

Proteinmarkierung mit Differentialproteomik-Reagenzien 3Dye

Die Differentialproteomik ermöglicht den Vergleich großer Mengen von Proteinen, die aus verschiedenen biologischen Quellen stammen. Übliche Beispiele sind behandelte und unbehandelte Zellen oder auch unterschiedliche Bakterienstämme. Kleine Unterschiede in einer großen Anzahl von Komponenten können mittels der Differentialproteomik festgestellt werden.

Der Analysensätze Lumiprobe 3Dye Kit ist drei Farbstoffe mit der Bezeichnung Cyanin 2, Cyanin 3 und Cyanin 5, die spektral ausgeprägt, jedoch mobilitätsangepasst sind. Somit komigrieren mit diesen Farbstoffen markierte Proteine in der Gelelektrophorese. Die Anlagerung der Farbstoffe an Proteine wird über die NHS-Ester-Markierungsschemie erreicht. Dabei sind Lysine vorherrschende Stellen für die Markierung.

Die bewährte Verfahrensweise der 2D-Proteomik nutzt eine intern gebildete Vergleichsprobe, die im Wesentlichen ein Gemisch aus beiden markierten Proteomen mit einem der Farbstoffe ist. Hierfür ist Cyanin 2 zu verwenden. Die beiden anderen Farbstoffe, Cyanin 3 und Cyanin 5, sind für alle Versuche gegeneinander austauschbar.

Die 3Dye-Reagenzien sind in abgemessenen Packungen zu 5 nmol, 10 nmol und 25 nmol erhältlich. Die Farbstoffe sind gefriergetrocknet, um ihre Gebrauchsfähigkeitsdauer zu verlängern. Eine jede Packung ist vor ihrer Verwendung mit DMF auf ihre ursprüngliche Konzentration zu lösen oder zu verdünnen. Die Qualität des DMF ist für die Versuche und für die Gebrauchsfähigkeitsdauer der Produkte sehr wichtig. Daher markierungsfähiges DMF kommt mit den drei Farbstoffen in dem Kit.

Die Zubereitung des Proteingemisches ist der variabelste und anspruchsvollste Teil der Gehaltsbestimmung. Sie liegt außerhalb des Geltungsbereiches des Protokolls, da unterschiedliche Proben sehr unterschiedliche Lysebedingungen erfordern, um Proteingemische zu erhalten, die für die Gehaltsbestimmung geeignet sind. Im Wesentlichen sind beide zu vergleichende Proben unter gleichen Bedingungen zu lysieren, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Wenn der Versuch eine Lyse erforderlich macht, werden im Allgemeinen auf CHAPS basierende Lyselösungen empfohlen.

Lumiprobe Corporation

201 International Circle, Suite 135
Hunt Valley, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Nach der Zubereitung der beiden zu vergleichenden Proteingemische kann das folgende Protokoll für die Durchführung der Markierung verwendet werden.

1. Bereiten Sie eine Stammlösung von 1 mM von jedem Farbstoff zu, indem Sie 1 µl DMF (aus dem Kit) pro 1 nmol eines jeden Farbstoffes zugeben. Diese Lösungen sind bei -20°C drei Monate lang stabil. Um die Gebrauchsfähigkeitsdauer zu gewährleisten, entfeuchten und tauen Sie die Röhrchen vor dem Öffnen vollständig auf, spülen Sie sie nach Möglichkeit vor dem Verschließen mit einem Inertgas.
2. Stellen Sie die Proteingemische auf einen pH-Wert von 8,5 ein, indem Sie einen aminfreien Puffer (NaHCO₃, Acetat) verwenden. Bereiten Sie drei Markierungsreaktionen in getrennten Glasfläschchen vor: eine unbehandelte, eine behandelte und eine als Mischung aus beidem (interne gebildete Vergleichsprobe). Die Proteinkonzentration sollte im Idealfall 5 bis 10 mg/ml betragen, sie kann jedoch auch in einer niedrigeren Konzentration von bis zu 1 mg/ml verwendet werden. Nehmen Sie 50 µg von Protein pro Reaktion.
3. Bereiten Sie Arbeitslösungen der Farbstoffe zu, indem Sie aliquote Teile von 1 mM der Stammlösung nehmen und mit DMF auf 0,4 mM verdünnen.
4. Geben Sie 1 µl der Arbeits-Farbstofflösung zu dem Reaktionsgemisch zu: Cyanin 3 für unbehandelt, Cyanin 5 für behandelt (beziehungsweise umgekehrt) und Cyanin 2 für die gebildete interne Vergleichsprobe. Mischen Sie das Reaktionsgemisch, indem Sie es ein- und auspipettieren und 30 Minuten lang an einem lichtgeschützten Ort stehen lassen.
5. Stoppen Sie die Reaktionen, indem Sie 1 µl von 10 mM Lysin zu einer jeden Lösung zugeben (dies ist nicht in dem Analysensatz — Kit — beinhaltet, jedoch ist dieses Reagens problemlos erhältlich).
6. Führen Sie die drei Proben zusammen und führen Sie die 2D-Gelanalyse durch.
7. Führen Sie die Analyse mit einem Bildrechner durch, der für den Nachweis von Cyanin 2, Cyanin 3 und Cyanin 5 geeignet ist. Proteinflecken können ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

Lumiprobe Corporation

201 International Circle, Suite 135
Hunt Valley, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com