

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA Purple

Proteinfärbung für Polyacrylamidgele und Blotmembranen

(Kat.-Nr. 43386)



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 PURPLE PROTEINFÄRBUNG	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lagerung	2
1.3. Färbung	2
1.4. Detektion	3
2. EIGENSCHAFTEN	3
3. FÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN	4
3.1. Wichtige Hinweise zum Arbeiten mit SERVA Purple	4
3.2. Lösungen und Puffer	5
3.3. Färbeprotokoll	5
3.3.1. Fixierung	5
3.3.2. Färbung	6
3.3.3. Waschen	6
3.3.4. Ansäuern	6
3.4. Lagerung	8
4. FÄRBUNG FÜR BLOTMEMBRANEN	9
4.1. Puffer und Lösungen	9
4.2. Färbeprotokoll	9
4.2.1. PVDF-Membran	9
4.2.2. Nitrozellulose	10
4.3. Lagerung	10
4.4. Entfärben	10
5. SCANNEN VON 2DGEL FLATBED NF FERTIGGELEN	11
6. PROBLEMBEHANDLUNG	12
7. BESTELLINFORMATIONEN	13

1. SERVA Purple Proteinfärbung

1.1. Allgemeine Hinweise

SERVA Purple ist ein neuer synthetischer Fluoreszenzfarbstoff. Er ist eine Weiterentwicklung des natürlich vorkommenden, fluoreszierenden Epicocconone^[1], das an basische Aminosäuren (Lysin, Arginin und Histidin) in Proteinen und Peptiden bindet^[2], wobei man ein intensives rot-fluoreszierendes Signal erhält. Dieser einzigartige Mechanismus ermöglicht eine empfindliche und quantitative Detektion von Proteinen sowohl in 1D und 2D Gelen mit unterschiedlichen Puffersystemen, als auch auf PVDF und Nitrozellulose Blotmembranen^[3, 4, 5]. Desweiteren ist dieser Farbstoff kompatibel mit der Massenspektrometrie^[6].

[1] Bell, P.J.L. and Karuso, P. (2003) Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. Journal of the American Chemical Society. **125**, 9304.

[2] Coghlan, D. R., Mackintosh, J. & Karuso, P. (2005). Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with Epicocconone. Organic Letters. **7**, 2401-240.

[3] Malmport, E., Mackintosh, J., Ji, H., Veal, D. & Karuso, P. (2005). Visualization of proteins electro-transferred on Hybond ECL and Hybond-P using Deep Purple Total Protein Stain. GE-Healthcare Life Science News. **19**, 12-13.

[4] Mackintosh, J.A., Choi, H.-Y., Bae, S.-H., Veal, D.A., Bell, P.J., Ferrari, B.C., van Dyk, D., Verrills, N.M., Paik, Y.-K. & Karuso, P. (2003). A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in 1-D and 2-D gel electrophoresis. Proteomics. **3**, 2273-2288.

[5] Moritz C.P. et al. (2014) Proteomics, **14** (2-3), 162 – 168.

[6] Tannu, N.S. Sanchez Brambila, G.S., Kirby, P., Andacht, T.M. (2006) Effect of staining reagent on peptide mass fingerprinting from in-gel trypsin digestions: A comparison of Sypro Ruby and Deep Purple. Electrophoresis **27**, 3136 - 3143.

SERVA Purple kann nur für Anwendungen in der Forschung benutzt werden.

1.2. Lagerung

Lagern Sie den Farbstoff sofort nach der Lieferung in den originalen braunen Flaschen tiefgekühlt bei -15 °C bis -30 °C.

1.3. Färbung

Keine Metallschalen verwenden! Aber Sie können sowohl transparente als auch dunkle Plastikschalen verwenden.

1.4. Detektion

Anregungswellenlängen (Excitation): 405, 500 nm.

Es können auch folgende Lichtquellen verwendet werden: grün (543, 532 nm); blau (488 nm); violett (405 nm).

Emissionswellenlänge (Emission): Die maximale Emission ist bei 610 nm, unabhängig von der Anregungswellenlänge. Geeignet sind hier 610 nm-Bandpassfilter oder 560 nm-Breitpassfilter.

2. Eigenschaften

- **Flexibel:** **SERVA Purple** Proteinfärbung kann für Proteine nach 1D oder 2D Elektrophoresen in nativen oder denaturierenden Gelen mit allen möglichen Puffern verwendet werden. **SERVA Purple** ist auch verwendbar für PVDF und Nitrozellulose Blotmembranen.
- **Kompatibel:** Die einzigartige reversible Färbung mit **SERVA Purple** ermöglicht die volle Kompatibilität mit nachfolgenden Analysen, z.B. MS, Immundetektion, und Edman Sequenzierung. **SERVA Purple** zeigt bessere Kompatibilität mit Massenspektrometrie als andere Färbemethoden [5].
- **Gesundheits – und Sicherheitsaspekte:** Keine speziellen Entsorgungsmaßnahmen, wie für die Aufbewahrung und Handhabung von flüchtigen, korrosiven, Schwermetall-enthaltenden und toxischen Färbungen nötig.
- **Einfach und bequem:** Die Protokolle sind einfach (4 Schritte) und schnell (3 Stunden).
- **Empfindlich:** Die Empfindlichkeit liegt bei ≥ 50 pg Protein im Gel (getestet mit 14 Standardproteinen über einen weiten Molekulargewichtsbereich).
- **Multiplex kompatibel:** Zusammen mit anderen Fluorophoren (z.B. Cy™ Dyes), und anderen Farbstoffen (z.B. Coomassie®, ProQ® Diamond) verwendbar.
- **Klarer Hintergrund, keine Sprenkel:** **SERVA Purple** produziert keine Sprenkel im Hintergrund und hat sehr niedrige Hintergrundfluoreszenz.
- **Stabilere Gele:** Die Färbung mit **SERVA Purple** benötigt keine hohen Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln, welche häufig zu Brüchigkeit von Gelen führen.

ProQ® Diamond: Trademark der Invitrogen Life Technologies Corp.

Cy™: Trademark von GE Healthcare

Coomassie®: ICI Ltd.

3. Färbung von Polyacrylamidgelen

Grundsätzlich sind alle Chemikalien als möglicherweise gefährlich zu betrachten. Dieses Produkt sollte nur von Personen angewendet werden, welche eine Laborausbildung haben, nach den Richtlinien für "gute Laborpraxis" (GLP). Es ist angemessene Schutzkleidung und Ausrüstung zu verwenden: Labormantel, Sicherheitsbrille, Laborhandschuhe.

SERVA Purple ist eine Verdünnung eines synthetischen Farbstoffes in DMSO / Acetonitril. Die verdünnte Arbeitslösung ist nur minimal gefährlich und nicht entzündlich; allerdings sind nicht alle möglichen Eigenschaften der Farbstoffkomponente komplett untersucht worden.

3.1. Wichtige Hinweise zum Arbeiten mit SERVA Purple

- Bitte befolgen Sie das Protokoll genau.
- **SERVA Purple** ist bei hohen pH-Werten und hellem Licht instabil und zerfällt mit der Zeit.
- Für optimale Färberesultate sind basische Bedingungen unerlässlich. So kann bereits benutzte Färbelösung gesammelt und zum „Vorpuffern“ weiterer Gele verwendet werden. Alternativ kann hierfür auch Lösung 2 eingesetzt. Vorpuffern erhöht die Färbefizienz und sollte zwischen den Fixierungs- und dem Färbeschritt erfolgen.
- **Die empfohlene Färbezeit sollte nicht überschritten werden (nach mehr als 3 h Färbezeit lässt die Empfindlichkeit stark nach).**
- Bitte stellen Sie unbedingt sicher, dass das Farbstoffkonzentrat vollständig aufgetaut, durchmischt und auf Raumtemperatur angewärmt ist, bevor die Färbelösung hergestellt wird.
- Aufgrund der sehr hohen Sensitivität von **SERVA Purple**, sollten Staub oder andere Partikel in den verwendeten Lösungen sowie Reste von Detergenzien vermieden werden. Verwenden Sie bitte sehr reine Chemikalien und Reagenzien (mind. analytical grade). Sollten dennoch unspezifische Punktmuster im Gel erscheinen, ist das Filtrieren der verwendeten Puffer und Lösungen unerlässlich.
- Plastikfärbeschalen, die zuvor für SYPRO® Produkte, Coomassie® oder andere Farbstoffe verwendet wurden, können auch zu fleckigen Gelen führen. Aus diesem Grund sollten die Färbeschalen nur für **SERVA Purple** verwendet oder zuvor gründlich mit Spülmittel, Wasser und Methanol gereinigt werden.

SYPRO® ist ein Warenzeichen von Invitrogen Life Technologies Corp.

3.2. Lösungen und Puffer

Lösungen 1 (Fixieren und Ansäuern): Vorlegen von 850 ml dest. Wasser, Zugabe von 10 g Zitronensäure (SERVA Kat.-Nr. 38640), gut mischen und vollständig lösen. Zugabe von 150 ml Ethanol (100 %) und erneut gut mischen.

Vorsicht: Hierbei kommt es zu Volumenkontraktion, so dass das Endvolumen etwas weniger als 1 L beträgt.

Lösungen 2 (Färbepuffer): 4,2 g Natriumbicarbonat (SERVA Kat.-Nr. 30180) in 1 L dest. Wasser lösen. Vorsichtige Zugabe von 3,85 g Natriumhydroxid (NaOH, p.a. Qualität) und anschließend gut durchmischen bis alles gelöst ist.

Lösungen 3 (Waschlösung): 850 ml dest. Wasser werden mit 150 ml Ethanol (100 %) gemischt.

Vorsicht: Hierbei kommt es zu Volumenkontraktion, so dass das Endvolumen etwas weniger als 1 L beträgt.

Lagerung der Lösungen: Die Lösungen 1-3 können bei Raumtemperatur gelagert werden. Sie sind dann für ca. 6 Monate stabil. Um fleckige Gele zu vermeiden, sollten alle Lösungen frei von Niederschlägen oder anderen Partikeln sein.

3.3. Färbeprotokoll

3.3.1. Fixierung

- Gele für mind. 1 h in **Lösung 1** unter leichtem Schütteln inkubieren.
- Gele, die dicker als 1 mm sind sollten 1,5 h inkubiert werden.

Falls notwendig kann der Fixierungsschritt auch verlängert und über Nacht durchgeführt werden. Dies führt auch zu einer Verminderung des Hintergrunds. Zusätzliche Inkubationen in der Fixierlösung sind in der Regel nicht notwendig, vermindern aber auch die Hintergrundfärbung.

- Parallel kann hier bereits das **SERVA Purple** Konzentrat aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht werden.

Das benötigte Volumen entnehmen Sie bitte Tabelle 1.

3.3.2. Färbung

- Färbelösung immer direkt vor dem Färbeschritt herstellen.
- Vollständig aufgetautes **SERVA Purple** Konzentrat gut mischen.
- Anschließend **1 Volumenteil SERVA Purple mit 250 Volumenteilen Lösung 2** versetzen und gut mischen.
- Gele aus der Fixierlösung in die Färbelösung überführen unter leichtem Schütteln 1 h (1 mm dicke Gele) bzw. 1,5 h (1,5 mm dicke Gele bzw. 1 mm-Gele auf Folie) inkubieren.

WICHTIG: Minimieren Sie hier den Übertrag von Fixierlösung in die Färbelösung. Eine kurzes „Vorpuffern“ des Gels kann die Effektivität des Färbens verbessern.

- Färbung kann auf 2 h verlängert werden, sollte diese aber nicht überschreiten.

Das benötigte Volumen entnehmen Sie bitte Tabelle 1.

3.3.3. Waschen

- Gele aus der Färbelösung in die Waschlösung **Lösung 3** überführen.
Inkubation: 30 min
- Bei 1,5 mm dicken Gelen oder starkem Hintergrund sollte die Inkubation auf 45 min verlängert werden.

Das benötigte Volumen entnehmen Sie bitte Tabelle 1.

3.3.4. Ansäuern

- Gele aus der Waschlösung in **Lösung 1** zum Ansäuern überführen und unter leichtem Schütteln 30 min inkubieren.

Dieser Schritt kann wiederholt oder über Nacht durchgeführt werden, um den Gelhintergrund zu reduzieren. Bei der Inkubation über Nacht sollte das Gel lichtgeschützt sein. Das benötigte Volumen entnehmen Sie bitte Tabelle 1.

Tabelle 1: Benötigte Lösungsvolumina für die **SERVA Purple** -Färbung unterschiedlicher Polyacrylamidgele

Gel Typ		<i>MiniGel</i>	<i>Standard Flachbett-Gel</i>	<i>Großes Flachbett-Gel</i>	<i>großes Gel (1 mm dick)</i>	
Schritt	Lösung	Volumen/Gel				Zeit *
Fixierung	Lösung 1	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	1 h
Färbung	Lösung 2	0,4 ml Farbstoff in 100 ml	0,8 ml Farbstoff in 200 ml	1,0 ml Farbstoff in 250 ml	1,6 ml Farbstoff in 400 ml	1 h
Waschen	Lösung 3	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	30 min
Ansäuern	Lösung 1	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	30 min

* Für 1,5 mm oder 1 mm dicke Folien-gestützte Gele sollte die Zeit um 50 % verlängert werden.

WICHTIG:

- Gele können ohne Probleme in der Lösung 1 über Nacht fixiert werden.
- Bevor die Färbelösung angesetzt wird, sollte das Farbstoffkonzentrat zunächst Raumtemperatur erreichen und dann sorgfältig gemischt werden.
- Die Färbelösung muss frisch hergestellt werden (nicht früher als 30 min vor dem unmittelbaren Gebrauch).
- Um Färbeartefakte zu vermeiden, sollte das Farbstoffkonzentrat zur Lösung 2 zugesetzt und erst dann zum Gel gegeben werden.
- Es ist **nicht notwendig** das Gel lichtgeschützt zu inkubieren.
- Die Färbezeit sollte 3 h nicht überschreiten, da nach dieser Zeit die Signalintensität abnimmt.
- Das Gel kann auch über Nacht in der Lösung 1 des Ansäuerungsschrittes verbleiben, wenn im Anschluss an die Färbung nicht sofort gescannt werden kann.

3.4. Lagerung

Das Gel sollte bei +4 °C lichtgeschützt in 1 % (w/v) Zitronensäure (Lagerungslösung) gelagert werden. Für längere Lagerung (bis zu 6 Monate) sollte **SERVA Purple** (1:250) zur Lagerungslösung zugegeben werden. Vor der Dokumentation sollte das Gel dann 2x 15 min in der Waschlösung (Lösung 3) gespült werden. Zur Verminderung des Hintergrunds kann nochmals 15 min mit Lösung 1 inkubiert werden.

4. Färbung für Blotmembranen

Für optimale Ergebnisse sollte die Lauffront während der Elektrophorese aus dem Gel gelaufen sein. Desweiteren sollte die Blotmembran während des Färbens nicht austrocknen.

4.1. Puffer und Lösungen

Hier werden die gleichen Puffer und Lösungen wie zur Gelfärbung verwendet.

4.2. Färbeprotokoll

Bitte beachten Sie, dass die Membran während des Färbens nicht trocknet.

Waschen: Nach dem Transfer wird die feuchte Membran 3x 5 min in dest. Wasser gewaschen. Für kleine Blots sind 50 ml pro Waschschrift und für große Blots 200 ml ausreichend.

Alkalisieren: 10 min Waschen der Membran in **Lösung 2**.

Färbung: Für die Färbung wird eine 1:200-Verdünnung des **SERVA Purple** Konzentrats in hochreinem Wasser verwendet. Für kleine Blots ist ein Volumen von 50 ml und für große Blots von 200 ml ausreichend.

Die Färbedauer beträgt 15-30 min. Die Blotmembran sollte hierbei mit der „Proteinseite“ nach unten in die Färbelösung gelegt werden.

Anschließend folgen Sie dem Protokoll für PVDF- oder Nitrozellulose-Membranen.

4.2.1. PVDF-Membran

Ansäuern: Membran in **Lösung 1** zum Ansäuern überführen und unter leichtem Schütteln 5 min inkubieren. (400 ml: große Blots; 50 ml: kleine Blots).

Bitte beachten Sie, dass es hier zu einer Grünfärbung der Membran kommt.

Waschen: Den Blot für 2-3 min in 100 % Methanol waschen bis der grüne Hintergrund vollständig verschwunden ist. Mehrmaliges Waschen ist eventuell notwendig.

Trocknen: Mind. 2-3 min sollte der Blot trocknen. Um ein gleichmäßiges Trocknen von beiden Seiten zu gewährleisten, empfiehlt es sich, den Blot auf einem Drahtgitter zu legen. Wenn die Membran komplett getrocknet ist, kann der Blot weiterprozessiert, z.B. dokumentiert werden.

4.2.2. Nitrozellulose

Waschen: Membran in **Lösung 2** überführen und unter leichtem Schütteln 5 min inkubieren, anschließend in hochreines Wasser überführen und weitere 5 min inkubieren. Diesen Schritt wiederholen.

Trocknen: Der Blot sollte komplett getrocknet werden. Anschließend kann die Membran weiterprozessiert, z.B. dokumentiert werden.

4.3. Lagerung

PVDF- und Nitrozellulose-Membranen sollten getrocknet und dunkel bei Raumtemperatur gelagert werden.

4.4. Entfärben

Die Färbung mit **SERVA Purple** ist reversibel, so dass für nachfolgende Analysen, wie Immunoblotting, der Farbstoff entfernt werden kann.

Bei der Entfärbung mit 50 mM Ammoniumcarbonat über Nacht, erfolgt die Entfärbung ohne nachweisbaren Proteinverlust.

Schnelles Entfärben von PVDF-Membranen: 15 min Inkubation in 50 % Acetonitril/ 30 mM Ammoniumcarbonat.

Schnelles Entfärben von Nitrozellulose-Membranen: 15 min Inkubation in 50 % Ethanol/50 mM Ammoniumcarbonat.

Achtung: Bei beiden Protokollen für schnelles Entfärben kommt es zu Proteinverlust auf der Membran.

5. Scannen von 2DGel flatbed NF Fertiggele

Nachdem die Scannerplatte mit etwas Wasser angefeuchtet wurde, werden die Gele mit der Oberseite nach unten aufgelegt (focal panel 0). Während des Scannens wird eine LF Glasplatte oder ein Scan Frame (SERVA Kat.-Nr. HPE-A22) auf das Gel gelegt, so dass die Gelkanten sich nicht einrollen.

Hier nicht „Press Sample“ verwenden!

Für exaktes Spotpicken sollte die Orientierungsvorgabe des Scanners wie folgt gedreht werden:



6. Problembehandlung

Geringe Signalintensität und schlechte Sensitivität

- Meistens liegt die Ursache für geringe Signalintensität in unzureichender Alkalisierung. Der pH-Wert während der Färbung sollte 9,5 – 10,5 betragen. Grund hierfür ist meist das Verschleppen von Säure aus dem Fixierungsschritt zur Färbung.

Sind die Bedingungen zu sauer, wird die Färbelösung gelb!

Hilfreich ist hier ein kurzes "Vorpuffern" mit Lösung 2 oder bereits benutzter Färbelösung vor dem eigentlichen Färbeschritt.

- Stellen Sie sicher, dass Sie das empfohlene Lösungsvolumen verwenden, da geringere Volumina die Färbeeffizienz reduzieren können.
- Stellen Sie sicher, dass Sie die angegebene Farbstoffverdünnung (1:250) verwenden. Höhere Verdünnungen ergeben geringere Fluoreszenzintensitäten.
- Lange Expositionszeiten sowie damit verbundene Wärmeentwicklung von CCD-basierten Dokumentationssystemen führen zum Bleichen des Farbstoffs.
- Stellen Sie sicher, dass die richtigen Geräteparameter für Filter, Multiplier und Lichtquelle beim Scannen verwendet werden.
- Stellen Sie sicher, dass das **SERVA Purple** Konzentrat zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und erst dann die Färbelösung angesetzt wird.
- Für die Fixierung sollte unbedingt die beschriebene Lösung verwendet werden.

Hoher Hintergrund

- Die Färbeschale darf zuvor nicht für Coomassie-Färbungen verwendet worden sein.
- Stellen Sie sicher, dass die Färbelösung gut durchmischt ist bevor sie zum Gel gegeben wird.
- Stellen Sie sicher, dass während des gesamten Färbens die empfohlenen Lösungsvolumina verwendet werden.
- Pro Färbeschale sollte nur ein Gel gefärbt werden. Ansonsten entsteht eine ungleichmäßige Hintergrundfärbung.
- Die Gele sollten nur mit sauberen Handschuhen angefasst werden, so dass keine Kontamination durch Protein oder Staub erfolgt.
- Dickere oder foliengestützte Gele benötigen oft längere Fixierungs- und Waschzeiten sowie einen verlängerten Ansäuerungsschritt.
- Stellen Sie sicher, dass das **SERVA Purple** Konzentrat zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und erst dann die Färbelösung angesetzt wird.

Randbildung oder Negativfärbung

- Für die Gelherstellung und die Elektrophorese sollten geeignetes SDS verwendet werden.
- Der Fixierungsschritt sollte über Nacht erfolgen.

- Es sollten die empfohlenen Volumina für Fixierungs- und Waschlösung eingesetzt werden.
- Die Waschdauer sollte verlängert werden.

7. Bestellinformationen

Produkt	Menge	Kat.-Nr.
Reagenzien/Chemikalien		
SERVA Purple	25 ml	43386.01
	4 x 25 ml	43386.02
Citric acid·H ₂ O analytical grade	500 g	38640.01
	1 kg	38640.02
	5 kg	38640.03
NaHCO ₃		
	1 kg	30180.02
Zubehör fürs Scannen		
ScanFrame	1 St.	HPE-A22