

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA ProteinStain Fluo-Y Sensitive Fluoreszenz-Proteinfärbung für Polyacrylamidgele

(Kat.-Nr. 35092)



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

Inhaltsübersicht

1. SERVA PROTEINSTAIN FLUO-Y	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Zusätzlich benötigte Materialien	2
1.3. Lagerungsbedingungen	3
2. FÄRBEPROTOKOLL	3
2.1. Benötigte Lösungen	3
2.1.1. Fixierungslösung	3
2.1.2. Färbelösung	3
2.2. Färbung und Detektion	4
3. KOMPATIBILITÄT DES SERVA PROTEINSTAIN FLUO-Y MIT NACHFOLGENDE ANALYSEN	5
4. BESTELLINFORMATIONEN	5
5. FEHLERBEHEBUNG	6

1. SERVA ProteinStain Fluo-Y

1.1. Allgemeine Hinweise

SERVA ProteinStain Fluo-Y erlaubt die schnelle und sensitive Fluoreszenzfärbung von Proteinen zur Detektion und Quantifizierung im Anschluss an 1D- oder 2D-SDS-PAGE. Die 100x Stammlösung kann einfach mit Wasser zu einer 1x Färbelösung verdünnt werden (10 ml Stammlösung ergeben 1 L Färbelösung). Gefärbte Gele können mit verschiedenen UV-basierten Fluoreszenz-Imaging-System analysiert und dokumentiert werden, sofern das System im Bereich von 330 nm/390 nm anregen und bei 570 nm detektieren kann (siehe Abb. 1). Alternativ können auch die Detektionsparameter für Ethidiumbromid oder SYPRO Ruby verwendet werden. Der Farbstoff besitzt im ungebundenen Zustand nur eine sehr schwache Fluoreszenz, an Proteine gebunden erfolgt eine starke Fluoreszenzzunahme. Für nachfolgende Analysen, z. B. enzymatischer Proteinabbau oder Massenspektrometrie, kann der gebundene Farbstoff leicht durch Waschen des Gels in Wasser entfernt werden. Gefärbte Gele können in der Färbelösung bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden.

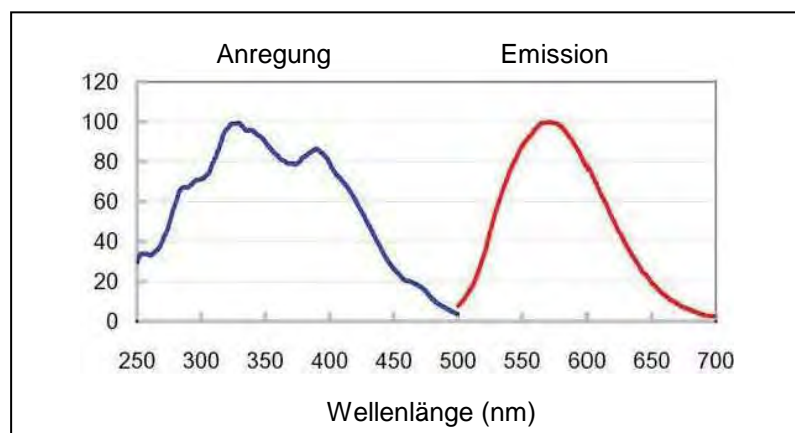


Abb. 1: Anregungs- und Emissionsspektrum des **SERVA ProteinStain Fluo-Y** Farbstoffs

1.2. Zusätzlich benötigte Materialien

- Färbeschalen: Zum Färben werden Glasschalen empfohlen.
- Imaging System: Optimal zur Dokumentation und Analyse der Gele ist ein Imaging System, das die Fluoreszenz-Anregung bei 330 / 390 nm und Detektion bei 570 nm erlaubt (auch die Detektionsparameter für Ethidiumbromid oder SYPRO Ruby möglich).
- Laborschüttler zur Inkubation während des Färbens
- Essigsäure (SERVA Kat.-Nr. 45633)
- Ethanol (SERVA Kat.-Nr. 11093)
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser

1.3. Lagerungsbedingungen

Das Produkt ist bei der empfohlenen Lagertemperatur von +2 °C bis +8 °C mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

Bitte beachten Sie, dass der Farbstoff lichtgeschützt gelagert wird. Außerdem sollte die Einwirkung von Temperaturen über 37 °C vermieden werden.

2. Färbeprotokoll

2.1. Benötigte Lösungen

Zur Herstellung der benötigten Lösungen sollte filtriertes deionisiertes oder destilliertes Wasser verwendet werden.

2.1.1. Fixierungslösung

Die Fixierungslösung besteht aus 40 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure. Methanol wird aufgrund der Sicherheitsaspekte und Ergebnisse bei der Färbung nicht empfohlen.

Je nach Größe des Gels werden folgende Volumina Fixierungslösung benötigt:

Gelgröße	Volumen Fixierungslösung
9 cm x 7 cm (Minigelformat)	100 ml
13 cm x 9 cm	200 ml
16 cm x 16 cm	500 ml
26 cm x 23 cm	1 L

Das verwendete Volumen der Fixierungslösung sollte generell ca. das 10 – 15-fache des Gelvolumens betragen.

2.1.2. Färbelösung

Achtung:
Die Färbelösung sollte stets frisch, unmittelbar vor der Anwendung hergestellt werden.

Die 100x Stammlösung des Farbstoffes wird mit Wasser im Verhältnis 1:100 (1 Volumenteil Stammlösung + 99 Volumenteile dH₂O) verdünnt.

Je nach Größe des Gels werden folgende Volumina Färbelösung benötigt:

Gelgröße	Volumen Färbelösung
9 cm x 7 cm (Minigelformat)	60 ml
13 cm x 9 cm	120 ml
16 cm x 16 cm	300 ml
26 cm x 23 cm	600 ml

Das verwendete Volumen der Färbelösung sollte generell das 10-fache des Gelvolumens betragen.

2.2. Färbung und Detektion

Fixierung Gel in eine saubere Färbeschale mit Fixierungslösung überführen, abdecken und unter leichtem Schütteln fixieren.

Standard

60 min bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Schütteln inkubieren

Schnell

Gel + Fixierungslösung in Mikrowelle zum Kochen erhitzen (je nach Mikrowellenleistung, ca. 1,5 min bei 100 ml), anschließend 15 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubieren

Bitte beachten: Sowohl kürzere als auch längere Fixierung führt zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Färbung Fixierungslösung vorsichtig abgießen und Zugabe der Färbelösung. Bei den nachfolgenden Schritten sollte möglichst lichtgeschützt gearbeitet werden.

Standard

mind. 45 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubieren

Schnell

15 - 45 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubieren (30 min sind für die meisten Applikationen ausreichend)

Entfärbung Ein spezieller Entfärbeschritt ist nicht notwendig. Um überschüssige Farbelösung von der Geloberfläche zu beseitigen, wird das Gel kurz (1 – 5 min) mit Wasser gespült.

Wichtig: Zu langes Waschen kann das Fluoreszenzsignal der gefärbten Proteine erheblich mindern.

Detektion Anregung: optimal 330 nm / 390 nm
 Detektion: optimal 570 nm
 Alternativ können auch die Detektionsparameter für Ethidiumbromid oder SYPRO Ruby verwendet werden.

Die Lagerung gefärbter Gele in der Färbelösung ist bei +2 °C - +8 °C möglich.
 Die Langzeitlagerung sollte in verschließbaren Plastikbeuteln mit 5 – 10 ml Färbelösung bei +2 °C - +8 °C lichtgeschützt erfolgen.
 Hierbei bleibt die Färbeintensität erhalten, ggf. wird diese sogar intensiver.

3. Kompatibilität des SERVA ProteinStain Fluo-Y mit nachfolgende Analysen

Gebundener **SERVA ProteinStain Fluo-Y** kann durch Inkubation des Gels über mehrere Stunden in Wasser oder PBS (*phosphate buffered saline*) beseitigt werden. Um unerwünschte Wechselwirkungen und Störungen bei nachfolgenden Experimenten, z. B. enzymatischer Proteinabbau oder Massenspektrometrie, zu vermeiden, sollte der Farbstoff gründlich ausgewaschen sein.

4. Bestellinformationen

Produkt	Menge	Kat.-Nr.
Ethanol undenatured absolute analytical grade	250 ml	11093.01
	1 L	11093.02
	2,5 L	11093.03
Acetic acid 100 % analytical grade	1 L	45633.01
	2,5 L	45633.02

5. Fehlerbehebung

Problem	Mögliche Ursache	Abhilfe
Schlechte Sensitivität der Färbung	Gel wurde zu lange oder zu kurz fixiert	Entsprechend den Empfehlungen fixieren
	Gel wurde zu lange entfärbt oder gewaschen	Nicht länger als 5 min entfärben oder wässern. Zur Langzeitlagerung das Gel in der Färbelösung bei +2 °C - +8 °C lichtgeschützt lagern.
	Färbezeit zu kurz	Maximale Färbesensitivität wird nach 45 min erreicht
	Verunreinigte Färbeschalen oder Laborgeräte	Sicherstellen, dass die verwendeten Schalen und Geräte gründlich gereinigt wurden
	Zu geringes Volumen der Färbelösung	Menge der Färbelösung der Gelgröße entsprechend anpassen
	Färbelösung wurde mehrmals verwendet	Färbelösung vor Gebrauch stets frisch ansetzen
Hoher Hintergrund	Überschüssige Färbelösung auf der Geloberfläche	Kurzes Waschen des Gels (max. 5 min) vor der Detektion; Maximale Färbesensitivität wird nach 45 min erreicht
	Gel zu lange gefärbt	Färbezeit anpassen
	Verunreinigte Färbeschalen oder Laborgeräte	Sicherstellen, dass die verwendeten Schalen und Geräte gründlich gereinigt wurden
	Verunreinigungen der verwendeten Reagenzien/ Chemikalien	Verunreinigungen vermeiden

Problem	Mögliche Ursache	Abhilfe
Flecken/Sprenkel auf dem Gelbild	Staubpartikel in den verwendeten Reagenzien oder aus der Umgebung	Sicherstellen, dass im Gel keinerlei Partikel sind sowie die Verwendung gründlich gereinigter Schalen und Geräte
		Verwendung Puder- bzw. Staub-freier Handschuhe und Pinzetten um das Gel nur an den Ecken zu berühren
		Während des Färbens die Schalen immer abdecken
Unregelmäßig gefärbtes Gel	Ungenügendes Schütteln der Schale während des Färbens	Gel sollte stets mit Färbelösung bedeckt sein und durch das Schütteln gut bewegt werden
Keine Banden oder Spots detektierbar	Fehler beim Detektionssystem	System und Einstellungen überprüfen
	Kein Protein im Gel	Coomassie- oder Silberfärbung zur Kontrolle