

Smart Protein Layers

Quick Guide Protein Labeling

1 Required materials for SPL Labeling

- Smart Label working solution (SLW = tube marked with „Smart Label Reagent B)
- SPL Buffer
- SPL Smartalyzer (SMA)
- 60 mM DTT (freshly prepared)
- Calibrator Mix
- Protein sample (Protein concentration: max. 10 µg/µl)

2 Preparation of the SLW (only before first usage)

1. Allow vials containing Smart Label Reagent A and B to warm up to room temperature and spin down briefly.
2. To solubilise the Smart Label add 15 µl of Smart Label Reagent B (contains molecular sieves to avoid water pollution) to Smart Label Reagent A and mix. Spin down briefly.
3. Transfer all liquid from Smart Label Reagent A to Smart Label Reagent B, mix and spin down briefly.
4. The SLW solution (=“Smart Label Reagent B”) is now ready to use and stable for 6 month. Store the SLW solution at -20 to -80 °C.

3 Preparation of the Calibrator (CAL) as a Master Mix is recommended

1. Transfer 8 µl CAL A per gel into a fresh micro-centrifugation tube.
2. Add 2 µl CAL B* per gel and mix (a dilution might be necessary to use with low abundant targets).
3. Add 2 µl of 60 mM DTT per gel (freshly prepared), mix and centrifuge briefly.
4. Denature the proteins by heating the mixture for 5 min at 95 °C.
5. Apply 12 µl of the prepared CAL to each gel.

*CAL B is not needed for usage of SPL Gel Kits.

4 Preparation of the Reaction and Loading Mix (RL Mix)

6 µl	SPL Buffer	}	x (n**+1)	**no. of samples
2 µl	60 mM DTT			
2 µl	SMA (S or L)			

Note:

SMA as well as CAL B can be used in dilution when the signal is too prominent. Please pre-dilute SMA und CAL B with water or PBS before preparing the RL or CAL Mix (e.g. 1:100). The volumes used for RL and CAL Mix should not be changed.

5 SPL Labeling

Variant A) Equal volumes with different protein concentrations (only possible with SPL)

protein conc.	sample vol.	H ₂ O***	RL Mix	SLW	denaturing	gel load
up to 10 µg/µl	10 µl	-	10 µl	1 µl	5 min, 95 °C	21 µl

Variant B) Equal Protein concentrations using different volumes (e.g.)

50 µg	4 µl	6 µl	10 µl	1 µl	5 min, 95 °C	21 µl
50 µg	9 µl	1 µl	10 µl	1 µl	5 min, 95 °C	21 µl

***or buffer in which sample is solved

For an excel sheet ask the NHD service team (info@dyeagnostics.com).

Smart Protein Layers

Kurzanleitung Protein Labeling

1 Benötigte Materialien für das SPL Labeling

- Smart Label Working Solution (SLW; Kennzeichnung des Tubes: „Smart Label Reagent B“)
- SPL Buffer
- SPL Smartalyzer (SMA)
- 60 mM DTT (frisch angesetzt)
- Calibrator Mix
- Proteinproben (Proteinkonzentration: max. 10 µg/µl)

2 Herstellung SLW (nur vor der ersten Anwendung)

1. Lassen Sie Smart Label Reagent A und Smart Label Reagent B bis auf Raumtemperatur erwärmen und zentrifugieren Sie kurz.
2. Zum Lösen des Smart Label entnehmen Sie 15 µl aus Smart Label Reagent B (enthält Molsiebe, um Wasserkontamination zu vermeiden) und überführen diese in Smart Label Reagent A. Mischen Sie sorgfältig und zentrifugieren Sie kurz.
3. Überführen Sie die gesamte Flüssigkeit aus Smart Label Reagent A in Smart Label Reagent B, mischen und zentrifugieren Sie kurz.
4. The SLW ist nun gebrauchsfertig und bis zu 6 Monate haltbar. Lagern Sie nicht verwendete SLW bei -20 bis -80 °C.

3 Vorbereitung des Calibrator (CAL) Mix

1. Überführen Sie pro Gel 8 µl des CAL A (Größenstandard) in ein frisches Reaktionsgefäß.
2. Geben Sie pro Gel 2 µl CAL B* (sek. AK-Kontrolle) und mischen Sie sorgfältig.
3. Geben Sie pro Gel 2 µl 60 mM DTT (frisch hergestellt), mischen und zentrifugieren Sie kurz.
4. Denaturieren Sie den CAL-Ansatz für 5 min bei 95 °C.
5. Tragen Sie pro Gel 12 µl des gebrauchsfertigen CAL auf.

*CAL B wird für das SPL Gel Kit nicht benötigt.

4 Vorbereitung des Reaktions- und Lade-Mix (RL Mix)

6 µl	SPL Buffer	}	x (n**+1)	
2 µl	60 mM DTT			
2 µl	SMA (S oder L)			
				**Probenanzahl

Hinweis

Sowohl SMA als auch CAL B können verdünnt eingesetzt werden, sollte die Signalstärke zu hoch sein. Setzen Sie in diesem Fall eine Vorverdünnung an (z.B. 1:100 in H₂O). Die einzusetzenden Volumina für das einzelne Experiment sollten sich nicht ändern.

5 SPL Labeling

Variante A) Gleiche Volumina mit unterschiedlichen Konzentrationen (nur mit SPL möglich)

Proteinkonz.	Proben-volumen	H ₂ O***	RL Mix	SLW	Denaturierrg.	Gel-Be-ladung
bis zu 10 µg/µl	10 µl	-	10 µl	1 µl	5 min, 95 °C	21 µl

Variante B) Gleiche Proteinmengen in unterschiedlichen Volumina (Beispiel)

50 µg	4 µl	6 µl	10 µl	1 µl	5 min, 95 °C	21 µl
50 µg	9 µl	1 µl	10 µl	1 µl	5 min, 95 °C	21 µl

***oder Puffer, in welchem die Probe gelöst wurde

Für ein Pipettierschema als Excel-Sheet fragen Sie das NHD Service Team (info@dyeagnostics.com)