

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA*Light EosUltra* Western Blot Chemilumineszenz HRP Substrat Kit

(Kat.-Nr. 42586)



SERVA Electrophoresis GmbH ● Carl-Benz-Str. 7 ● D-69115 Heidelberg
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
e-mail: info@serva.de ● <http://www.serva.de>

Inhaltsverzeichnis

1. SERVALIGHT EOSULTRA	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Bestandteile des Kits	2
1.3. Lagerbedingungen	2
2. DURCHFÜHRUNG DER DETEKTION	3
2.1. Wichtig zu Beginn	3
2.2. Notwendige, nicht mitgelieferte Materialien und Lösungen	4
2.3. Schema der Western-Blot-Detektion	5
2.4. Protokoll	5
3. PROBLEMLÖSUNGEN	7
4. BESTELLINFORMATIONEN	8

Ver 03/12

1. **SERVALight EosUltra**

1.1. **Allgemeine Hinweise**

SERVALight EosUltra ist ein hochsensitives Chemilumineszenz-Substrat zur Detektion von Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) Konjugaten, z.B. markierte Antikörper, auf Immunoblots.

Die Signalintensität des Substrates erlaubt den Antigen-Nachweis im unteren Femtogramm-Bereich (10^{-15}).

Vorteile:

- Detektion auf Filmen bzw. mit Chemilumineszenz-geeigneten Dokumentationssystemen, z.B. ProXima C16Phi+, Isogen
- Sehr kurze Expositionszeiten und/oder höhere Antikörperverdünnungen aufgrund optimierter, lichtintensiver Signale

SERVALight EosUltra ist nicht für die Anwendung im Bereich Diagnostik oder anderer klinischer Anwendungen, sondern nur für Forschung und Entwicklung geeignet.

SERVALight wird von Cyanagen Srl hergestellt. Cyanagen Srl ist Gegenstand folgender US und EU Patente US 7803573, EP 1962095, US 7855287, sowie bereits eingereichter und entsprechend gültiger Patente für andere Länder.

1.2. **Bestandteile des Kits**

Kat.-Nr.	SERVALight EosUltra Luminol Solution	SERVALight EosUltra Peroxide Solution
42586.01	10 ml	10 ml
42586.02	50 ml	50 ml
42586.03	100 ml	100 ml

1.3. **Lagerbedingungen**

Lagern Sie den Kit bei 2 – 8 °C.

Bei Lagerung bei der empfohlenen Temperatur mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. Durchführung der Detektion

2.1. Wichtig zu Beginn

Sicherheitshinweis:

Tragen Sie aus Sicherheitsgründen grundsätzlich geeignete Schutzhandschuhe und -kleidung.

Die Optimierung aller Komponenten des Systems, wie Probenmenge, Konzentration des 1. bzw. 2. Antikörpers sowie Membranmaterial und Blockierungsreagenz ist aufgrund der hohen Sensitivität unerlässlich. So sind die hier genannten Antikörperverdünnungen nur Empfehlungen, die kritisch angepasst werden müssen.

- Die notwendigen Antikörperkonzentrationen sind geringer als bei Detektion mit chromogenen HRP-Substraten. Optimierung der Antikörperkonzentration kann mittels Dot-Blotting erfolgen.
- Da es kein universelles Blockierungsreagenz für alle Detektionssysteme gibt, muss für jedes Western-Blot-System das geeignete Reagenz bestimmt werden. Optimierung führt hier zur Verminderung des Hintergrunds und somit zu höherer Sensitivität.
- Während der gesamten Inkubationen der Blotmembran ist es wichtig, dass die Membran immer ausreichend mit Waschpuffer, Blockierungslösung, Antikörperlösung bzw. Detektionslösung bedeckt ist. Das Trocknen der Membran sollte vermieden werden.
WICHTIG: Große Volumina von Wasch- und Blockierungspuffer reduzieren unspezifische Signale.
- Auch die Zugabe von Tween[®]-20 (Endkonzentration: 0,05 %) zu Blockierungspuffer und Antikörperlösungen reduziert unspezifische Signale. Hier sollten nur hochqualitative Produkte mit niedrigem Peroxidgehalt verwendet werden.
- Erfolgt die Detektion über ein Avidin-Biotin-System darf auf keinen Fall Milchpulver als Blockierungsmittel verwendet werden.
- Die Inkubationsschritte sollten auf einem Schüttler/Mischer/Wippe durchgeführt werden.
- Natriumazid (NaN₃) sollte in den verwendeten Puffern vermieden werden, da es hierdurch zur Inhibition der HRP kommt.

- Beim Arbeiten mit Blotmembranen sollten immer Handschuhe, saubere Scheren und Pinzetten verwendet werden, um Kontamination mit Fremdprotein und/oder Rost zu vermeiden. Dies kann zu Flecken auf dem Blot oder erhöhtem Hintergrund führen.
- Die **SERVALight EosUltra** Arbeitslösung ist 24 h bei Raumtemperatur stabil und sollte lichtgeschützt gelagert werden. Exposition mit intensiven Lichtquellen und Sonnenlicht sollte vermieden. Die Kurzzeitexposition mit herkömmlicher Laborbeleuchtung beeinträchtigt die Arbeitslösung nicht.

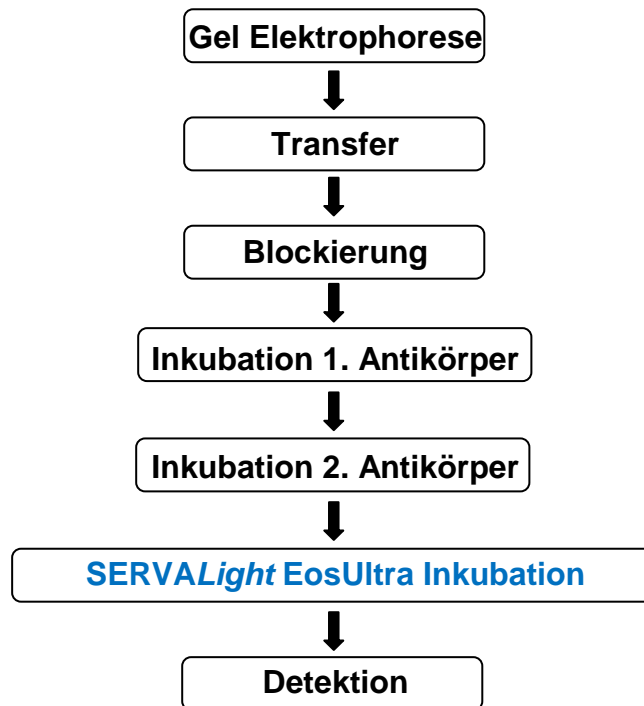
2.2. Notwendige, nicht mitgelieferte Materialien und Lösungen

- **Western-Blot-Membran:** Nach anwendungsspezifischem Protokoll für Elektrophorese und Transfer hergestellt
- **Verdünnungspuffer:**
TBS (Tris Buffered Saline) oder PBS (Phosphate Buffered Salin)
- **Waschpuffer (TBS-T oder PBS-T):**
5 ml 10 % (v/v) Tween[®]-20
ad 1 l TBS oder PBS
- **Blockierungsreagenz:**
0,5 ml 10 % (v/v) Tween[®]-20
ad 100 ml Blockierungspuffer (basierend auf den gleichen Komponenten wie Verdünnungspuffer)
- **1. Antikörper (1. Ak, Zielprotein-spezifischer Antikörper):**
 - Stocklösung in Verdünnungspuffer: 1 mg/ml
 - Arbeitslösung: 1:5.000 – 1: 50.000 in Blockierungsreagenz.

Die notwendige 1. Ak-Verdünnung hängt von Antikörperspezifität, -selektivität sowie der Menge von Antigen auf der Blotmembran ab.
- **2. Antikörper HRP-markiert (2. Ak, spezifisch für 1. Ak):**
 - Stocklösung in Blockierungsreagenz: 1 mg/ml
 - Arbeitslösung: 1:50.000 – 1: 250.000 in Blockierungsreagenz.

Die notwendige 2. Ak-Verdünnung hängt vom HRP-Konjugat sowie von der Menge Antigen auf der Blotmembran ab.
- Schüttler/Wippe für die Inkubationsschritte der Membran
- Filme, Filmkassette, Entwicklungs- und Fixierungsreagenzien

2.3. Schema der Western-Blot-Detektion



2.4. Protokoll

- (1) Entfernen des Blots aus der Blotapparatur und anschließendes Blockieren bei Raumtemperatur (20 - 60 min) oder bei 2-8 °C über Nacht.
- (2) Entfernen des Blockierungsreagenz und Zugabe der 1. Antikörper-Arbeitslösung in geeigneter Verdünnung. Inkubation 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 2-8 °C unter Schütteln.
- (3) Anschließendes Waschen der Membran mit Waschpuffer (5 min). Waschschrift 4-6 Mal wiederholen. Größere Puffervolumina bzw. Anzahl der Waschschriftte können zur Hintergrundreduktion beitragen.
- (4) Zugabe der geeigneten Verdünnung des HRP-Konjugats. 1 h Inkubation des Blots bei Raumtemperatur unter Schütteln.
- (5) Wiederholung des Schrittes (3).
- (6) Vor der Detektion sollten die Detektionslösungen Raumtemperatur haben.
- (7) Herstellen der Substrat-Arbeitslösung durch Mischen gleicher Anteile Peroxid-Lösung mit Luminol-Lösung. Pro cm² Membran sollten 0,1 ml Arbeitslösung eingesetzt werden.

- (8) Die Arbeitslösung ist bei Raumtemperatur 24 h stabil.
- (9) 5 min Inkubation des Blotmembran mit Substrat-Arbeitslösung.
- (10) Geschützten Blot (z.B. in Frischhaltefolie luftblasenfrei einschlagen) mit Proteinseite nach oben in Filmkassette überführen und Film einlegen. Hier sollte in einer geeigneten Dunkelkammer gearbeitet werden. Der Film sollte während der Belichtung trocken bleiben.
WICHTIG: Überschüssiges Substrat sollte vom Blot beseitigt werden. Der Film sollte vorsichtig aufgelegt werden, da aufgrund der Signalintensität bereits ein leichtes Verrutschen des Films/Blots zu verwischten oder falschen Signalen führen kann.
- (11) Zunächst ist eine Expositionszeit von 60 s empfehlenswert. Abhängig von der Signalstärke kann entsprechend die weitere Expositionszeit für optimale Signalintensität gewählt werden.
- (12) Anschließend wird der belichtete Film entwickelt.
- (13) Alternativ zur Filmentwicklung, kann die Detektion auch über geeignete Dokumentationssysteme, z.B. ProXima C16 Phi+, Isogen, erfolgen.
- (14) Falls notwendig kann der Blot nach erfolgter Detektion gestrippt und erneut mit Antikörper beladen werden.

3. Problemlösungen

Erscheinungsbild	mögliche Ursache	Gegenmaßnahme
Schwaches oder kein Signal	Zu viel HRP im System führt zu einer schnellen Signal-abnahme	Höhere Verdünnung des HRP-Konjugats
	Ungenügende Mengen Antigen oder Antikörper	Größere Mengen Antigen oder Antikörper einsetzen
	Reduktion der HRP- oder Substrataktivität	Frische Reagenzien verwenden
Blot leuchtet im Dunkeln	Zu viel HRP im System	Höhere Verdünnung des HRP-Konjugats
Braune Banden auf der Membran		
Negativabbildung auf dem Film		
Hoher Hintergrund	Zu viel HRP im System	Höhere Verdünnung des HRP-Konjugats
	Ungenügendes Blockieren oder ungeeignetes Blockierungsreagenz	Optimierung der Blockierungsbedingungen und des Reagenz
	Überbelichteter Film	Belichtungszeit reduzieren
	Zu viel Antigen oder Antikörper	Optimierung der Antigen-/Antikörperkonzentrationen
	Ungenügendes Waschen	Erhöhung des Waschpuffervolumens und der Zahl der Waschschrte
Fleckiger Hintergrund	Bildung von Aggregaten des HRP-Konjugats	HRP-Konjugat über 0,2 µm-Filter filtrieren
Flecken innerhalb der Proteinbanden	Ungleichmäßiger/unvoll-ständiger Proteintransfer	Optimierung des Proteintransfers
	Ungleichmäßig befeuchtete Membran	Membran gleichmäßig befeuchten
	Luftblasen zwischen Film und Membran	Beseitigen der Luftblasen vor der Belichtung
	Zu viel Antigen oder Antikörper	Optimierung der Antigen-/Antikörperkonzentrationen
	Ungenügendes Waschen	Erhöhung der Dauer, des Waschpuffervolumens und der Zahl der Waschschrte
Unspezifische Banden	Schwaches Signal bei hohem Hintergrund (zu viel HRP)	Höhere Verdünnung des HRP-Konjugats
	Signalintensität und Hintergrund in Ordnung (zu viel 1. Ak)	Höhere Verdünnung des Primäantikörpers
	SDS innerhalb des Immunoassay	SDS vermeiden

4. Bestellinformationen

Membranen	Kat.-Nr.
Immobilon (PVDF), 26,5 cm x 3,75 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42574
Fluorobind (PVDF), 10 x 10 cm, Porengröße: 0,2 µm (20 Blatt)	42573
Fluorobind (PVDF), 25 cm x 3 m, Porengröße: 0,2 µm (1 Rolle)	42571
Protein Standard	
SERVA Western Blot Protein Standard	39256
Reagenzien	
Tween [®] 20	37470
Detektionsreagenzien/-kits	
Chemiluminescence Reagent for Horseradish Peroxidase	42582
SERVALight Polaris CL HRP WB Substrate Kit	42584
SERVALight Eos CL HRP WB Substrate Kit	42585
SERVALight Helios CL HRP WB Substrate Kit	42587