

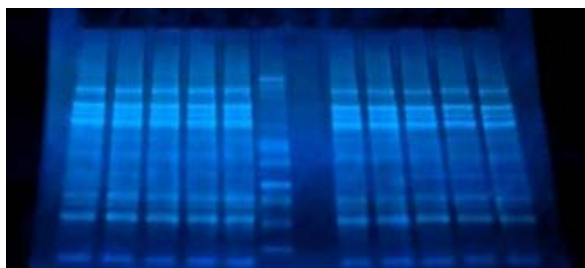
nUView Fertiggele



UV Visualisierung

Alle nUView-Fertiggele enthalten eine einzigartige Formel, die die Visualisierung von Proteinbanden ermöglicht. Innerhalb von nur 2 Minuten unter UV-Licht erhalten Sie so schneller als mit jedem anderen Gel auf dem Markt Ergebnisse von der Analyse bis zum Ergebnis!

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].

Mit dieser Methode werden Proteine anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität getrennt. Diese ist in der SDS-PAGE eine Funktion der Polypeptidkettenlänge bzw. des Molekulargewichts, da die Proteine in den Proben aufgrund der SDS-Bindung nahezu die gleiche 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 intercalierenden 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 im sichtbaren Bereich fluoreszieren, angeregt durch UV-Licht.

Optimale Ergebnisse hängen von der Wellenlänge des Transilluminators, den verwendeten Filtern und dem Kamerasystem zur Dokumentation der Fluoreszenz ab. Banden sind innerhalb von 2 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. Allerdings führt eine kumulative UV-Bestrahlung dazu, dass das Tryptophan-Addukt in eine nichtfluoreszierende Form übergeht, wodurch die Proteinbanden schwächer werden (beginnend nach ca. 7 Minuten) und schließlich unter UV-Licht nicht mehr sichtbar sind.

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 2 min lang. Die Gelentwicklung kann gegebenenfalls in Echtzeit beobachtet werden. Optimieren Sie Ihre Kameraeinstellungen (Blende, Fokus usw.). Fotografieren Sie das belichtete Gel alle 2 min 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 Auswertung/Dokumentation eines Gels vor Western Blotting [Ladner et al., 2004] und Autoradiographie; da sie kein Replikat des Gels erfordert und nach dem Blotting das Originalgel wieder auf den Transilluminator gelegt werden kann, um den Grad des Proteintransfers auf die Membran zu beurteilen.

Mit nUView visualisierte Banden können ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert werden. Die mit der nUView-Methode visualisierten Banden können verdaut und direkt auf MALDI/TOF-Platten aufgetragen werden [Ladner et al., 2006].

Proteine müssen vor der Verdauung fixiert werden, um Peptide für die LC-MS-Analyse aus dem Gel zu eluieren. Mit nUView visualisierte Gele können mit jeder beliebigen Methode (CBB, Silber, Sypro, Zink/Kupfer usw.) überfärbt werden.

Die nUView-Methode ermöglicht somit eine sofortige Visualisierung, die anschließend mit Standard-Bildgebungsverfahren fortgesetzt werden kann. Darüber hinaus liefert diese Kombination ein umfassenderes Bild aller Proteine in der Probe, da nicht alle Proteine mit einer einzelnen Visualisierungsmethode nachweisbar sind. Membranproteine lassen sich aufgrund ihres Tryptophangehalts mit nUView möglicherweise leichter darstellen als mit CBB.

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