

## Produktinformation

# Smart Protein Layers SPL Kit Red

Product no. PR913, PR926

NH DyeAGNOSTICS GmbH  
Weinbergweg 23  
D-06120 Halle

Technical Support  
Fon: +49 (0) 345-2799 6413  
e-mail: service@dyeagnostics.com  
www.dyeagnostics.com

copyright © NH DyeAGNOSTICS © 2018  
Rev. 03/2018 (1)

FOR RESEARCH USE ONLY

## 1 Produkte und Inhalt

	SPL Kit Red 20W	SPL Kit Red 40W
Produkt-Nr.	PR913	PR926
Smart Label Red Reagent A*	1x 200 Rcts	2x 200 Rcts
Smart Label Red Reagent B*	1x 200 Rcts	2x 200 Rcts
SPL Buffer	1x	2x
SPL Smartalyzer basic blue size S (SMA; 25 kDa)	1x	2x
SPL Smartalyzer basic blue size L (SMA; 80 kDa)	1x	2x
SPL Calibrator A (CAL A)**	1x	2x
SPL Calibrator B***	3x	6x

\* entspricht 20 bzw. 2x20 Minigel Western Blots oder 200 Smart Label Reaktionen von bis zu 100 µg Protein pro Probe

\*\* für den Experiment-zu-Experiment-Vergleich

\*\*\* Antikörper (AK)-spezifischer SPL Calibrator B (CAL B) für den Experiment-zu-Experiment-Vergleich von AK-Signalen (Mouse, Rabbit und Goat; für 20 Minigel Western Blots)

## 2 Lagerung und Haltbarkeit

Lagern Sie alle Kit-Komponenten bei: -20°C bis -80°C

Lagern Sie die Smart Label Working Solution bei:  
-20°C bis -80°C

Mind. haltbar bis: Siehe Aufdruck Kitverpackung

Die Smart Label Working Solution ist mindestens 6 Monate haltbar.

## 3 Gefahrenhinweis

Smart Label Reagent B enthält Dimethylformamid (DMF, CAS No: 68-12-2) und ist beim Einatmen, beim Verschlucken oder bei Hautkontakt gesundheitsschädlich.

## 4 Sie benötigen zusätzlich:

- DTT (pro Kit: ca. 500 µl einer 60 mM DTT Lösung)
- Gelelektrophorese-System
- niedrig-fluoreszierende Blotting Membran (Produkt-Nr.: PR811, PR812), Blotting-Apperatur und -Zubehör
- primären und sekundären Antikörper (sowie Blockierungs- und Waschlösungen für das Western Blotting)
- Nachweis sekundärer AK: z.B. konjugiert mit HRP und Immuno Blue (PR840)
- Imaging-System zur Detektion roter und blauer Fluoreszenz

## 5 Einführung

Smart Protein Layers (SPL) ist eine Technologie für die färbungs-freie, quantitative Analyse von 1D-Proteingelen und Western Blots.

Die SPL Technologie basiert auf der einfachen und sensitiven Fluoreszenz-Markierung von Proteinen unter Zugabe eines fluo-reszierenden Standards.

Die SPL Technologie bietet:

- quantitative Kontrolle und ggf. Normalisierung der Probenvorbe-reitung und Gelbeladung,
- gleichmäßige Visualisierung und ggf. Normalisierung von Gesam-protein mittels Smart Label,
- Proben-übergreifende Normalisierung des Antikörper-Signals zum Nachweis des Targetproteins (basierend auf Gesamtprotein) und

- Experiment-übergreifende Normalisierung von Gesamt- und Targetprotein.

Die SPL Technologie besteht aus drei Komponenten:

### Smart Label (Protein-Markierung)

Die einfach durchzuführende Fluoreszenz-Markierung einer Proteinprobe mit Smart Labels ermöglicht die schnelle, sensitive und quantitative Visualisierung von Gesamtprotein direkt im Gel. Nach Transfer auf eine Membran für Western Blot Analysen können die Proteine zu jedem Zeitpunkt mit hoher Sensitivität (weniger als 1 ng) und einem dynamischen Bereich von 4-5 Größenordnungen detektiert werden. Smart Label sind kompatibel mit Western Blot Analysen und ermöglichen eine zeitgleiche Proben-übergreifenden Normalisierung des Targetproteins (AK-Nachweis) auf das Gesamtprotein.

### SPL Smartalyzer (Probenstandard)

Jeder Proteinprobe wird vor der Markierung mit Smart Label ein fluoreszierender Standard (Smartalyzer basic kurz: SMA basic) zugegeben. Der Probenstandard SMA basic ist ein fluoreszierendes Polypeptid (erhältlich in 2 verschiedenen Molekulargewichten (MW) size S = 12,5 kDa und size L = 80 kDa), welches durch die Markierung zusammen mit dem Probenprotein in einer zweiten Farbe fluoresziert (SMA label). Die zweifache Fluoreszenz des SMA (basic color und label color) stellt eine eindeutige Beziehung zwischen der Proteinprobe und Ihrem Probenstandard her und ermöglicht präzise Experiment-interne sowie -externe Normalisierungen und Quantifizierungen.

### SPL Calibrator (MW Leiter und Exp.-zu-Exp.-Vergleiche)

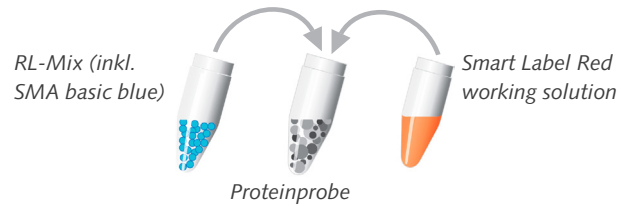
Der SPL Calibrator (CAL) dient nicht nur als fluoreszierender MW-Marker, sondern ermöglicht auch den direkten Vergleich verschiedener Experimente (Gele oder Western Blots). CAL besteht aus drei Polypeptiden unterschiedlicher Größe und Menge (rot und blau fluoreszierend; CAL A) sowie einem nicht-fluoreszierenden Polypeptid (das spezifisch mit dem sekundären Antikörper reagieren; CAL B) und wird jedem Gel in definierter Menge zugegeben.

## 6 Durchführung einer SPL Analyse

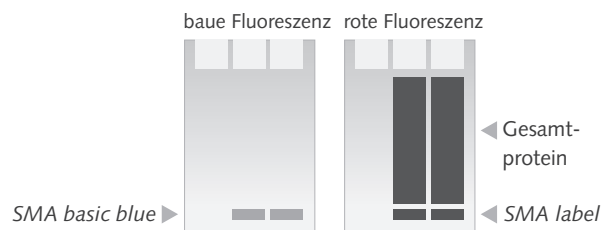
Stellen Sie vor Beginn der Arbeiten sicher, dass alle benötigten Reagentien und Materialien einsatzbereit sind.

## Übersicht Workflow SPL-Analyse

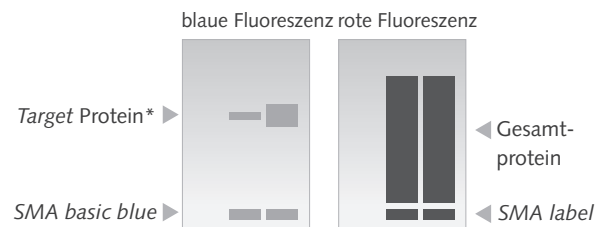
- 1 Zugabe reaction & loading (RL)-Mix (inkl. SMA) & Smart Label



- 2 Gelelektrophorese und Fluoreszenz-Detektion



- 3 Western Blot Analyse und Fluoreszenz-Detektion Target Protein (z.B. blau) und Gesamtprotein (rot)



\*Nachweis unter Verwendung eines HRP-konjugiertem AK und Immuno Blue

- 4 Datenprozessierung und Auswertung

- Detektion und Volumenbestimmung von Spuren und Banden
- Normalisierung der Gelbeladung basierend auf SMA basic
- Normalisierung der Labelingeffizienz basierend auf SMA label
- Normalisierung des Target basierend auf Gesamtprotein
- Experiment zu Experiment Normalisierung basierend auf CAL

## 6.1 Probenvorbereitung und Smart Labeling von Proteinproben

### 6.1.1 Herstellung der Smart Label Working Solution (bei der ersten Anwendung)

- Lassen Sie Smart Label Reagent A und Smart Label Reagent B bis auf Raumtemperatur erwärmen. Smart Label Reagent B enthält Molsiebe um Verunreinigungen mit Wasser zu verhindern.
- Zentrifugieren Sie kurz.
- Zum Lösen des Smart Label entnehmen Sie 15 µl aus Smart Label Reagent B und überführen diese in Smart Label Reagent A, mischen und zentrifugieren Sie kurz.
- Überführen Sie alle Flüssigkeit aus Smart Label Reagent A in Smart Label Reagent B, mischen und zentrifugieren Sie kurz.

*Beachten Sie: Schritt 4 garantiert die optimale Haltbarkeit der Smart Label Working Solution von bis zu 6 Monaten.*

Smart Label Reagent B enthält nun die fertige Smart Label Working Solution und kann verwendet werden.

Lagern Sie nicht verwendete Smart Label Working Solution bis zu 6 Monate bei -20°C bis -80°C.

### 6.1.2 Vorbereitung des SPL Reaction & Loading Mix (RL-Mix)

Mischen Sie für den RL-Mix pro Probe

6 µl SPL Buffer,  
2 µl 60 mM DTT (frisch hergestellt) und  
2 µl SMA basic Size S oder L

und zentrifugieren Sie kurz. Der RL-Mix ist nun einsatzbereit.

*Hinweis: Wir empfehlen die Herstellung des RL-Mix als Mastermix:  $n$  Proteinproben =  $n \times$  Mastermix.*

*Hinweis: Der SPL Buffer enthält SDS, das während des Einfrierens ausfallen kann. Lassen Sie den SPL Buffer sich bis auf Raumtemperatur erwärmen und mischen Sie bis sich das SDS wieder vollständig gelöst hat. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Puffers.*

### 6.1.3 Labeling und Denaturieren der Proteinproben

- Überführen Sie 10 µl Ihrer Proteinprobe ( max. 100 µg Protein) in ein frisches Reaktionsgefäß.

*Hinweis: Sollten Sie mehr als 10 µl bzw. 100 µg Protein labeln wollen, vervielfachen Sie den Ansatz entsprechend.*

- Geben Sie 10 µl RL-Mix (siehe Punkt 1b) zu Ihrer Proteinprobe und mischen Sie kurz.
- Geben Sie 1 µl Smart Label Working Solution zu Ihrem Ansatz, mischen und zentrifugieren Sie kurz.
- Denaturieren Sie Ihren Ansatz 5 min bei 95°C.

Die Proben sind nun mit Smart Label markiert und bereit für die elektrophoretische Auftrennung. Sie können direkt auf ein 1D-SDS-Gel aufgetragen werden.

*Hinweis zur Kompatibilität der Proteinproben: Smart Label sind mit allen herkömmlichen Puffersystemen kompatibel. Beachten Sie jedoch, dass Ihre Probe nicht mehr als 400 mM Amine oder Ammonium-Salze enthalten sollte.*

*Hinweis zur Auswahl der geeigneten Größe (Molekulargewicht) des SMA basic (size S oder L): Verwenden Sie für Gele < 15% AA/BisAA SMA basic size L und für Gele > 15% AA/BisAA SMA basic size S. Beachten Sie: SMA basic sollte sich in der Größe von der des Targetproteins sowie hoch-abundanten Proteinen innerhalb Ihrer Proben unterscheiden.*

### 6.1.4 Verwendung und Vorbereitung des CAL

Für die Verwendung des CAL als MW-Marker und für den Experiment-zu-Experiment-Vergleich siehe Anhang A.

## 6.2 Gelelektrophorese und Fluoreszenz-Detektion

### 6.2.1 Gelelektrophorese

- Tragen Sie 12 µl des vorbereiteten CAL auf jedes Gel auf (siehe Anhang A).
- Tragen Sie Ihre vorbereiteten Proteinproben auf.
- Führen Sie die Gelelektrophorese wie gewohnt durch.

*Beachten Sie, dass Sie auf jedes Gel das gleiche Volumen CAL auftragen.*

*Beachten Sie, dass das MW des SMA basic size S nur 12,5 kDa beträgt und sich je nach Prozentigkeit des Gels kurz oberhalb der Bromphenolblau (BPB)-Lauffront befindet. Um sicher zu stellen, dass SMA basic size S das Gel nicht verlässt, stoppen Sie die Elektrophorese kurz bevor die BPB-Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht und entfernen Sie diese anschließend manuell vom Gel (da die Lauffront das Fluoreszenz-Imaging beeinflussen kann).*

### 6.2.2 Imaging nach Gellauf

Imagen Sie die Gele direkt nach dem Gellauf mittels Fluoreszenz-imaging. Dafür sind keine weiteren Fixier- oder Färbungsschritte notwendig.

Detektieren Sie unbedingt die Fluoreszenz des Gesamtproteins und die Fluoreszenz des SMA basic im Gel. Dies ist wichtig für die korrekte Normalisierung von Beladung, Proteinkonzentration und Labeleffizienz.

SMA basic: blue  
Gesamtprotein (inkl. SMA label): red

Optimieren Sie die Belichtungszeiten bzw. die Einstellungen des Photomultipliers nicht an den CAL-Banden, sondern am stärksten Banden-Signal innerhalb Ihrer Proben (inkl. SMA).

Fluoreszenz-Anregungs- und Emissions-Eigenschaften:

	max. Anregung [nm]	max. Emission [nm]
Blue	496	520
Red	650	665

*Hinweis: Für eine einfache Weiterverarbeitung der Daten, benennen Sie Ihre Fluoreszenz-Aufnahmen wie in Anhang B.1 (Datenprozessierung und Auswertung) beschrieben.*

*Hinweise für post-elektrophoretische Anwendungen: Siehe Anhang C*

### 6.3 Western Blot Analyse und Fluoreszenz-Detektion

Verwenden Sie eine niedrig-fluoreszierende Blotting Membran (Nitrocellulose (PR811) oder PVDF (PR818)).

#### 6.3.1 Proteintransfer

Führen Sie den Proteintransfer wie gewohnt durch und (optional) kontrollieren Sie den Transfer durch Fluoreszenz-Imaging des SPL gelabelten Gesamtproteins (siehe Schritt 2b).

#### 6.3.2 Nachweis und Detektion des Targetproteins

Führen Sie die Western Blotting Prozedur wie gewohnt durch. Detektieren Sie die Fluoreszenz des SPL gelabelten Gesamtproteins (siehe Schritt 2b) und Ihr AK-Signal.

Optimieren Sie die Belichtungszeiten bzw. die Einstellungen des Photomultipliers nicht an der CAL Spur, sondern am stärksten Signal innerhalb Ihrer Proben (inkl. SMA) bzw. am stärksten AK-Signal innerhalb Ihrer Proben.

*Hinweis: Für eine einfache Weiterverarbeitung der Daten, benennen Sie Ihre Fluoreszenz-Aufnahmen wie in Anhang B.1 (Datenprozessierung und Auswertung) beschrieben.*

*Hinweis: Sollte die Detektion von SMA basic und Target im gleichen Fluoreszenzkanal erfolgen (z.B. SMA basic infrarot und Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper in infrarot) kann die hohe Signalstärke von SMA basic u.U. die Targetdetektion behindern. Wir empfehlen in dieser Konstellation die SMA basic Banden vor der Detektion des Targets abzuschneiden. Der SMA ist nur auf den Gel-Bildern für die Normalisierung nötig und wird nach dem Blotten nicht mehr gebraucht.*

## 6.4 Datenprozessierung und Datenauswertung

Siehe Anhang B

## Anhang A

### Verwendung des Calibrators (CAL)

Der Calibrator (CAL) fungiert zum Einen als fluoreszierender Molekulargewichts-Marker. Zum Zweiten ermöglicht CAL Ihnen den Experiment-zu-Experiment-Vergleich von Fluoreszenz- und Antikörper-Signalen.

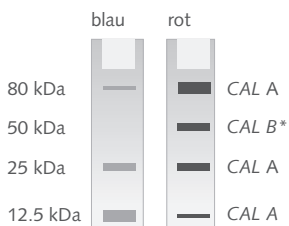
CAL A besteht aus jeweils drei rot- und blau-fluoreszierenden Polypeptiden (12,5 kDa, 25 kDa und 80 kDa) und wird jedem Gel in gleicher Menge zugegeben. Er dient dem Experiment-zu-Experiment-Vergleich der SPL Fluoreszenz-Signale sowie zusätzlich als MW-Marker. Für den Experiment-zu-Experiment-Vergleich benötigen Sie nur eine Bande des CAL A. Die einzelnen Banden haben unterschiedliche Stärken für eine optimale Anpassung an unterschiedlichste Imaging-Parameter (wie Belichtungszeiten).

CAL B besteht aus einem 50 kDa Polypeptid und ist nicht-fluoreszierend. CAL B ist spezifisch auf den sekundären Antikörper (AK) abgestimmt. Bei hoher Sensitivität Ihres sekundären AK kann eine zweite Bande bei 20 kDa detektiert werden. Dieses hat jedoch keinen Einfluß auf die Analyse. CAL B wird jedem Gel zugegeben und dient so dem Experiment-übergreifenden Vergleich von AK-Signalen.

Wählen Sie den passenden CAL B nach dem von Ihnen verwendeten Host-Organismus des primären Antikörpers bzw. der Reaktivität des sekundären Antikörpers z.B.: Bei Verwendung von Anti-Rabbit IgG als sekundären Antikörper nutzen Sie CAL B Rabbit. CAL A und CAL B können in einer Spur kombiniert werden.

Hinweis: Für den Einsatz von CAL aus verschiedenen Chargen steht ein Chargen-abhängiger Normalisierungsfaktor zur Verfügung. So kann auch Chargen-übergreifend ein Experiment-zu-Experiment-Vergleich erfolgen.

Calibrator A und B:



\* Nachweis mittels HRP-konjugiertem AK und Immuno Blue (PR840)

### Vorbereitung und Verwendung des CAL

Wir empfehlen die Vorbereitung des CAL als Mastermix:  
 $n \text{ Gele} = n \times \text{Mastermix}$ .

- Überführen Sie pro Gel 8 µl des CAL A und 2 µl CAL B in ein frisches Reaktionsgefäß.
- Geben Sie pro Gel 2 µl 60 mM DTT (frisch hergestellt) zu und mischen Sie kurz.

- Denaturieren Sie den CAL-Ansatz/-Mastermix für 5 min bei 95°C).
- Der CAL ist nun bereit für die elektrophoretische Auftrennung.
- Tragen Sie pro Gel 12 µl vorbereiteten CAL auf.

*Hinweis: Wir empfehlen die Kompatibilität der eingesetzten Menge des CAL B mit Ihrem zu detektierenden Targetprotein in einem Vorexperiment zu testen:*

*Signalintensität CAL B >> Targetprotein = verringern Sie das einzusetzende Volumen CAL B pro Gel (oder verdünnen Sie CAL B)*

*Signalintensität CAL B << Targetprotein = verwenden Sie mehr CAL B pro Gel*

*Hinweis: Für die Verwendung unterschiedlicher CAL B auf einem Blot, tragen Sie 1 µl von jedem CAL B direkt auf den Blot (vergleichbar mit einem Dot Blot) nach erfolgtem Proteintransfer auf. Beachten Sie, dass Sie CAL B nicht im Bereich Ihrer Spuren befindet. Führen Sie die anschließende Western Blot Analyse wie gewohnt durch.*

## Anhang B

### Datenprozessierung und Datenauswertung mittels LabImage 1D SPL

Der folgende Anhang gibt einen Überblick über die Prozessierung und Auswertung der Daten mittels LabImage 1D SPL Software (Produkt. Nr. PR989). Die Daten können auch unter Verwendung anderer Software prozessiert und ausgewertet werden. Eine ausführliche Beschreibung zur Benutzung von LabImage 1D SPL sowie der einzelnen Normalisierungsschritte finden Sie in der LabImage 1D SPL Produktinformation bzw. der Smart Protein Layers Produktinformation PDF Auswertung und Datenprozessierung (<http://www.dyeagnostics.com/site/products/spl/>).

#### B.1. Benennung der Fluoreszenz-Aufnahmen

Für die SPL Analyse sind vier Fluoreszenz-Aufnahmen entscheidend:

- Gesamtprotein (inkl. SMA label) nach Gellauf (GTO = Gel Totalprotein)
- SMA basic nach Gellauf (GLO = Gel Loading Control)
- Gesamtprotein nach Western Blot Analyse (BTO = Blot Totalprotein)
- Targetprotein nach Western Blot Analyse (BTA = Blot Targetprotein)

Benennen Sie die entstandenen Fluoreszenz-Aufnahmen mit dem entsprechenden Kürzel (GTO, GLO, BTO bzw. BTA) und einem eindeutigen Hinweis auf das jeweilige Experiment (z.B. Datum)

beginnend. Trennen Sie Kürzel, Experiment-Hinweis und weitere Namensteile durch Unterstriche. Dies ermöglicht LabImage 1D SPL eine automatische Zuordnung der Bilder zu den jeweiligen Experimenten sowie die automatische Normalisierung Ihres Targetprotein-Signals.

## B.2. Ermittlung von Spuren und Bandenvolumina

Detektieren Sie Spuren und Banden in Ihren Fluoreszenz-Aufnahmen mittels LabImage 1D SPL oder einer anderen geeigneten Software.

Sie benötigen für die SPL-Analyse folgende Daten:

- Bandenvolumen des SMA basic ermittelt in GLO
- Bandenvolumen SMA label ermittelt in GTO
- Spurvolumen (exkl. Bandenvolumen SMA label) ermittelt in BTO
- Bandenvolumen Targetprotein ermittelt in BTA für Experiment-zu-Experiment-Vergleiche:
- Bandenvolumen CAL ermittelt in den Einzelexperimenten

## B.3. Normalisierung des Targetprotein-Signals

Die LabImage 1D SPL führt die notwendigen Rechenoperationen automatisch aus.

- Öffnen Sie alle zu analysierenden Bilder als eigene Projekte. Stellen Sie sicher, dass die Projekte entsprechend Schritt 1 benannt und Spuren und Banden entsprechend Schritt 2 detektiert wurden.
- Öffnen Sie den Projekt-Comperator. Es werden jeweils der Normalisierungsfaktor (SPL-Faktor) und der normalisierte Wert des Spur- bzw. Bandenvolumens ermittelt (SPL-Wert).

### B.3.1 Normalisierung der Gelbeladung (basierend auf SMA basic):

Bei Zugabe der gleichen Menge SMA basic zu jeder Proteinprobe, geben Unterschiede im Bandenvolumen des SMA basic (in GLO) in den verschiedenen Spuren Aufschluss über mögliche Probenverluste während der Probenvorbereitung oder der Gelbeladung. Der Normalisierungsfaktor für die Beladung (NF Load) wird in GLO ermittelt und auf GTO, BTO und BTA angewendet. Als Referenz dient SMA basic in der ersten Spur (von links) in GLO, in der eine SMA-Bande detektiert/benannt wurde.\*

### B.3.2 Normalisierung Smart Label (basierend auf SMA label)

Da SMA basic zusammen mit jeder Proteinprobe mit dem Smart Label markiert wird, entspricht die Markierungsreaktion von SMA basic der der Proteinprobe. Bei Zugabe der gleichen Menge SMA basic zu jeder Proteinprobe, geben Unterschiede im

Bandenvolumen von SMA label (in GTO) Aufschluss über eventuell ungleichmäßiges Smart Labeling. Der Normalisierungsfaktor für die Labeling-Effizienz (NF Label) wird in GTO ermittelt und auf BTO angewendet. Als Referenz dient SMA label in der ersten Spur (von links) in GTO, in der eine SMA-Bande detektiert/benannt wurde.\*

### B.3.3 Normalisierung des Targetprotein-Signals (basierend auf Gesamtprotein)

Um Schwankungen im Proteingehalt einer Proteinprobe (durch ungenügende oder keine Proteinbestimmung) hinsichtlich des Targetprotein-Signals auszugleichen, verwenden Sie das aufgetragene Gesamtprotein als Grundlage. Der SPL-Faktor wird in BTO ermittelt und auf BTA angewendet. Als Referenz dient die erste Spur (von links), in der eine SMA- bzw. Targetprotein-Bande detektiert/ benannt wurde.\*

*\* Hinweis: Unter dem Button Einstellungen/Settings des SPL-Faktors und der SPL-Werte können Sie manuell eingeben, welche Spur/Bande als Referenz zum Ermitteln der einzelnen Normalisierungsfaktoren verwendet wird und auf welche Projekte dieser angewendet werden soll.*

### B.3.4 Datenausgabe

Alle generierten Daten können als CSV-Datei exportiert werden. Ein Image-Overlay sowie das Datendiagramm können als jpg oder tiff exportiert werden.

## B.4. Experiment-zu-Experiment-Vergleiche

Um Fluoreszenz- oder Targetprotein-Signale auf verschiedenen Gelen/Blots direkt miteinander zu vergleichen, verwenden Sie CAL als Bezugspunkt. Wählen Sie ein Gel/Blot als Referenz.

*Beachten Sie: Verwenden Sie für den Vergleich mehrerer Experimente immer dieselbe der drei möglichen CAL A Banden bzw. die CAL B Bande. Die Signale der verwendeten CAL Bande dürfen in keinem beteiligten Experiment oberhalb der Sättigung liegen, da dies die Ergebnisse verfälschen würde. Verwenden Sie die Bande, die in allen Experimenten detektiert werden kann und nicht gesättigt ist.*

Bestimmen Sie den Normalisierungsfaktor CAL (NF CAL) für jeden gewünschten Fluoreszenz-Kanal:

$$\text{NF CAL Experiment X} = \frac{\text{Bandenvolumen CAL Experiment X}}{\text{Bandenvolumen CAL Referenzexperiment}}$$

Der NF CAL dient nun der Experiment-zu-Experiment-Normalisierung, z.B.:

$$\text{normalisiertes Bandenvolumen Targetprotein Experiment X (Spur Y bis Z)} =$$

$$\frac{\text{Bandenvolumen Targetprotein Experiment X (Spur Y bis Z)}}{\text{NF CAL Targetprotein Experiment X}}$$

*Beachten Sie bei Verwendung verschiedener Chargen CAL den Chargen-abhängigen Normalisierungsfaktor und teilen Sie Ihre CAL normalisierten Bandenvolumina zusätzlich durch diesen Faktor.*

## Anhang C

### Post-elektrophoretische Anwendungen

#### Fixierung und Lagerung von Gelen

Für eine Lagerung der Gele fixieren Sie diese für 30 min in 40% (v/v) Ethanol/10% (v/v) Essigsäure. Lagern Sie die Gele im Dunkeln in 25% (v/v) Ethanol/3% (v/v) Glycerin. Bei der Verwendung von Fertiggelen beachten Sie bitte die Hinweise des Herstellers.

#### Färbungen

SPL gelabelte Proteine können mit allen sichtbaren Färbungen (z.B. Coomassie oder Silbernitrat) angefärbt werden. Sichtbare Färbungen können jedoch das Fluoreszenz-Signal maskieren.

#### Massenspektrometrie

Das SPL Fluoreszenz Labeling hat keinen Einfluss auf die spätere Identifizierung durch massenspektrometrische Analysen. Es beeinflusst weder die Effizienz enzymatischer Verdauung noch die Sequenzabdeckung im Vergleich zu unmarkierten Proteinen.

#### Western Blot Analysen

SPL Gele können direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese wie gewohnt geblottet werden. Die Fluoreszenz-Markierung wird dabei zusammen mit den Proteinen auf die Blotting Membran übertragen und kann durch einfaches Fluoreszenz-Imaging direkt als Transfer-Kontrolle dienen. Die anschließende Behandlung der Membran (Blockierung, Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern usw.) wird durch das SPL Labeling nicht beeinflusst.

## Anhang D

### Example of a SPL Western Blot Analysis

#### Experiment

Protein was extracted from E. coli expressing recombinant HSP90. 3 aliquots of 20 µg of protein each were transferred to a fresh vial. To each of the three vials equal amounts of the standard SMA basic and the Smart Label working solution were added and labeling was performed according to the SPL Blue or SPL Red manual. For sample 2 (figure 1 +2: lane 2 of all 4 images) and sample 3 (figure 1+2: lane 3 of all 4 images) a labeling inhibitor was added in order to artificially decrease labeling efficiency.

#### Abbreviations of the fluorescent images

GTO = Gel Total Protein + SMA label  
GLO = Gel Load Protein (= SMA basic)  
BTO = Blot Total Protein  
BTA = Blot Target Protein

Gel electrophoresis, Western blot and image acquisition

After gel electrophoresis fluorescent images (blue and red detection) were captured and named GTO\_exp1.tif and GLO\_exp1.tif (figure 1: images GTO and GLO).

The protein was transferred using a Beo Dry Blotter onto a low fluorescence blotting membrane. The membrane was blocked using commercial milk powder. As a first antibody anti-HSP90 was used. As a secondary antibody a HRP-conjugated anti-goat in combination with Immuno Blue Fluorescent Substrate was used in order to detect the target protein. All washing and antibody incubation steps were performed by an usual WB procedure.

After the Western blot, both total protein (named BTO\_exp1.tif) and target protein (named BTA\_exp1.tif) were detected by fluorescence imaging (figure 2: images BTO and BTA).

#### Processing of the images

The 4 acquired fluorescent images (GTO\_exp1.tif, GLO\_exp1.tif, BTO\_exp1.tif, BTA\_exp1.tif) were processed using the 1D and Western Blot analysis software LabImage 1D SPL.

The region of interest (ROI), lanes and background were detected in GTO. These obtained data were then transferred to GLO. SMA basic was detected in GTO and this band then transferred back to GTO in order to detect the SMA label bands. The SPL normalization occurs automatically in LabImage 1D SPL as described in the manual SPL Data Processing and Evaluation<sup>2</sup>.

#### Results

The effect of SPL normalization on the target protein signal is demonstrated in figure 3. Target protein signal is shown in relation to: (i) non-normalized total protein and (ii) SPL-normalized total protein. Non-normalization of decreased labeling efficiency of the 3 E. coli aliquots (caused by external addition of a labeling inhibitor) would lead to increasing target protein signal. SPL-normalization is able to compensate for unequal labeling. As a result, target protein signal do not differ as it is expected for the three aliquots originating from one E.coli sample.

<sup>1,2</sup> Manuals are available as PDF at the SPL product site in the section: Related Documents.

Link to the SPL product site:

<http://www.dyeagnostics.com/site/en/products/spl/>

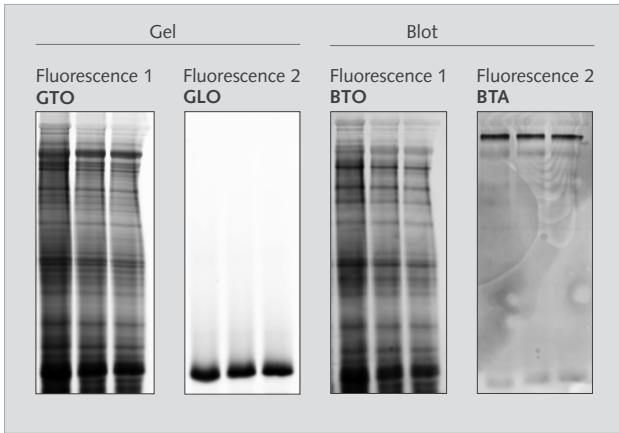


Figure 1. Acquisition of the fluorescent images

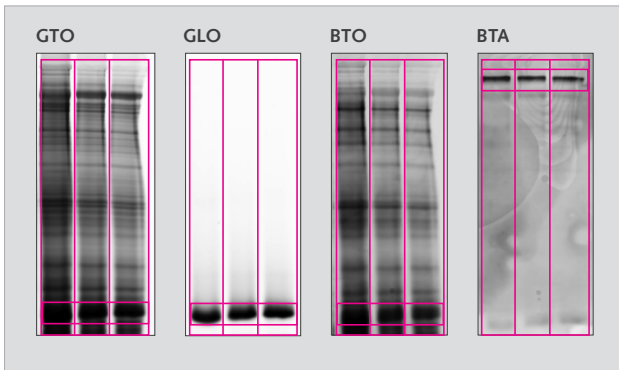


Figure 2. Processing of the fluorescent images

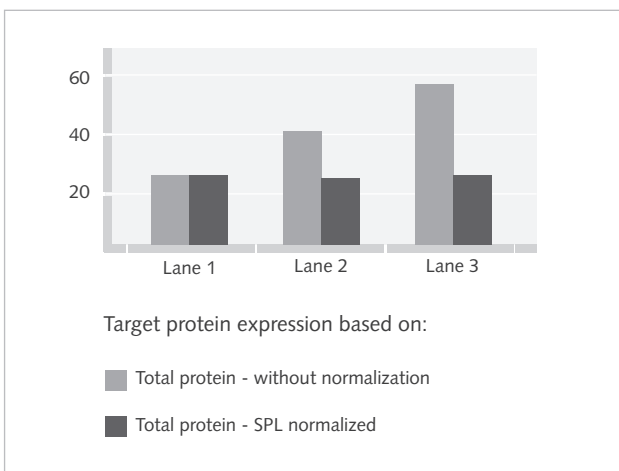


Figure 3. Evaluation of SPL-normalized target expression