

Genaxxon BioScience

N-terminal Protein Sequencing Service

fon:
 +49 (0)7357 - 91 63 77
 fax:
 +49 (0)7357 - 91 63 78
 eMail:
 info@genaxxon.com
 internet:
 www.genaxxon.com

Product	Cat#	Package size
Automated Edman Degradation of Protein/Peptide	P2047.0000	Set-up
Subsequent Degradation steps	P2048.0000	step
Chemical or enzymatic cleavage of protein sample in solution	P2049.0000	Set-up
Proteolytic cleavage of protein/peptid sample	P2050.0000	Set-up
Fractionation of degradation peptides by HPLC	P2051.0000	Set-up
Insufficient sample amount (set-up fee)	P2053.0000	Set-up

Product description

For being able to N-terminal sequence customers proteins or peptides Genaxxon needs lyophilized samples, in solution or blotted on PVDF membrane (blotting can be provided by Genaxxon as fee-for-service). Proteins and peptides can be sequenced five to ca. 40 steps depending on sample amount, amino acid sequence and customer's requirements.

As result customer will receive a report of the N-terminal sequence analysis with the detected amino acid sequence and all HPLC chromatograms as a PDF file by email or as printed version.

Application area for protein sequencing

- * Determination the N-terminal amino acids of a protein
- * Determination the N-terminal amino acids of a peptide
- * Check of the correct translation of a recombinant protein
- * Check of the sequence and purity of a recombinant protein
- * Check of the sequence and purity of a synthetic peptide
- * Determination of complete protein sequence in combination with additional methods
- * Quality control

How to order

Please contact us at first. We can give you some helpful information and clarify open question points. Then ship sample together with additional information (as clarified before) to us.

Prices N-terminal sequencing

Service - N-terminal protein and peptide sequencing	Net Preis (without VAT)
Basic service (Set-up with first 5 amino acid sequencing steps)	367.50 Euro
Set-up of analysis / minimal price (e.g. if no sequence was detected due to N-terminal blockage)	273.00 Euro
each additional sequencing step	52.50 Euro
Discount for at least 10 protein/peptide samples	10 %
Extra charge for Express Service (The analysis will be performed within 3-7 days after arrival of sample. Please contact us at first!)	50% extra charge to the basic service (incl. 5 steps); 25% extra charge for each additional sequencing step

Sample Requirements

Amount		Min. 20pmol. Smaller amounts are only accepted after detailed discussion!
Sample type		<ol style="list-style-type: none"> 1. lyophilized protein/peptide samples 2. liquid protein/peptide sample in 10-100µL volatile solvent like Milli-Q water, isopropanol, acetonitrile. The sample have to be shipped in frozen state! 3. Protein samples blotted on PVDF membrane (PVDF membrane size: max. 3x6 mm, smaller and more concentrated sample are preferred. The protein band can be stained by Ponceau S, Amino black, Sulforhodamine or Coomassie Brilliant Blue.
Purity		The sample should be as pure as possible (at least 75-80% purity) and contain only the protein or peptide. Free amino acid, primary amines, SDS, salt, buffer or other contaminants should be as low as possible since the Edman chemistry can be negatively affected.
Cysteine modifikation		Cysteine without special modification can not be detected by N-terminal sequencing. Therefore the sample has to be modified for detection of cysteine. Below you can find a modification protocol.
N-terminal blockage		Proteins and peptides which are N-terminally blocked do not have a free N-terminal amino group. Therefore these proteins can not be sequenced. More than 50% of all eukaryont proteins are blocked. On request we can perform deblocking procedures but we need a significant higher amount of protein and the deblocking does not work always, because mostly the type of blockage is unknown.
Glycosilation and other modifications		Edman sequencing steps without the detection of a PTH amino acid, reduced peak intensity or altered retention times can be caused by glycosilation, phosphorylation or other modifications. By mass spectrometry the modification can be analyzed.

Details for sample shipping to Genaxxon

- * Support Genaxxon with information about the sample (e.g. sample name, sample type, MW, protein amount, staining method) and the requested number of N-terminal sequencing steps. Sign details.
- * Send us an email or call us before shipping the samples
- * The samples should be in a reaction tube sealed by Parafilm. Protein samples on PVDF membrane can either be shipped as small and dry membrane slides in reaction tubes or as a dried PVDF membrane in plastic foil with enclosed description of the protein bands which should be analysed. We cut the marked protein band for analysis.
- * Liquid samples should be sent in frozen state for precaution.
- * Lyophilized sample and samples blotted on PVDF membrane can typically shipped at room temperature.
- * Please, send your samples in a padded envelope or in a box together with the Edman protein sequencing details.

Our Recommendation for Protein Blotting

Semidry PVDF Blotting Protocol

We recommend the following protocol for semidry blotting on PVDF membrane:

- PVDF membrane: Immobilon P membrane or comparable
- Blot buffer: 50 mM sodium borate, pH 9.0 / 20% methanol (HPLC quality)
(0.1% SDS can be added to blotting buffer if protein above 40kDa should be sequenced)
- Blotting condition: 1mA/cm1 PVDF membrane for 2-3 hours at 4°C

Protein staining of PVDF membranes

Ponceau Red Staining

Staining solution (0.5% Ponceau S, 1% acetic acid in Milli-Q water):

- 0.25g Ponceau S
- 0.5mL acetic acid
- ad 50mL Milli-Q water

Procedure:

1. Wash the PVDF blot membrane 2 x 3 minutes with plenty Milli-Q water.
2. Stain the PVDF membrane with Ponceau S staining solution for 1-3 minutes.
3. Destain the PVDF blot membrane under visual control with Milli-Q water until protein bands are well visible.
4. Dry the PVDF membrane.

Sulforhodamine Staining

Staining solution (0.005% sulforhodamine, 0.2% acetic acid, 30% methanol in Milli-Q water):

- 150mL methanol
- 1mL acetic acid
- 25mg sulforhodamine
- ad 500mL Milli-Q water

Procedure:

1. Wash the PVDF blot membrane 2 x 10 minutes with plenty Milli-Q water.
2. Dry the PVDF membrane at room temperature!
3. Stain the PVDF membrane in Sulforhodamine staining solution for 1-2 minutes.
4. Wash the PVDF membrane with Milli-Q water shortly.
5. Dry the PVDF membrane.

Coomassie Blue R250 Staining

Staining solution (0.1% CBB R250, 10% acetic acid, 40% methanol in Milli-Q water):

- 0.1g CBB R250
- 40mL methanol
- 10mL acetic acid
- ad 100mL in Milli-Q water

Destaining solution (10% acetic acid, 40% methanol in Milli-Q water):

- 40mL methanol
- 10mL acetic acid
- ad 100mL Milli-Q water

Procedure:

1. Stain the PVDF blot membrane for 5 minutes in CBB R250 staining solution
2. Destain the PVDF blot membrane for 3 x 5 minutes with destaining solution under visual control until protein bands are well visible.
3. Dry the PVDF membrane.

Genaxxon BioScience

N-terminaler Proteinsequenzierungsservice

fon:
 +49 (0)7357 - 91 63 77
 fax:
 +49 (0)7357 - 91 63 78
 eMail:
 info@genaxxon.com
 internet:
 www.genaxxon.com

Product	Cat#	Package size
Automatisierter Edman-Abbau der Proteine/Peptide	P2047.0000	Set-up
Nachfolgende Sequenzierungsschritte	P2048.0000	step
Chemisch oder enzymatischer Verdau von Protein/Peptidproben in Lösung.	P2049.0000	Set-up
Proteolytischer Verdau von Protein/Peptidproben	P2050.0000	Set-up
Auftrennung der durch Verdau entstandenen Peptide mittels HPLC	P2051.0000	Set-up
Set-up Gebühr bei ungenügender Probenmenge	P2053.0000	Set-up

Servicebeschreibung

Um Proteine N-terminal sequenzieren zu können, werden die Proben lyophilisiert, flüssig (in Puffer oder Wasser) oder auf PVDF-Membranen gebunden benötigt. Je nach Menge an Protein und Peptid und Anforderung können typischerweise 5 bis 40 Aminosäurereste durch N-terminale Sequenzierung bestimmt werden.

Als Ergebnis erhalten unsere Kunden einen Proteinsequenzierungsreport mit Angabe der detektierten Aminosäure-Sequenz und die zugehörigen HPLC-Chromatogramme in elektronischer Form per email oder in gedruckter Version.

Anwendungsbereich N-terminale Proteinsequenzierung

- * Bestimmung des N-Terminus eines Proteins
- * Bestimmung des N-Terminus eines Peptids
- * Kontrolle der korrekten Translation eines rekombinanten Proteins
- * Kontrolle der Sequenz und Reinheit eines synthetischen Peptides
- * Kontrolle der Sequenz und Reinheit eines Proteins
- * Komplettssequenzierung eines Proteins in Kombination mit weiteren Methoden
- * Qualitätskontrolle

Wie wird ein Auftrag vergeben?

Bitte kontaktieren Sie zuerst Genaxxon. Wir können Ihnen hilfreiche Informationen geben und offene Punkte klären. Danach können die Proben zusammen mit zusätzlicher Information (wie im Vorfeld besprochen) verschickt werden.

Preise für die N-terminals Sequenzierung

Service - N-terminale Protein- und Peptidsequenzierung	Nettopreis (ohne MWSt.)
Basis-Paket N-terminale Protein/Peptid-Sequenzierung mit 5 Schritten inkl. Set-up	367,50 Euro
Set-up der Analyse / Mindestpreis (z.B. wenn keine Sequenz aufgrund N-terminaler Blockierung ermittelt werden konnte)	273,00 Euro
Jeder zusätzlicher Sequenzierungsschritt	52,50 Euro
Rabatt bei 10 oder mehr Protein/Peptidproben	10 %
Preiszuschlag für Express-Service (Die Analyse wird innerhalb von 3-7 Tagen nach Probenzustellung durchgeführt - Anfrage erforderlich!)	50% Preiszuschlag auf Basis-Paket bzw. Set-up N-terminale Sequenzierung; 25% Preiszuschlag auf jeden zusätzlichen Sequenzierungsschritt

Anforderungen an die Protein- oder Peptidproben

Probenmenge		mind. 20pmol, geringere Mengen werden nur nach Rücksprache akzeptiert!
Probenform		<ol style="list-style-type: none"> 1. Lyophilisierte Protein/Peptid Proben 2. Flüssige Protein/Peptid Proben in 10-100µL flüchtigem Lösungsmittel wie Wasser, (Iso-)Propanol, Acetonitril. Die Proben muss (sollte) gefroren verschickt werden! 3. Auf PVDF-Membran geblottete Proteinprobe (Proteinbandengröße: max. 3x6 mm, (besser kleiner und konzentrierter). Die Proteinbande kann mit Ponceau S, Amino black, Sulforhodamin oder Coomassie Brilliant Blue angefärbt sein.
Reinheit		Die Probe sollte so rein wie möglich sein (>75-80% Reinheit) und nur ein Protein oder Peptid enthalten. Freie Aminosäuren, primäre Amine, SDS, Salze, Buffer und andere Kontaminaten sollten möglichst von der Proteinprobe entfernt sein, da diese Verunreinigungen die Edmanchemie und Detektion der PTH-Aminosäuren negative beeinflussen und das Analysengerät kontaminieren können.
Cystein Modifikation		Nicht modifiziertes Cystein kann bei der N-terminalen Sequenzierung nicht detektiert werden. Deshalb muss die Probe im Vorfeld modifiziert werden, wenn Sie den Nachweis von Cystein wünschen. Eine Modifikationsprozedur ist unten beschrieben.
N-terminale Blockierung		Proteine und Peptide, die N-terminal blockiert sind, verfügen über keine freie N-terminal Aminogruppe und können deshalb nicht sequenziert werden. Dies trifft auf über 50% aller eukaryontischen Proteine zu. Auf Anfrage können wir Deblockierungsmethoden einsetzen, die jedoch eine signifikant höhere Proteinmenge erfordern und nicht in jedem Fall funktionieren, da die Art der Blockierung oft nicht bekannt ist.
Glykosilierungen und andere Modifikationen		Edman Sequenzierzyklen ohne Detektion einer PTH-Aminosäure, reduzierte Peakintensitäten und veränderte Retentionszeiten können auf glykosilierte, phosphorylierte oder anders modifizierte Aminosäuren zurückgehen und eine Identifikation der jeweiligen Aminosäure unmöglich machen.

Hinweise zum Versand der Proben an Genaxxon

- * Bitte geben Sie alle notwendigen Informationen zu den Proben (z.B. Probenname, Probentyp, MW, Proteinmenge, Färbemethode) an Genaxxon. Bitte geben Sie auch die gewünschte Menge an Sequenzierschritten an. Bitte unterschreiben Sie die Angaben.
- * Informieren Sie uns per email oder telephonisch, dass (wann) Sie Ihre Proben an uns schicken
- * Verpacken Sie Ihre Proben in Reaktionsgefäßen, die Sie mit Parafilm umwickeln. Proteinproben auf PVDF-Membran können Sie entweder als ausgeschnittene und trockene PVDF-Proteinbande im Reaktionsgefäß an uns schicken oder als getrocknete angefärbte PVDF-Membran in einer Plastikhülle mit beiliegender Beschreibung/Beschriftung der zu analysierenden Proteinbande. Wir schneiden dann die gekennzeichnete Proteinbande für die Analyse aus.
- * Flüssige Proben versenden Sie am sichersten im gefrorenen Zustand.
- * Lyophilisierte und auf PVDF-Membran geblottete Proben können Sie normalerweise bei Raumtemperatur verschicken.
- * Schicken Sie bitte Ihre Proben in einem wattierten Briefumschlag oder einem Päckchen zusammen mit dem Probendetails an uns.

Unsere Empfehlung zum Proteinblotting

Semidry PVDF-Blotting Protokoll

Wir empfehlen folgendes Protokoll für das Semidry Blotting auf PVDF-Membranen:

- PVDF-Membran: Immobilon P Membran
- Blot-Puffer: 50 mM Natriumborat, pH 9,0 / 20% Methanol (HPLC Qualität)
(0,1% SDS kann zum Blot-Puffer zugesetzt werden, wenn ein Protein, das über 40kDa groß ist, geblottet werden sollen.)
- Blotbedingungen: 1mA/cm² PVDF Membran für 2-3 Stunden bei 4°C

Proteinfärbung von PVDF-Membranen

Ponceau Rot Färbung

Färbelösung (0,5% Ponceau S, 1% Essigsäure in bidest. Wasser):

- 0,25g Ponceau S
- 0,5mL Essigsäure
- ad 50mL mit bidest. Wasser

Durchführung:

1. Der Blot wird nach dem Blotten 2 x 3 min mit reichlich bidest. Wasser gewaschen.
2. Die Ponceau-Färbung wird ca. 1-3 Minuten mit Färbelösung durchgeführt.
3. Das Entfärben wird unter visueller Kontrolle mit bidest. Wasser durchgeführt bis Proteinbanden gut sichtbar werden.
4. PVDF-Membran trocknen.

Sulforhodamin Färbung

Färbelösung (0,005% Sulforhodamin, 0,2% Essigsäure, 30% Methanol in bidest. Wasser):

- 150mL Methanol
- 1mL Essigsäure
- 25mg Sulforhodamin
- ad 500mL mit bidest. Wasser

Durchführung:

1. Der PVDF-Blot wird nach dem Blotten 2 x 10 min mit reichlich bidest. Wasser gewaschen.
2. Die PVDF-Membran vollständig trocknen!
3. Membran 1-2 min in Färbelösung schwenken
4. Gefärbte Membran kurz in bidest. Wasser waschen.
5. Membran trocknen.

Coomassie Blue R250 Färbung

Färbelösung (0,1% CBB R250, 10% Essigsäure, 40% Methanol in bidest. Wasser):

- 0,1g CBB R250
- 40mL Methanol
- 10mL Essigsäure
- ad 100mL mit bidest. Wasser

Entfärbelösung (10% Essigsäure, 40% Methanol in bidest. Wasser):

- 40mL Methanol
- 10mL Essigsäure
- ad 100mL mit bidest. Wasser

Durchführung:

1. PVDF-Blot 5 min in Färbelösung schwenken
2. PVDF-Blot 3 x 5min in Entfärbelösung unter visueller Kontrolle schwenken, bis Proteinbanden gut zu erkennen sind und die Membran ausreichend entfärbt ist
3. PVDF-Membran trocknen