

Мечение белков с помощью набора реагентов 3Dye для дифференциального протеомного анализа

Дифференциальный протеомный анализ позволяет проводить сравнение совокупностей белков, произведенных разными биологическими объектами, например обработанными и необработанными клетками, разными штаммами бактерий и т. д. Даже небольшие различия в белковом профиле сравниваемых образцов могут быть обнаружены с помощью дифференциального протеомного анализа.

Компания Lumiprobe предлагает набор реагентов 3Dye, в состав которого входят красители Cyanine2, Cyanine3 и Cyanine5, отличающиеся по своим спектральным характеристикам, но совпадающие по электрофоретической подвижности. Благодаря этому одинаковые белки, меченные разными красителями, мигрируют в геле с одинаковой скоростью. Поскольку в основе мечения белка этими красителями лежит реакция NHS-эфира с аминогруппой, основными сайтами для мечения служат остатки лизина.

Проведение надлежащего протеомного анализа предполагает использование внутреннего контрольного образца, представляющего собой смесь двух одновременно исследуемых образцов. Белки, содержащиеся во внутреннем контрольном образце, метят с помощью Cyanine2, а белки, содержащиеся в двух сравниваемых образцах, — с помощью Cyanine3 или Cyanine5 (эти два красителя взаимозаменяемы).

Реагенты, входящие в состав набора 3Dye, поставляются предварительно отмеренными, в упаковках по 5, 10 и 25 нмоль. Красители находятся в лиофилизированном виде для продления их срока годности. Перед использованием к красителю необходимо добавить диметилформамид (DMF). Качество DMF оказывает большое влияние на результаты эксперимента и срок годности продукта. DMF входит в состав набора реагентов.

Приготовление образцов для протеомного анализа — это самая сложная часть эксперимента. Поскольку различные исходные биоматериалы требуют различных способов лизиса, их описание находится за рамками настоящего протокола, однако отметим, что для получения достоверных результатов анализа важно соблюдение идентичных условий лизиса сравниваемых образцов. При этом рекомендуется использовать лизирующий буфер, содержащий CHAPS.

Для мечения белков, содержащихся в сравниваемых образцах, можно использовать следующий протокол:

1. Приготовьте 1 мМ исходный раствор каждого красителя путем добавления к нему DMF (из набора реагентов) из расчета 1 мкл DMF на 1 нмоль красителя. Полученные растворы сохраняют стабильность в течение трех месяцев при -20°C . Чтобы обеспечить этот срок хранения, перед открытием пробирки необходимо полностью разморозить и высушить, а перед их закрытием по возможности продуть инертным газом.
2. Доведите pH белковой смеси в исследуемых образцах до 8,5 с помощью буфера, не содержащего амины (гидрокарбонатного, ацетатного), или Трис-буфера. В отдельных пробирках приготовьте три образца для мечения: (1) первый образец, (2) второй образец и (3) смесь первого и второго образца (внутренний контрольный образец). Оптимальная концентрация белка в образцах составляет 5–10 мг/мл, однако могут быть использованы образцы и с меньшей концентрацией белка, вплоть до 1 мг/мл. Для реакции мечения используйте 50 мкг белка.

3. Приготовьте 0,4 мМ рабочие растворы красителей путем разведения их 1 мМ исходных растворов с помощью DMF.
4. Добавьте 1 мкл рабочего раствора красителя к образцам: раствор Cyanine3 — к первому образцу, раствор Cyanine5 — ко второму образцу (или наоборот), раствор Cyanine2 — к внутреннему контрольному образцу. Перемешайте реакционную смесь пипетированием и оставьте на 30 мин в темноте.
5. Остановите реакцию путем добавления в каждую реакционную смесь 1 мкл 10 мМ раствора лизина (не входит в набор реагентов, но легко доступен).
6. Смешайте все три образца и проведите двумерный разностный электрофорез белков.
7. Измерьте интенсивность флуоресценции с помощью любого сканера для флуоресцентного анализа гелей, способного обнаруживать Cyanine2, Cyanine3 и Cyanine5. Белковые пятна могут быть вырезаны из геля для последующего масс-спектрометрического анализа.

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