404.01
	Anregungsmaximum: 490 nm	10 nmol	43404.02
	Emissionsmaximum: 510 nm	25 nmol	43404.03
SERVA Lightning Sci3	Fluoreszenzfarbe: gelb	5 nmol	43405.01
	Anregungsmaximum: 555 nm	10 nmol	43405.02
	Emissionsmaximum: 570 nm	25 nmol	43405.03
SERVA Lightning Sci5	Fluoreszenzfarbe: rot	5 nmol	43406.01
	Anregungsmaximum: 645 nm	10 nmol	43406.02
	Emissionsmaximum: 660 nm	25 nmol	43406.03
SERVA Lightning SciDye Set	Enthält je Sci2, Sci3 und Sci5	5 nmol	43407.01
		10 nmol	43407.02
		25 nmol	43407.03

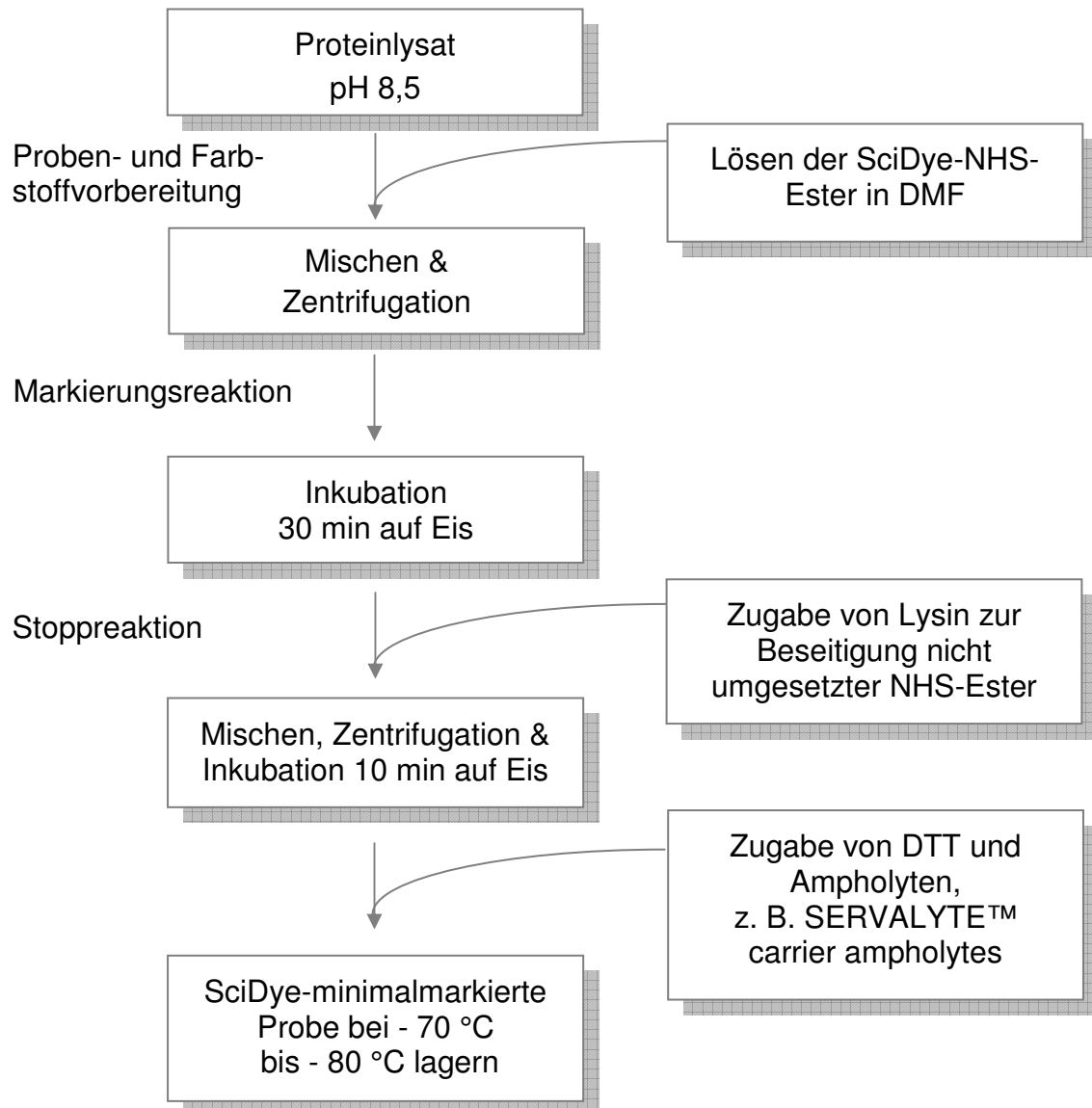
1.2. Lagerungsbedingungen

Die SERVA Lightning SciDyes sind bei der empfohlenen Lagertemperatur von -15 °C bis -25 °C mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. Markierung von Proteinen

SERVA Lightning SciDyes besitzen eine reaktive NHS-Ester-Gruppe für die kovalente Bindung an die ϵ -Aminogruppe von Lysinen innerhalb der Proteinprobe.

2.1. Fließschema zur Proteinmarkierung



2.2. Probenvorbereitung

Bitte beachten Sie, dass die Proteinproben immer auf Eis gehandhabt werden, um die Aktivität schädlicher Proteasen zu minimieren. Um das Anhaften von Proteinen an Glas zu vermeiden, empfiehlt sich die Verwendung von Reaktionsgefäßen aus Plastik.

Lysepuffer für DIGE:

- Lysepuffer 1: 9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 30 mM Tris
- Lysepuffer 2: 2 M Thioharnstoff, 7 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 30 mM Tris

Für pH-Wert-Einstellung: 50 mM NaOH

- Lösen der Probe entweder in Lysepuffer 1 oder in Lysepuffer 2.
- Überprüfen der Proteinkonzentration der Probe. Optimal ist eine Konzentration zwischen 5 und 10 mg/ml. Für die Markierungsreaktion ist ein Bereich von 1 – 20 mg/ml möglich.
- Überprüfen des pH-Wertes: 2 µl Probe auf eine pH-Indikatorpapier geben. Der pH-Wert sollte bei pH 8,5 liegen. Bei Bedarf wird der pH-Wert mit 50 mM NaOH entsprechend eingestellt.

2.3. Lösen der SERVA Lightning SciDyes

Benötigte Reagenzien: 99,8 % Dimethylformamid (DMF), wasserfrei

WICHTIG: Die Qualität des verwendeten DMF ist wichtig für eine erfolgreiche Markierungsreaktion. Das DMF muss unbedingt wasserfrei sein und bleiben.

Nach dem Öffnen des Gebindes bilden sich im DMF durch Abbaureaktionen i Amine, die anschließend mit der reaktiven NHS-Ester-Gruppe der SciDyes reagieren und somit die effektive Farbstoffkonzentration vermindern. Die Zugabe eines 4Å-Molekularsiebs zum DMF kann hier Abhilfe schaffen.

2.4. Minimalmarkierung der Lysine

2.4.1. Herstellen der SciDye-Stocklösung

(Endkonzentration: 1 nmol/µl)

Lösen der SciDye-Farbstoffe in DMF, wasserfrei, so dass die Farbstoff-Konzentration 1 nmol/µl beträgt (z. B. 25 nmol + 25 µl DMF).

Die Stocklösung des Lightning Sci2 zeigt eine tiefgelbe, die des Lightning Sci3 eine tiefrote und die des Lightning Sci5 zeigt eine tiefblaue Färbung.

- Ein kleines Volumen DMF aus dem Originalgebinde in ein Mikrozentrifugengefäß überführen.
- Den bei -20 °C gelagerten SciDye 5 min bei Raumtemperatur aufwärmen.
- Anschließend Zugabe der entsprechenden Menge DMF je Tube SciDye (1 nmol/µl = 10³ pmol/µl).
- Die SciDye-Tubes wieder verschließen und gründlich mischen (Vortex, 30 s).
- Danach 30 s Zentrifugation bei 12.000 xg. Der Farbstoff ist jetzt gebrauchsfertig.

Hinweis: Falls der gelöste SciDye nicht unmittelbar benutzt wird, sollte er bis zum Gebrauch wieder bei – 20 °C lichtgeschützt gelagert werden.

2.4.2. Herstellen der SciDye-Arbeitslösung

(Endkonzentration: 0,4 nmol/ μ l)

- Stocklösung zuvor sorgfältig zentrifugieren (siehe Abschnitt 2.4.1.).
- SciDye und DMF werden im Verhältnis 1: 2,5, z. B. 5 μ l SciDye + 7,5 μ l DMF gemischt.
- Zunächst das entsprechende Volumen DMF in ein frisches Mikrozentrifugengefäß vorlegen und dann Zugabe der SciDye-Stocklösung.

WICHTIG: Die SciDye-Arbeitslösung ist max. 2 Wochen bei - 20 °C stabil.

2.4.3. Markierungsreaktion

Zum Abstoppen der Reaktion: 10 mM Lysin (Lagerung bei -20 °C)

WICHTIG:

- Für eine effiziente Markierung sollte der pH-Wert der Probe 8,5 betragen.
- Die Markierung erfolgt bei 0 °C.
- Optimale Proteinkonzentration: 5 – 10 mg/ml
- Die Probe darf keine Trägerampholyte und Reduktionsmittel, z. B. DTT, 2-Mercaptoethanol, enthalten.

2.4.3.1. Interner Standard: Erstellung und Lightning Sci2-Markierung

Hierzu werden von jeder Probe gleich große Aliquots genommen und gemischt. Als interner Standard werden je Gel min. 50 μ g Protein benötigt.

- Entsprechendes Volumen des internen Standards ($n \times 50 \mu\text{g}$; n: Anzahl der Gele) in ein Mikrozentrifugationsgefäß pipettieren.
- Zugabe von n μ l Sci2-Arbeitslösung zu dem internen Standard.

Beispiel für 6 Gele (n=6):

- Proteinmenge des internen Standards: $6 \times 50 \mu\text{g} = 300 \mu\text{g}$
- Volumen Sci2-Arbeitslösung: 6 μ l entspricht $6 \times 0,4 \text{ nmol} = 2,4 \text{ nmol}$

\Rightarrow 300 μ g Protein werden mit 2,4 nmol (= 2400 pmol) Sci2 markiert.

- Mischen und zentrifugieren (12.000 xg, 30 s).
- 30 min Inkubation auf Eis (lichtgeschützt!).
- Zugabe von n μ l 10 mM Lysin, gut mischen und zentrifugieren (12.000 xg, 30 s).
- 10 min Inkubation auf Eis (lichtgeschützt!).

Die markierten Standards können bei – 70 °C bis – 80 °C lichtgeschützt mind. 3 Monate gelagert werden.

2.4.3.2. Probemarkierung mit Lightning Sci3 und Sci5

- Entsprechendes Volumen der Probe (50 µg) in ein Mikrozentrifugationsgefäß pipettieren.
- Zugabe von 1 µl SciDye-Arbeitslösung.

Beispiel:

- Proteinmenge: 50 µg
- Volumen SciDye-Arbeitslösung: 1 µl entspricht 0,4 nmol

⇒ 50 µg Protein werden mit 0,4 nmol (= 400 pmol) SciDye markiert.

- Mischen und zentrifugieren (12.000 xg, 30 s).
- 30 min Inkubation auf Eis (lichtgeschützt!).
- Zugabe von n µl 10 mM Lysin, gut mischen und zentrifugieren (12.000 xg, 30 s).

Die markierten Proben können bei – 70 °C bis – 80 °C lichtgeschützt mind. 3 Monate gelagert werden.