

Окрашивание белковых гелей с помощью ProteOrange

Краситель ProteOrange позволяет легко и быстро визуализировать белки после электрофореза в полиакриламидном геле. Представляет собой флуорофор стильбенового типа, содержащий цвиттер-ионный фрагмент. Краситель селективно связывается с мицеллой белок-додецилсульфат натрия (минимальная молекулярная масса белка, хорошо окрашиваемого ProteOrange, - около 6 кДа) в присутствии нуклеиновых кислот, полисахаридов и других молекул. При этом при окраске сохраняется линейный диапазон (3 порядка) зависимости флуоресценции от концентрации белка.

Окрашивание гелей ProteOrange приблизительно на порядок чувствительнее, чем окрашивание с помощью кумасси, хотя и менее чувствительно, чем окрашивание серебром, и позволяет детектировать около 3 нг белка на полоску (для кумасси предел детекции 30 нг, для окрашивания серебром - 0,5 нг). Однако по сравнению с серебряным окрашиванием протокол ProteOrange значительно менее трудоемок: гель не требует подготовки, а именно промывки и фиксации (в случае стандартного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS). Достаточно 30-60 мин инкубировать его в водном растворе 7.5% уксусной кислоты, содержащем краситель, после чего промыть в течение 30 секунд водным раствором уксусной кислоты без красителя той же концентрации. Визуализацию можно проводить на трансиллюминаторе с длиной волны 312-365 нм. Хранить краситель ProteOrange необходимо в темноте при комнатной температуре.

Стандартный протокол

1. Убедитесь, что в растворе красителя нет осадка; а если он присутствует, прогрейте реагент при 70°C несколько минут до его полного растворения, после чего перемешайте.
2. Приготовьте необходимой объем рабочего раствора красителя исходя из размеров геля и ванночки для окрашивания. Для геля размером 10x15 см достаточно 25 мл раствора. Чтобы приготовить этот раствор, смешайте 1.88 мл ледяной уксусной кислоты, 23 мл воды для приготовления 7.5% уксусной кислоты, и добавьте 5 мкл 5000x раствора ProteOrange. Перемешайте, используйте в течение 3 часов (хранить раствор следует в темноте).
3. После электрофореза поместите гель в ванночку, залейте его рабочим раствором красителя, инкубируйте 20-60 мин в темноте (меньшее время используется для более тонкого геля или геля с меньшей процентностью; для 15% геля 1 мм толщиной оптимально окрашивание в течение 60 мин). Не используйте рабочий раствор красителя повторно, это может привести к снижению чувствительности.
4. Промойте гель в 7,5% растворе уксусной кислоты в течение 30 сек. Гель готов для визуализации.
5. Поместите гель на трансиллюминатор.
6. Гель может быть отмыт от краски при инкубации 10-12 часов в 0,1% растворе Tween 20 или несколькими последовательными отмывками в 7,5% растворе уксусной кислоты.

Примечания

- Для большей чувствительности рекомендуется проводить электрофорез с добавлением в буфер TGB не 0,1% SDS, а 0,05%. Такое изменение концентрации SDS не сказывается на подвижности белков, но позволяет сократить время окрашивания.
- Не фиксируйте гель перед окрашиванием в растворах, содержащих метанол или этанол.
- Для небольших белков или гелей с низкой процентностью рекомендуется 10% раствор уксусной кислоты.
- Не подходит для окрашивания белка на мембране.
- Если планируется использовать гель для вестерн-блоттинга, окрашивание ProteOrange может быть проведено в стандартном буфере переноса, однако это приведет к снижению чувствительности.
- Если вы используете гели с Тритоном X-100, необходимо после электрофореза промыть гель 3x20 мин в буфере TGB без Тритона X100, а затем инкубировать гель в буфере TGB с добавлением 0,05% SDS в течение 30 мин.
- Если белки окрашиваются не после, а в ходе электрофореза, то ProteOrange должен быть растворен в верхнем (катодном) буфере. После электрофореза гель должен быть 30 мин инкубирован в 7,5% растворе уксусной кислоты для снижения фонового уровня флуоресценции.
- Окраска гелей без SDS возможна, но метод становится менее чувствителен, и чувствительность в значительной степени становится зависимой от аминокислотного состава белков. Если нет необходимости в сохранении нативности молекул белков после электрофореза, гель инкубируется в буфере с 0,05% SDS и окрашивается по стандартному протоколу.
- Окрашенные маркеры молекулярных масс белков, как правило, не флуоресцируют после окрашивания ProteOrange. Используйте только неокрашенные маркеры.
- После окрашивания ProteOrange гель также может быть окрашен кумасси или серебром.