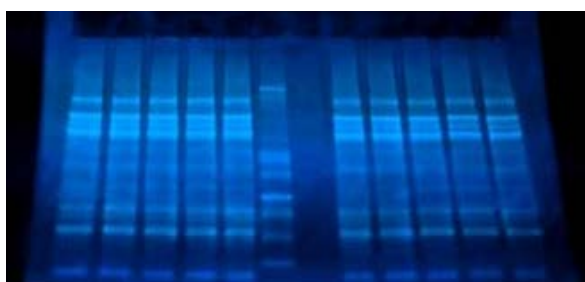


## nUView Fertiggele



Alle nUView-Fertiggele enthalten eine einzigartige Formel, die es ermöglicht, Proteinbanden unter UV-Licht in nur zwei Minuten sichtbar zu machen.

Dank der nUView-Technologie entfällt das Färben und Entfärben Ihrer Gele. Dies erhöht die Proteinausbeute und spart Ihnen wertvolle Zeit bei gleichzeitig verbesserten Ergebnissen.



2-minütige Visualisierung unter UV-Licht

### Visualisierung von Proteinen in der SDS-PAGE mit dem nUView-System

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist die wohl gebräuchlichste und etablierteste Analyseverfahren in der Proteinchemie [Laemmli, 1970].

Die Methode dient dazu, Proteine entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität zu trennen. Dies ist bei der SDS-PAGE eine Funktion der Länge der Polypeptidkette bzw. des Molekulargewichts, da die Proteine in den Proben aufgrund der Bindung von SDS eine nahezu identische Ladung pro Masseneinheit aufweisen.

Zur Visualisierung werden üblicherweise Textilfarbstoffe wie Coomassie Brilliant Blue (CBB) verwendet. Diese und andere Verfahren wie Silberfärbung, Fluoreszenzfarbstoffe und Schwermetallbindung sind zeitaufwändige Färbemethoden. Die meisten dieser Methoden erfordern entweder teure Reagenzien, Probleme bei der Abfallentsorgung oder spezielle Bildgebungssysteme.

### UV Visualisierung

Im Gegensatz dazu ermöglichen nUView-Gele die Visualisierung der getrennten Proteinbanden durch Beleuchtung des Gels auf einem Standard-UV-Transilluminator, wie er üblicherweise in molekularbiologischen Laboren zur Visualisierung von DNA mit interchelatierenden Farbstoffen (z. B. Ethidiumbromid) verwendet wird. Die Aminosäure Tryptophan ist von Natur aus fluoreszierend, jedoch nicht im sichtbaren Spektrum. Die photoinduzierte Adduktbildung zwischen Tryptophan und der Trihalogenverbindung unter UV-Bestrahlung führt dazu, dass Proteine, angeregt durch UV-Licht, im sichtbaren Bereich fluoreszieren. Optimale Ergebnisse hängen von der Wellenlänge des Transilluminators, den verwendeten Filtern und dem Kamerasystem zur Dokumentation der Fluoreszenz ab. Banden sind innerhalb von zwei Minuten nach UV-Bestrahlung sichtbar. Daher müssen die Bedingungen für jedes Gel-Dokumentationssystem und jeden UV-Transilluminator optimiert werden. Längere Belichtungszeiten

können zu einer erhöhten Fluoreszenzintensität führen. Kumulative UV-Expositionszeiten wandeln das Tryptophan-Addukt jedoch in eine nicht-fluoreszierende Form um; infolgedessen schwächen sich die Proteinbanden ab (beginnend nach ca. 7 Minuten) und sind schließlich unter UV-Beleuchtung nicht mehr sichtbar.

### Prozessoptimierung

Verwenden Sie einen UV-Transilluminator mit UV-Röhren, die eine Wellenlänge im Bereich von 250–320 nm liefern. 300–310 nm ist bevorzugt, die anderen Wellenlängen können jedoch optimiert werden. Um die optimale Belichtungszeit zu bestimmen, führen Sie eine Gelelektrophorese mit verschiedenen Konzentrationen einer gängigen Probe oder von Molekulargewichtsstandards durch. Nehmen Sie das Gel aus der Kassette, spülen Sie es kurz mit Reinstwasser (nicht einweichen!) und legen Sie es direkt auf den Transilluminator (das Spülen kann weggelassen werden, jedoch können die Salze im Oberflächenpuffer des Gels Teile des Transilluminators angreifen). Schalten Sie das UV-Licht ein und belichten Sie das Gel zwei Minuten lang. Die Gelentwicklung kann gegebenenfalls in Echtzeit beobachtet werden. Optimieren Sie Ihre Kameraeinstellungen (Blende, Fokus usw.). Fotografieren Sie das belichtete Gel alle zwei Minuten und in regelmäßigen Abständen bis zu 10–15 min (bei längerer Belichtung kann die Intensität abnehmen). Vergleichen Sie die Bilder und wählen Sie die optimale Detektionszeit.

### Anwendungsbereiche

Die nUView-Methode bietet Vorteile beim Elektroblotting zur Evaluierung und Dokumentation eines Gels vor dem Western Blot [Ladner et al., 2004] sowie vor der Autoradiographie; denn sie erfordert nicht das Anfertigen eines Replikatsgels. Und nach dem Blotting kann das Originalgel erneut auf den Transilluminator gelegt werden, um den Grad des Proteintransfers auf die Membran zu überprüfen. Mit nUView visualisierte Banden können ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Die visualisierten Banden lassen sich aufschließen und direkt auf MALDI-TOF-Platten auftragen [Ladner et al., 2006]. Proteine müssen fixiert werden, bevor sie verdaut und die Peptide für die LC-MS-Analyse aus dem Gel eluiert werden. Mit nUView visualisierte Gele können anschließend mit jeder bevorzugten Methode nachgefärbt werden (z. B. CBB, Silber, Sypro, Zink/Kupfer usw.). Somit ermöglicht die nUView-Methode eine sofortige Visualisierung, an die sich Standard-Bildgebungsverfahren anschließen lassen. Darüber hinaus liefert diese Kombination ein umfassenderes Bild aller Proteine in der Probe, da nicht zwangsläufig alle Proteine durch eine einzelne Visualisierungsmethode detektierbar sind. Membranproteine lassen sich mittels nUView – im Vergleich zu CBB – möglicherweise leichter visualisieren; dies ist auf den Tryptophangehalt dieser Proteinklasse zurückzuführen.

Referenzen: Ladner, C., Yang, J., Turner, R.J., & Edwards, R. A. (2004) Visible Fluorescence Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels without staining. *Anal. Biochem.* 326;13-20.  
Ladner, C.L., Edwards, R.A., Schriemer, D.C., & Turner, R.J. (2006) Identification of trichloroethanol visualized proteins from two-dimensional polyacrylamide gels by mass spectrometry. *Analytical Chemistry.* 78; 2388-2396.  
Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227; 680-685. G0311D