

Produktinformation

Smart Protein Layers SPL Gel Kit Red

Produktnr. PR901, PR902

NH DyeAGNOSTICS GmbH
Weinbergweg 23
D-06120 Halle

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

FOR RESEARCH USE ONLY

1 Produkte und Inhalt

| | SPL Gel Kit Red 20G | SPL Gel Kit Red 40G |
|--|------------------------|------------------------|
| Produkt-Nr. | PR901 | PR902 |
| 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; 12,5 kDa) | 1x | 2x |
| SPL Smartalyzer basic blue size L (SMA; 80 kDa) | 1x | 2x |
| SPL Calibrator A (CAL A)** | 1x | 2x |

* entspricht 20 bzw. 2x20 Minigelen oder 200 bzw. 2x 200 Smart Label Reaktionen von bis zu 100 µg Protein pro Probe

** für den Experiment-zu-Experiment-Vergleich

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

Das Produkt sollte nur von entsprechend geschultem Personal angewendet werden.

Während der Anwendung sind die grundlegenden Laborsicherheitsstandards zu beachten. Für ausreichende Schutzkleidung, wie Labor-kittel, Handschuhe und Schutzbrille, ist zu sorgen.

Smart Label Reagent B enthält Dimethylformamid (DMF; CAS Nummer 68-12-2; H-Sätze: H360D - H226 - H332 - H312 - H319; P-Sätze: P201 - P210 - P302 + P340 - P305 + P351 + P338 - P308 + P313). DMF ist gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken oder Hautkontakt. Gefahrensymbole (nach GSH):



SPL Buffer enthält SDS (Natriumdodecylsulfat, >1 - <5%; CAS Nummer 151-21-3; H-Sätze: H319; P-Sätze: P270 - P273 - P280 - P302 + P352 - P304 + P340 - P310. SDS kann schwere Augenreizungen verursachen. Gefahrensymbole (nach GSH):



4 Sie benötigen zusätzlich:

- DTT (pro Kit: ca. 500 µl einer 60 mM DTT Lösung)
- Gelelektrophorese-System
- Imaging-System zur Detektion roter und blauer Fluoreszenz

5 Einführung

Smart Protein Layers (SPL) ist eine neue Technologie für die färbungsfreie, quantitative Analyse von 1D-Proteingelen.

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 Probenvorbereitung und Gelbeladung,
- gleichmäßige Visualisierung und ggf. Normalisierung von Gesamtprotein mittels Smart Label,
- Experiment-übergreifende Normalisierung von Gesamtprotein.

Die SPL Technologie besteht aus drei Komponenten:

Smart Label (Protein-Markierung)

Die einfach durchzuführende Fluoreszenz-Markierung einer Proteinprobe mit *Smart Label* ermöglicht die schnelle, sensitive und quantitative Visualisierung von Gesamtprotein direkt im Gel. Die Proteine können 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)

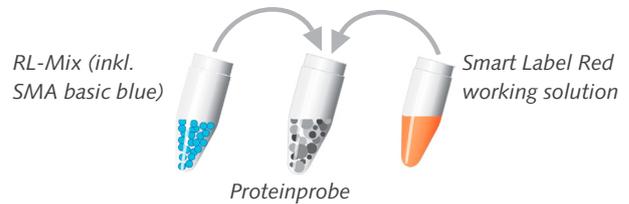
Der SPL Calibrator (CAL) dient nicht nur als fluoreszierender MW-Marker, sondern ermöglicht auch den direkten Vergleich verschiedener Experimente (Gele oder Western Blots). CAL A besteht aus drei Polypeptiden unterschiedlicher Größe und Menge (rot und blau fluoreszierend) und wird jedem Gel in definierter Menge in einer eigenen Spur zugegeben.

6 Durchführung einer SPL Analyse

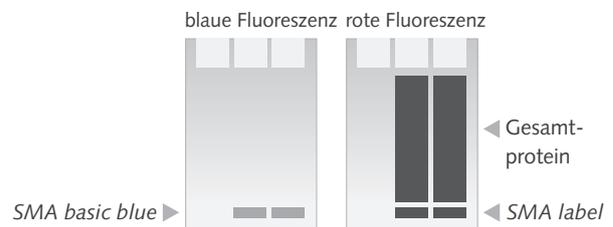
Stellen Sie vor Beginn der Arbeiten sicher, dass alle benötigten Reagenzien und Materialien einsatzbereit sind.

Übersicht Workflow SPL-Analyse

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



2 Gelelektrophorese und Fluoreszenz-Detektion



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 Kontaminationen 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: $n \text{ Proteinproben} = n+1 \times \text{Mastermix}$.

Hinweis: Der SPL Buffer enthält SDS, das während des Einfrieren ausfallen kann. Lassen Sie den SPL Buffer 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 6.1.2) 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 den hoch-abundanten Proteinen innerhalb Ihrer Proben unterscheiden.

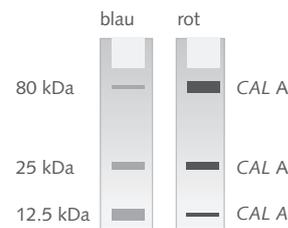
6.1.4 Verwendung und Vorbereitung des CAL

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

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:



Vorbereitung

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

- Überführen Sie pro Gel 8 µl des CAL A pro Gel 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 10 µl vorbereiteten CAL auf.

6.2 Gelelektrophorese und Fluoreszenz-Detektion

6.2.1 Gelelektrophorese

- Tragen Sie 10 µl des vorbereiteten CAL auf jedes Gel auf (siehe 6.1.4).
- 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

Imagieren 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 im Produktblatt "Data Processing and Evaluation" beschrieben.

Hinweise für post-elektrophoretische Anwendungen: Siehe 7.

6.3 Datenprozessierung und Datenauswertung

Siehe Produktblatt "SPL Data Processing and Evaluation"

7 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.

8 Verwendete Symbole

Nach DIN EN ISO 15223:

| | |
|---|-------------------------------|
|  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Temperaturbegrenzung |
|  | Verwendbar bis |
|  | Artikelnummer |
|  | Chargencode |
|  | Ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Hersteller |
|  | Medizinprodukt |
|  | Unique Device Identifier Code |