

Smart Protein Layers

Prozessierung und Auswertung von SPL-Daten mit LabImage

1 Für die SPL-Analyse werden folgende Daten benötigt:

1. Bandenvolumen des SMA basic ermittelt in GLO für die Normalisierung der Beladung
2. Bandenvolumen des SMA label ermittelt in GTO für die Normalisierung des Labelings
3. Spurvolumen (exkl. Bandenvolumen SMA label) ermittelt in BTO für die Normalisierung des Targets
4. Bandenvolumen des Targets ermittelt in BTA
5. Für Experiment-zu-Experiment-Vergleiche: Bandenvolumen des Cal B ermittelt in BTA der Einzelexperimente

2 Vorbereitung und Benennung der Bildaufnahmen

Zur Daten-Analyse werden Roh-Daten benötigt. ORCA- und OctoPlus-Nutzer verwenden zur Generierung die „SAVE“-Option in der Bildaufnahmesoftware.

Für die SPL-Analyse werden vier Bilder benötigt, mit der folgenden Nomenklatur:

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1. Gesamtprotein nach Gellauf | (GTO = Gel Totalprotein) |
| 2. SMA basic nach Gellauf | (GLO = Gel Loading Control) |
| 3. Gesamtprotein nach Western Blot Analyse | (BTO = Blot Totalprotein) |
| 4. Targetprotein nach Western Blot Analyse | (BTA = Blot Targetprotein) |

Benennung: Kürzel_eindeutigerExperimenthinweis_weitereNamensteile

Bsp.: GTO_WB180514_rot12sec_Wdh1

Verwenden Sie keine Leerzeichen.

Hinweis:

Die Daten-Analyse muss nicht zwingend mit der LabImage-Software durchgeführt werden. Die notwendigen Daten (1.) können mit jeder 1D-Analyse-Software erhoben und anschließend mit z.B. Excel berechnet werden. Die entsprechende Anleitung erhalten Sie beim Service Team.

3 Detektion von Spuren und Banden

1. Erstellen Sie für jede Fluoreszenzaufnahme ein LabImage-Projekt.
2. Optimieren Sie Ihr Anzeigebild (optional; die Rohdaten bleiben unverändert).
3. Definieren Sie die ROI in GTO.
4. Detektieren Sie Spuren in GTO.
5. Führen Sie eine Hintergrunddetektion und -subtraktion durch.* (empfohlene Parameter: „Rollende Scheibe“; Radius: 45 Pixel)
6. Übertragen Sie ROI, Spuren und Hintergrund von GTO auf GLO.
7. Detektieren Sie SMA basic-Banden sowie (optional) mindestens eine Cal A-Bande in GLO.
8. Übertragen Sie die SMA basic-Banden von GLO auf GTO.
9. Detektieren Sie die ROI, Hintergrund, Spuren und SMA label-Bande in BTO.
10. Übertragen Sie ROI, Spuren und Hintergrund aus BTO auf BTA und detektieren Sie die Targetprotein-Bande.
11. Laden Sie für jedes Projekt die entsprechende Namensvorlage (als Download erhältlich unter www.dyeagnostics.com). Für die Erstellung eigener Namensvorlagen beachten Sie bitte die SPL-LabImage-Produktinformation. Als Referenz ist Spur 2 angegeben. Diese darf nicht der Marker sein.
12. Speichern Sie alle Projekte.

4 SPL Normalisierung (Starten des Projekt Comparators)

5 Ergebnisse und Datenexport

* Achten Sie darauf, dass die ROI ausgewählt ist und keine einzelne Spur, damit die Berechnung für alle Spuren erfolgt und die Namensvorlagen korrekt zugeordnet werden.