



SERVA

SERVA PRiME™ Lightning Red

Direkte Fluoreszenzmarkierung von Proteinen vor der SDS PAGE

Inhalt

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1 Chemische Kompatibilität	3
1.2 Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität	3
1.3 Vergleich zu Silber- und Coomassie®-Färbung	3
1.4. Einfache Durchführung der Markierung	4
1.5. Bindungs- und Fluoreszenzeigenschaften	4
1.6. Fixierung für nachfolgende Massenspektroskopie	5
1.7. Komponenten und Lagerungsbedingungen	5
2. Markierung der Proteine	5
2.1. Quantitative und qualitative Markierung	5
2.2. Protein-Markierung in Lysepuffer	6
3. Nachweisgrenze, Linearität und dynamischer Bereich der Markierung	6
3.1. Zeitlicher Verlauf der Markierung von Transferrin	6
3.2. Nachweisgrenze und Linearität: Markierung von Transferrin	6
3.2.1. Detektion mit SERVA Bluelmager	7
3.2.2. Detektion mit BIO-1000F Fluoreszenz-Scanner	7
3.2.3. Detektion mit SERVA Musketeer	8
3.2.4. Detektion mit GE Healthcare Typhoon-Scanner	9
3.3. Dynamischer Bereich	10
4. Western Blotting und Immundetektion von markierten Proben	10
4.1. Markierung der Proben	10
4.2. Detektion der Proteine	11
4.2.1. Detektion im Gel	11
4.2.2. Detektion der Proteine nach dem Transfer auf der Blotmembran	12
4.2.3. Immunchemischer Nachweis und Chemilumineszenz-Detektion	12
Appendix: Protein-Fällung nach Wessel und Flügge	13
1. Allgemeines	13
2. Benötigte Geräte und Reagenzien	13
3. Durchführung	13

SERVA PRiME™ Lightning Red

1. Allgemeine Hinweise

SERVA PRiME™ Lightning Red ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur schnellen, direkten Proteinmarkierung vor der SDS PAGE. Somit werden Färbe- und Waschschrte nach der Elektrophorese überflüssig.

Außerdem ist die Markierung kompatibel mit nachfolgenden Analysen, z. B. Massenspektrometrie oder Western Blotting. Bei Bedarf ist das Nachfärben des Gels z. B. mit Silber möglich.

Vorteile

- | Direkte Detektion
- | Keine Färbe- und Waschschrte nach der Elektrophorese
- | Hohe Empfindlichkeit: $\leq 0,4$ ng Transferrin
- | Großer dynamischer und linearer Bereich
- | Kein Überfärben
- | Massenspektrometrie- kompatibel
- | Gele können geblottet werden

1.1. Chemische Kompatibilität

SERVA PRiME™ Lightning Red toleriert typische Pufferzusätze, die für die Proteinsolubilisierung und -extraktion verwendet werden, auch Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT) und Dithioerythritol (DTE).

1.2. Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität

Ein Unterschied in der Mobilität bei der SDS PAGE zwischen markierten und unmarkierten Proteinen ist nicht detektierbar. Grund hierfür ist die sehr geringe Erhöhung der Masse um 288 Da je gebundenem Molekül sowie die geringe Hydrophobizität des Farbstoffs.

1.3. Vergleich zu Silber- und Coomassie®-Färbung

Die bevorzugte Methode für sensitive Proteindetektion ist die Silberfärbung. Aufgrund der schnellen Sättigung der gefärbten Banden ist die Proteinquantifizierung mittels dieser Methode jedoch nicht durchführbar.

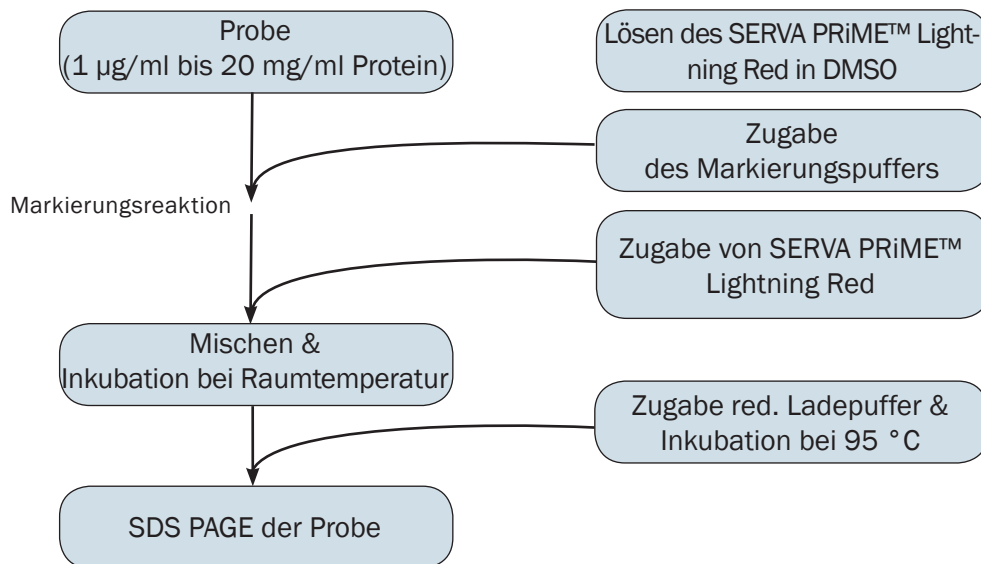
Im Vergleich zur Fluoreszenzfärbung/-markierung zeigt die Silberfärbung zwar intensivere Banden, jedoch ist die Fluoreszenz ohne Einschränkungen quantifizierbar. Die Coomassie-Färbung ist deutlich weniger sensitiv.

Da SERVA PRiME™ Lightning Red die einfache Durchführung der Markierung mit hoher Sensitivität und Quantifizierbarkeit kombiniert, ist dies der Farbstoff der Wahl für die SDS PAGE.

1.4. Einfache Durchführung der Markierung

Nach der quantitativen und qualitativen Proteinmarkierung und der nachfolgenden Elektrophorese ist die Proteindetektion umgehend möglich. Proben mit einer Proteinkonzentration von 1 µg/ml bis 20 mg/ml können eingesetzt werden. Nach der Markierung sind keine zusätzlichen Reinigungs- und Konzentrierungsschritte erforderlich.

Fließschema der Markierung



1.5. Bindungs- und Fluoreszenzeigenschaften

Der Fluoreszenzfarbstoff bindet an primäre Aminogruppen, z. B. ε-Aminogruppen der Lysin-Reste in Proteinen und Peptiden.

Die Detektion des markierten Proteins erfolgt mit einer Anregungswellenlänge von ca. 530 nm und einem Emissionsfilter von 610 nm (Bandbreite 30 nm).

Die Quantenausbeute (Quantum Yield QY) des gebundenen Farbstoffs beträgt bis zu 0,60. Die Fluoreszenzquantenausbeute QY ist das Verhältnis von Anzahl der emittierten Photonen zur Anzahl der absorbierten Photonen.

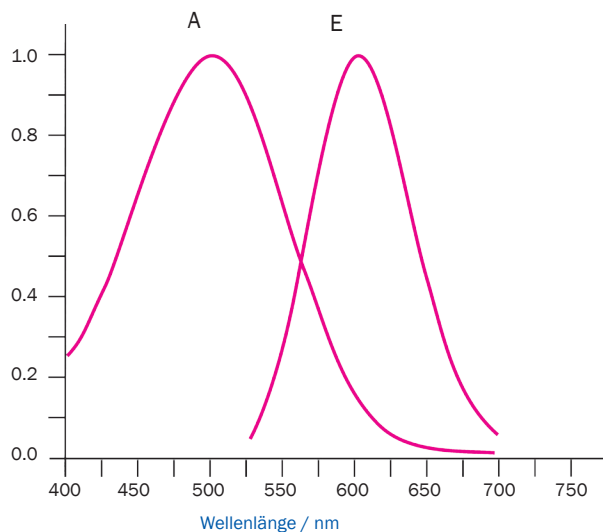


Abb. 1: Absorptions- (A) und Emissionsspektrum (E) des gebundenen SERVA PRIME™ Lightning Red

1.6. Fixierung für nachfolgende Massenspektroskopie

Für anschließende MS-Analyse können die Proteine entweder mit Essigsäure oder Zitronensäure und Alkohol fixiert werden. Das Fluoreszenzsignal bleibt bis zu 10 Tage verlustfrei erhalten.

1.7. Komponenten und Lagerungsbedingungen

Komponente	Menge	Lagertemperatur
SERVA PRiME™ Lightning Red	1 Vial	+ 2 °C bis + 8 °C (lichtgeschützt)
DMSO, wasserfrei	250 µl	+ 2 °C bis + 8 °C
Labeling Buffer (Markierungspuffer)	10 ml	+ 2 °C bis + 8 °C
2x Loading Buffer (Probenpuffer)	10 ml	+ 2 °C bis + 8 °C

In DMSO, wasserfrei gelöst, aliquotierter Farbstoff ist mindestens 6 Monate bei -20 °C stabil.

2. Markierung der Proteine

2.1. Quantitative und qualitative Markierung

Die Markierung der Proteine kann entweder nach einem quantitativen oder qualitativen Protokoll durchgeführt werden.

Benötigte Lösungen:

- | SERVA PRiME™ Lightning Red: 1 Vial Farbstoff in 250 µl DMSO lösen
- | 1 M DTT-Lösung: 154 mg DTT add 1 ml dest. Wasser
- | Reduzierender Ladepuffer: 500 µl 2x Ladepuffer + 50 µl 1 M DTT

	Qualitatives Protokoll	Quantitatives Protokoll
Probe (1 µg/ml bis 20 mg/ml)		2 µl
Markierungspuffer		+ 17 µl
SERVA PRiME™ Lightning Red		+ 1 µl
		Mischen
Inkubation bei Raumtemperatur	3 - 5 min	30 min
Reduzierender Probenpuffer		+ 20 µl
Reduzierender Ladepuffer		Mischen
Inkubation bei 95 °C		5 min

WICHTIG:

Alternativ kann als Ladepuffer auch 2x Tris-Glycin-SDS PAGE Probenpuffer verwendet werden. Dann muss die Markierung allerdings in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 mit 0,5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) erfolgen.

Anschließend kann die Probe mittels SDS PAGE analysiert werden.

Das Markierungsprotokoll kann auch für saure Proben, z. B. Urine verwendet werden. Die Proteinkonzentration der Urin-Proben sollte auf 20 µg/ml eingestellt werden.

2.2. Protein-Markierung in Lysepuffer:

Befindet sich die Probe in Lysepuffer muss die Markierung in Lysepuffer durchgeführt werden.

WICHTIG:

Es ist nicht möglich Lysepuffer und Markierungspuffer zu mischen, da es hier zur Ausfällungen kommt. Nach der Markierung muss eine Proteinfällung, z. B. nach Wessel und Flügge (siehe Anhang) durchgeführt werden.

Anschließend kann die Probe in jedem beliebigen Probenpuffer aufgenommen werden.

3. Nachweisgrenze, Linearität und dynamischer Bereich der Markierung

3.1. Zeitlicher Verlauf der Markierung von Transferrin

- | Proteinkonzentration: 20 mg/ml
- | Inkubationszeit der Markierungsreaktion: 0 – 30 min
- | Detektion: SERVA Bluelmager
Belichtungsdauer: 1 s

3.2. Nachweisgrenze und Linearität: Markierung von Transferrin

- | Probenkonzentration: 20 mg/ml
Markierungsprotokoll: 30 min Inkubation
- | Erstellen einer Verdünnungsreihe: 20 µg/ml bis 10 ng/ml
- | Auftragsvolumen pro Spur: 5 µl

Inkubationszeit [min]

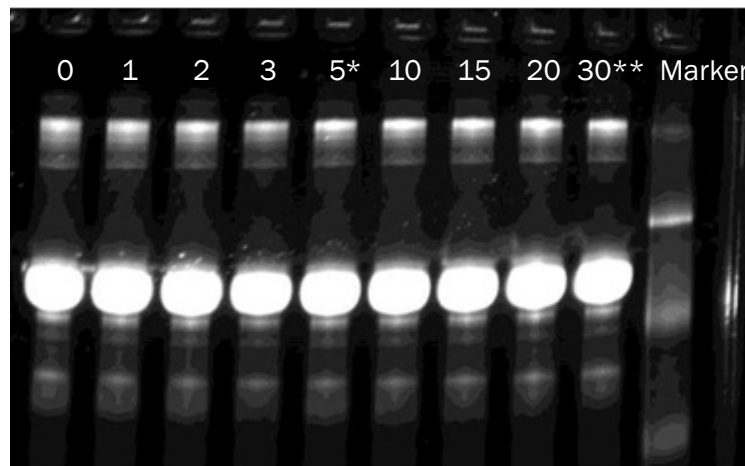


Abb. 2: SERVAGEl™ TG PRiME™ 10 %-Fertiggel mit Lightning Red markierten Transferrin-Proben

* Inkubationszeit quantitatives Protokoll

** Inkubationszeit qualitatives Protokoll

3.2.1. Detektion mit SERVA Bluemager

- | Belichtungsdauer: 15 s
- | Nachweisgrenze: bis 200 pg
- | Auswertung: Kapelan LabImage 1D Software

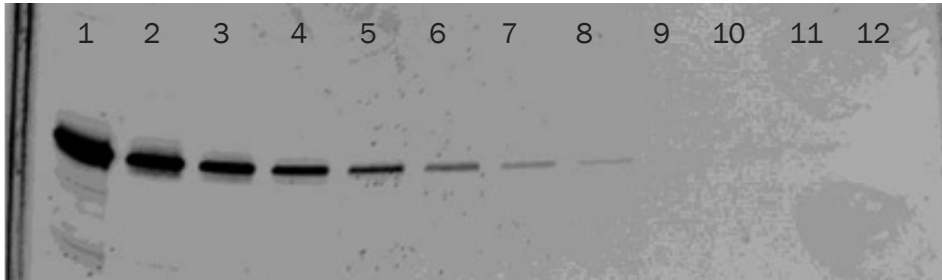


Abb. 3.1.: Nachweisgrenze auf SERVAGel™ TG PRIME™ 10 %-Fertiggel mit einer Verdünnungsreihe von Lightning Red markiertem Transferrin (Proteinmenge - Spur 1: 100 ng; Spur 6: 3,12 ng; Spur 12: 50 pg)

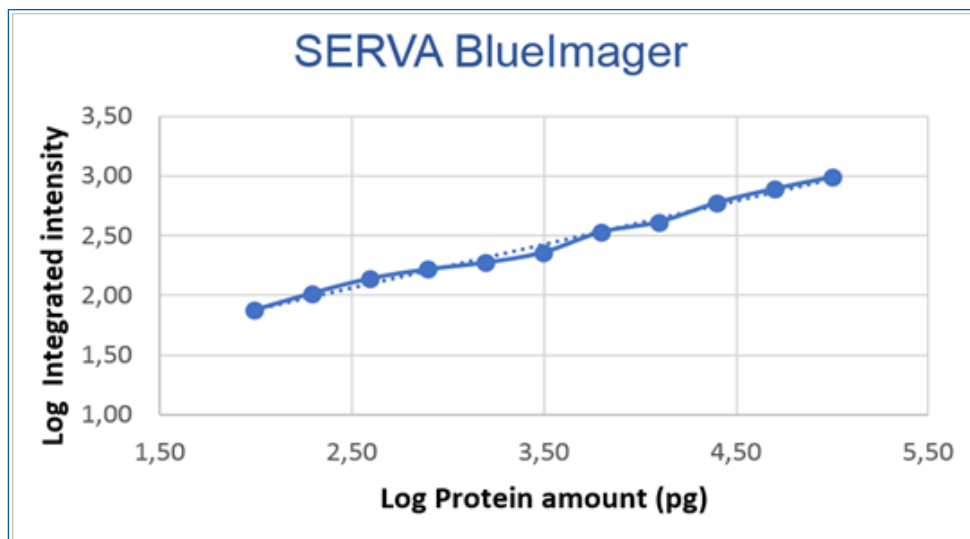


Abb. 3.2.: Analyse der Linearität der Markierung nach Detektion mit SERVA Bluemager

3.2.2. Detektion mit BIO-1000F Fluoreszenz Scanner

- | Fluoreszenz-Scanner: 24x
- | Nachweisgrenze: bis 12,5 ng

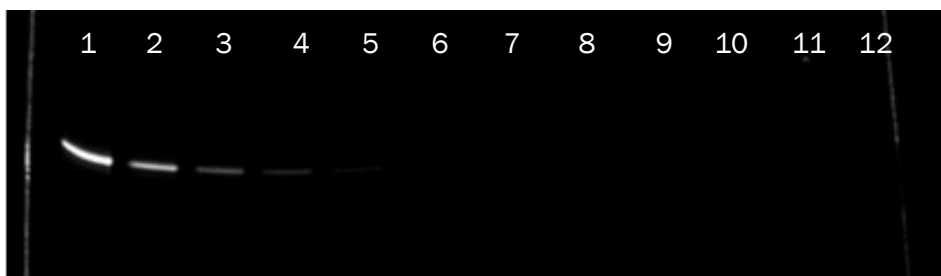


Abb. 4: Nachweisgrenze auf SERVAGel™ TG PRIME™ 10 %-Fertiggel mit einer Verdünnungsreihe von Lightning Red markiertem Transferrin (Proteinmenge - Spur 1: 100 ng; Spur 6: 3,12 ng; Spur 12: 50 pg)

3.2.3. Detektion mit SERVA Musketeer

- | Belichtungsdauer: 5 s
- | Iris: 0,95
- | Nachweisgrenze: bis 400 pg
- | Auswertung: Kapelan LabImage 1D Software

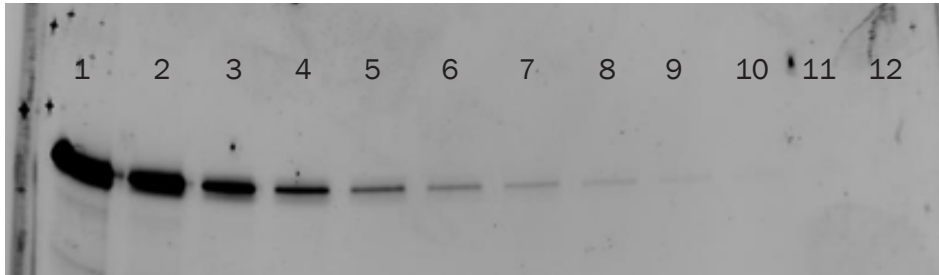


Abb. 5.1.: Nachweisgrenze auf SERVAGE™ TG PRIME™ 10 %-Fertiggel mit einer Verdünnungsreihe von Lightning Red markiertem Transferrin (Proteinmenge - Spur 1: 100 ng; Spur 6: 3,12 ng; Spur 12: 50 pg)

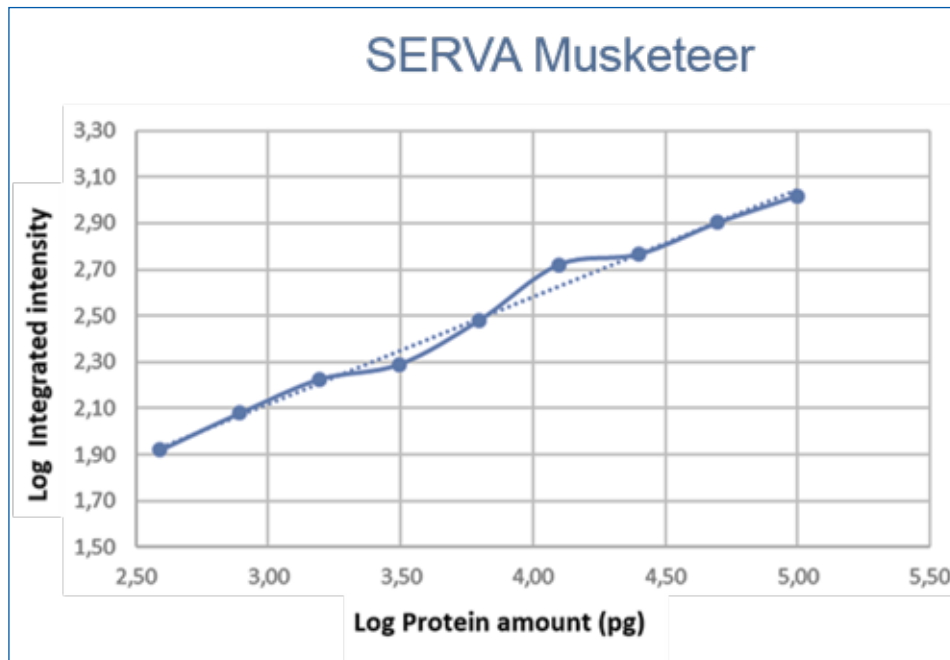


Abb. 5.2.: Analyse der Linearität der Markierung nach Detektion mit SERVA Musketeer

3.2.4. Detektion mit GE Healthcare Typhoon-Scanner

- | Anregung: 532 nm
- | Emission: 610 nm (PMT 600)
- | Proteinmenge: 20 µg/ml (1 µg/ml)
- | Nachweisgrenze: bis 100 pg (bis 300 pg)
- | Auswertung: Kapelan LabImage 1D Software

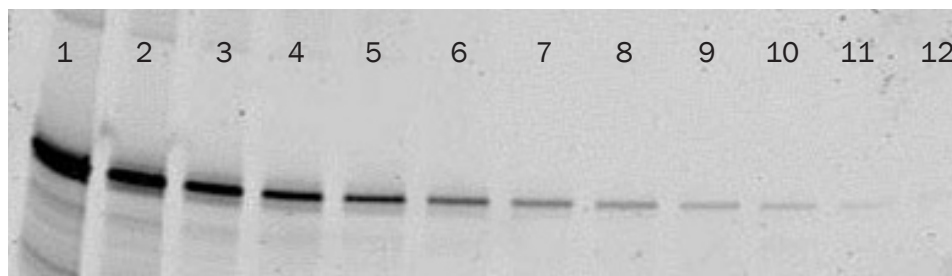


Abb. 6.1.: Nachweisgrenze auf SERVAGe™ TG PRiME™ 10 %-Fertigel mit einer Verdünnungsreihe von Lightning Red markiertem Transferrin (Proteinmenge - Spur 1: 100 ng; Spur 6: 3,12 ng; Spur 12: 50 pg)

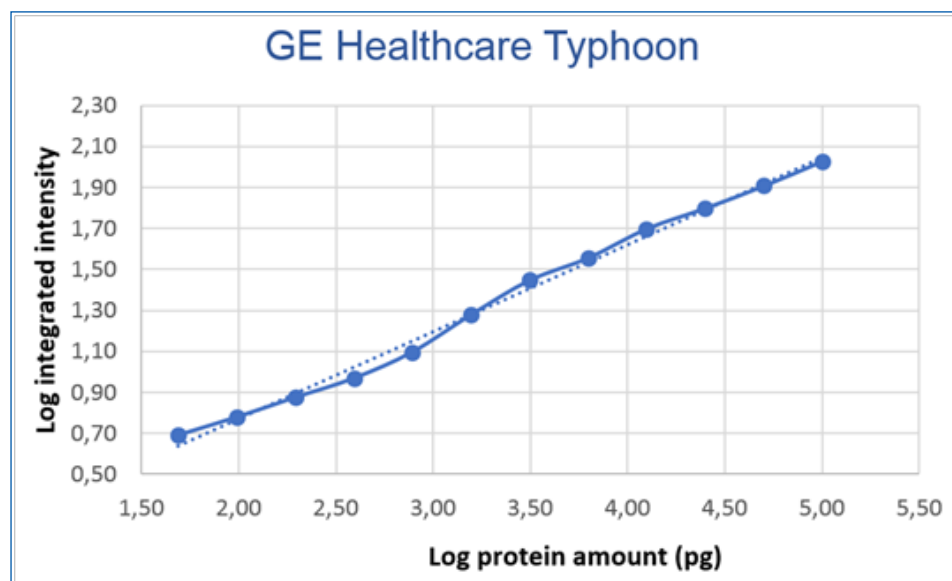


Abb. 6.2.: Analyse der Linearität der Markierung nach Detektion mit GE Healthcare Typhoon

3.3. Dynamischer Bereich

Ovalbumin (40 µg/ml, markiert mit SERVA PRiME™ Lightning Red) wurde mit Transferrin (5 µg/ml bis 5 ng/ml, ebenfalls markiert mit SERVA PRiME™ Lightning Red) gemischt/gespikt. Hierbei ist bei einem Transferrin:Ovalbumin-Verhältnis von 1:8200 (Spur 11) das Transferrin noch detektierbar.

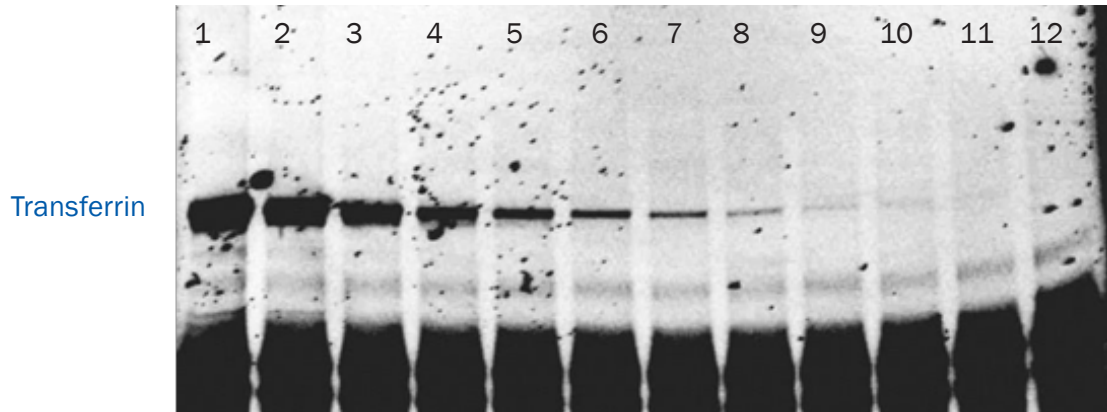


Abb. 7: SERVA Ge™ TG PRiME™ 4 - 12% -Fertiggel mit gespiktem Ovalbumin

4. Western Blotting und Immundetektion von markierten Proben

Mit SERVA PRiME™ Lightning Red markierte Proteine können nach der elektrophoretischen Trennung auf Nitrocellulose (NC)- und PVDF-Membranen geblottet werden. Die Membranen sollten über eine niedrige Eigenfluoreszenz verfügen.

Gut zu wissen:

Die Kombination von Fluoreszenz- und Immundetektion ist ideal für die Normalisierung der Probe.

WICHTIG:

Wird ein Western Blot durchgeführt, sollte der Farbstoff 1:10 in Markierungspuffer verdünnt werden, um bei einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml eine Minimalmarkierung (6,25 pmol/µg Protein) zu erreichen.

4.1. Markierung der Proben

Das Markierungsprotokoll ist identisch und wird mit dem verdünnten Farbstoff durchgeführt.

Benötigte Lösungen:

- | Verdünnung des Farbstoffs:
10 µl SERVA PRiME™ Lightning Red + 90 µl Markierungspuffer
- | 1 M DTT-Lösung: 154 mg DTT add 1 ml dest. Wasser
- | Reduzierender Ladepuffer: 500 µl Ladepuffer + 50 µl 1 M DTT

	Qualitatives Protokoll	Quantitatives Protokoll
Probe (1 µg/ml bis 20 mg/ml)	2 µl	
Markierungspuffer	+ 17 µl	
SERVA PRiME™ Lightning Red (1:10-Verdünnung)	+ 1 µl	
	Mischen	
Inkubation bei Raumtemperatur	3 - 5 min	30 min
Reduzierender Ladepuffer	+ 20 µl	
	Mischen	
Inkubation bei 95 °C	5 min	
SDS PAGE		

4.2. Detektion der Proteine

Im folgenden Beispiel wurden jeweils 5 µg Transferrin mit unterschiedlichen Lightning Red (LR)-Verdünnungen (40 bis 0,16 ng LR/µg Protein) inkubiert.

4.2.1. Detektion im Gel

- | Proben: 5 µl/Spur (entspricht 1,67 µg Protein)
- | Detektion: SERVA Bluelmager
- | Belichtungsdauer: 10 s

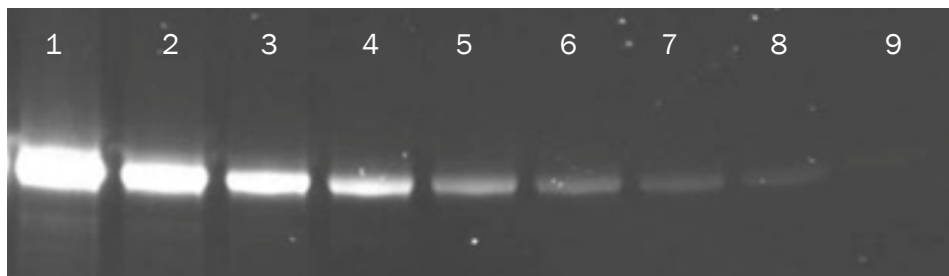


Abb. 8: SERVAge™ TG PRIME™ 8 %-Fertiggel mit einer Verdünnungsreihe von Lightning Red markiertem Transferrin (vor dem Semi-Dry Transfer)

4.2.2. Detektion der Proteine nach dem Transfer auf der Blotmembran

Das Western Blotting wurde mit SERVA Xpress PVDF Blotting Kit (SERVA Kat.-Nr. 42664) nach Herstellerangaben durchgeführt.

- | Membran: PVDF, Porengröße 0,2 µm
- | Detektionssystem: SERVA Musketeer
- | Belichtungsdauer: 3 s

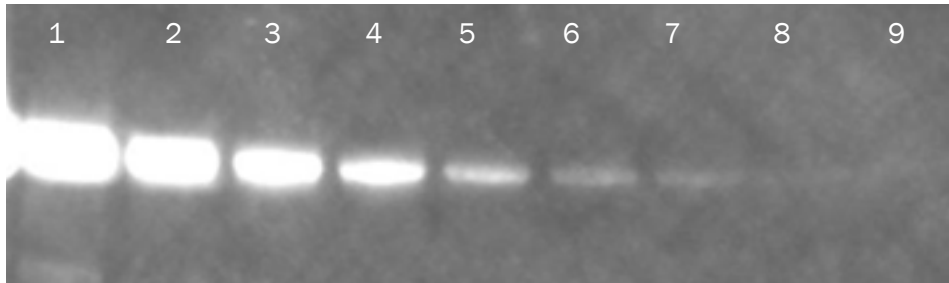


Abb. 9: SERVAge™ TG PRIME™ 8 %-Fertiggel mit einer Verdünnungsreihe von Lightning Red markiertem Transferrin geblotet auf eine PVDF-Membran

4.2.3. Immunchemischer Nachweis und Chemilumineszenz-Detektion

Schritte	Dauer	Lösung
Blockierung	1 h	1x SERVA BlueBlock
1. Antikörper	1 h	Kaninchen-Anti-human Transferrin (1:50.000 in 1x SERVA BlueBlock)
Waschen	3 x 5 min	1x TBS-Tween
2. Antikörper	1 h	Anti-Kaninchen IgG-HRP (1:2.000 in 1x SERVA BlueBlock)
Waschen	3 x 5 min	1x TBS-Tween
Detektion	Substrat: SERVALight EOS, Detektionssystem: GeneGnome	

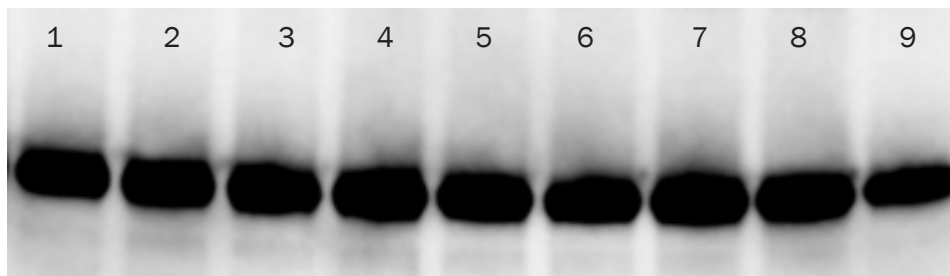


Abb. 10: PVDF-Membran mit einer Verdünnungsreihe von Lightning Red markiertem Transferrin nach Antikörper-Inkubation und Chemilumineszenz-Detektion

Appendix:

Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen nach Wessel und Flügge

(Anal. Biochem. 1984, 138 (1): 141 – 143)

1. Allgemeines

Bei dieser Fällungsmethode bilden sich Proteinpräzipitate zwischen der oberen, wässrigen Schicht, und der unteren, organischen Schicht. In der wässrigen Phase befinden sich Nukleinsäuren, Salze, Detergenzien, reduzierende Agenzien etc.

Die organische Phase (Chloroform/Methanol) enthält Lipide. Somit können mit dieser Methode Proteine angereichert und von störenden Verunreinigungen, wie z. B. Lipide und Nukleinsäuren getrennt werden.

2. Benötigte Geräte und Reagenzien

- | Chloroform (SERVA Kat.-Nr. 45627)
- | Methanol (SERVA Kat.-Nr. 45631)
- | Destilliertes Wasser (dest. H₂O)
- | Geeignete Probengefäße, z. B. 1,5- oder 2,0 ml-Reaktionsgefäße
- | Vortex-Mischer
- | Mikrozentrifuge, z. B. SERVA BlueSpin Mini

3. Durchführung

Bitte beachten Sie: Das nachfolgende Protokoll ist für 1,5 ml- Reaktionsgefäße angepasst. Falls notwendig, können Sie die angegebenen Mengen entsprechend vergrößern.

- | Legen Sie **150 µl Proteinprobe (Proteingehalt 50 – 300 µg)** in einem 1,5 ml-Tube vor. Falls notwendig, kann die Probe entsprechend verdünnt werden. Verwenden Sie hierzu den Puffer, den Sie für die Probenherstellung eingesetzt haben.
- | Geben Sie anschließend **600 µl Methanol** sowie **150 µl Chloroform** zu und mischen gründlich mit einem Vortex-Mischer.
- | Danach geben Sie **450 µl dest. H₂O** zu und mischen nochmals gründlich.
- | **5 min** zentrifugieren bei **mind. 12.300 xg**
- | Trennen Sie die obere, wässrige Phase vorsichtig ab, ohne die weißen Proteinpräzipitate an der Phasengrenze zwischen wässriger und organischer Phase zu zerstören.
- | Danach geben Sie **450 µl Methanol** zu und mischen nochmals gründlich, anschließend **5 min** zentrifugieren bei **mind. 12.300 xg**
- | Trennen Sie nun den Überstand vorsichtig vom Proteinpellet ab. Beachten Sie hierbei, dass sich das Pellet nicht löst. Markieren Sie hierzu die Pellet-Position an der Außenseite des Reaktionsgefäßes.
- | Um den restlichen Überstand vollständig zu entfernen, zentrifugieren Sie erneut (**5 min** bei **mind. 12.300 xg**) und entfernen die Flüssigkeit vorsichtig.
- | Das Protein-Pellet wird anschließend ca. 10 min luftgetrocknet. Alternativ kann auch eine Speed-Vac verwendet werden.

WICHTIG: Das Pellet sollte nicht zu trocken werden, da ansonsten vollständiges Lösen sehr schwierig ist. Außerdem können Reste von Methanol und Chloroform bei nachfolgender Fluoreszenzmarkierung stören.

SERVA

SERVA Electrophoresis GmbH

Carl-Benz-Str. 7
D-69115 Heidelberg
Germany

E-Mail: info@serva.de
Internet: www.serva.de

German Customers

To place orders
Phone: 06221 13840-0
Fax: 06221 13840-10

Customer Care
Phone: 06221 13840-46
Fax: 06221 13840-10

Technical Service
Phone: 06221 13840-44
Fax: 06221 13840-54
E-Mail:
tech.service@serva.de

International Customers

To place orders
Please contact your local
distributor. For further details,
please visit www.serva.de

Customer Care
Phone: +49 6221 13840-47
Fax: +49 6221 13840-10

Technical Service
Phone: +49 6221 13840-44
Fax: +49 6221 13840-54
E-Mail:
tech.service@serva.de