

Gebrauchsanweisung

Roti[®]-Mark WESTERN Set (Art. Nr. 0947.1)
und MINI-Set (Art. Nr. 0947.2)

Roti[®]-Mark WESTERN Marker (Art. Nr. 0948.1)

Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat (Art. Nr. 0949.1)

Protein-Molekulargewichtsmarker und anti-Marker-Antikörper für die chemilumineszente Detektion auf Westernblots

I. Inhalt

Das Roti[®]-Mark WESTERN Set (Art. Nr. 0947.1) enthält:

- 0,5 ml gebrauchsfertigen Roti[®]-Mark WESTERN Marker (Art. Nr. 0948.1)
- 0,1 mg Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat, anti-WESTERN Marker Antikörper (Kaninchen) (Art. Nr. 0949.1) als gebrauchsfertige Lösung (0,2 mg/ml)

Das Roti[®]-Mark WESTERN MINI-Set (Art. Nr. 0947.2) enthält:

- 50 µl gebrauchsfertigen Roti[®]-Mark WESTERN Marker (nicht einzeln bestellbar)
- 0,01 mg Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat, anti-WESTERN Marker Antikörper (Kaninchen) (nicht einzeln bestellbar), als gebrauchsfertige Lösung (0,2 mg/ml)

II. Lagerung

II.1 Roti[®]-Mark WESTERN Set

Lagern Sie das Roti[®]-Mark WESTERN Set vor Gebrauch bitte bei -20°C.

II.2 Roti[®]-Mark WESTERN Marker

Der Marker kann kurzfristig (wenige Tage) bei 4 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung sollte bei -20 °C erfolgen. Um häufiges Einfrieren und Auftauen zu vermeiden empfehlen wir Aliquots einzufrieren.

II.3 Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat

0947 und 0949: Das Antikörper-Konjugat liegt bereits rekonstituiert vor und ist für einige Wochen bei 4 °C stabil. Für längere Aufbewahrung muss das Konjugat bei -20 °C oder -80 °C gelagert und zur Vermeidung von wiederholtem Einfrieren und Auftauen aliquotiert werden.

Bitte beachten Sie: In einigen Fällen wird das Konjugat auch lyophilisiert ausgeliefert. Das lyophilisierte Antikörper-Konjugat kann vor der Rekonstituierung bei 4 °C gelagert werden. Rekonstituieren Sie vor dem ersten Gebrauch die lyophilisierten Antikörper Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat bitte in 250 µl sterilem H₂O durch Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Das Lyophilisat enthält bereits stabilisierende Substanzen gemäß den Angaben in Kapitel IX. Mischen Sie die Antikörperlösung bitte vorsichtig und aliquotieren Sie sie. Aufbewahrung s.o.

III. Vorbereitung

III.1 Roti[®]-Mark WESTERN Marker

Erwärmen Sie den Roti[®]-Mark WESTERN Marker vor Gebrauch bitte etwas, um ausgefallenes SDS wieder in Lösung zu bringen. Eventuell auftretende Aggregate (die sich beim Gellauf an der Trenngelgrenze ablagern) können vor dem Gelbeladen durch Erwärmen auf 60°C für 2-5 min aufgelöst werden. Bitte beachten Sie: Der Marker sollte nicht über 80°C erhitzt werden.

IV Gelauftrag

Empfohlene Auftragsmenge für Minigele (10 x 10 cm und 0,75 - 1 mm Dicke): **5 µl**

Die Auftragsmenge variiert mit Geldicke, C/T-Verhältnis, Färbung und Zahnbreite des Kamms, mit den Blot-Bedingungen und dem verwendeten Nachweis-Substrat, und sollte ausgehend von den angegebenen 5 µl spezifisch etabliert werden. Auch die gleichzeitige Anwesenheit von weiteren Antikörpern während der Nachweisreaktion kann die Detektionsstärke und damit die benötigte Menge Marker verändern. So führt z. B. die gleichzeitige Verwendung von anti-Rabbit sekundären Antikörpern in vielen Fällen zu einer Verstärkung des Markersignals.

Zum Verdünnen des Markers kann 1fach konzentrierter Ladepuffer nach Lämmli (mit SDS und DTT) verwendet werden (z.B. verdünnter Roti[®]-Load 1, Art. Nr. K929.1).

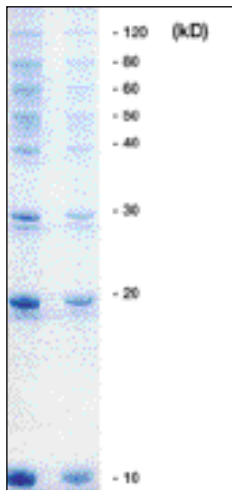


Abb.1: Roti[®]-Mark WESTERN Marker. Auftrag: 10 µl / 5 µl, 12% SDS-PAGE, Färbung mit Roti[®]-Blue (Art. Nr. A152.1).

Bitte beachten Sie:

Die Bandenintensität des Roti[®]-Mark WESTERN Markers wurde angepasst auf eine möglichst ebene Darstellung der Banden nach Western-Detektion. Da die größeren Proteine unverhältnismäßig starke Farb- und Lichtintensitäten ergeben, wurden die kleineren Proteine in der Menge angepasst und sind mit überproportional großen Proteinmengen in der Mischung vertreten. Daher sind im Gel die unteren Banden des Markers stärker, die oberen schwächer angefärbt.

V Antikörper-Verdünnung

Empfohlene Verdünnung zur WESTERN Marker-Detektion auf Westernblots: **1:1000**

Die eingesetzte Verdünnung variiert mit den Blot-Bedingungen wie der verwendeten Membran, der Blockierungslösung, dem verwendeten eigenen sekundären Antikörper und dem verwendeten Nachweis-Substrat im Assay. Das Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat kann zusammen mit anderen spezifischen Antikörperkonjugaten oder sekundären Antikörpern eingesetzt werden. Dabei sind die optimalen Bedingungen im Einzelfall zu ermitteln. Die gleichzeitige Verwendung eines anti-Rabbit sekundären Antikörpers ist unbedenklich, wir empfehlen allerdings auf Grund des Verstärkungseffektes (s. Trouble-shooting) eine höhere Verdünnung des sekundären Antikörpers und des Marker-Antikörpers zu verwenden (je 1:4000 oder stärker verdünnt).

VI Kompatibilität

Das Roti[®]-Mark WESTERN Marker Set ist kompatibel mit

- den im Handel befindlichen Gellösungen und Fertiggele
- PVDF sowie Nitrocellulosemembranen
- Semi-Dry sowie Tankblotting-Systemen
- Milchpulver und Roti[®]-Block als Blockierungsreagenz, Man beachte: die Verwendung von BSA kann zu erhöhtem Hintergrund führen
- PBS/PBST und TBS/TBST als Puffersystemen
- Farbnachweis und Chemolumineszenzdetektion über HRP

VII Anwendung

Nach Beendigung des Gellaufes wird das Gel nach Standardmethoden auf eine Trägermembran geblottet. Frei gebliebene Bindungsstellen der Membran werden anschließend mit einem geeigneten Blockierungsreagenz geblockt. Nach Inkubation des Blots in der Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat Antikörperlösung und anschließendem Waschen kann sofort die Detektion mit einem Chemolumineszenzsubstrat oder per Farbreaktion erfolgen. Die Inkubation mit dem Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat kann gegebenenfalls auch zusammen mit einem sekundären Antikörper erfolgen. Wir empfehlen als Standardanwendung des Roti[®]-Mark WESTERN Sets folgendes Protokoll (Zubehör siehe auch unter X. Empfohlene Reagenzien):

- VII.1 Auftrennung von 5 µl Roti[®]-Mark WESTERN Marker im SDS-PAGE neben Ihren Proben, Blotting des Gels auf eine PVDF-Membran (z. B. Roti[®]-PVDF). Für einen Semi-Dry Blot empfehlen wir ein elektrisches Feld von 1 mA/cm² Membranfläche für 2 Stunden, um auch das größte Markerprotein von 120 kD möglichst vollständig auf die Membran zu überführen. Für die anderen Markerproteine genügt eine Blotzeit von 60 bis 90 Minuten.
- VII.2 Nach erfolgtem Transfer wird die Membran kurz in TBST oder PBST (siehe X) gespült und anschließend für eine Stunde unter leichtem Schwenken in 1 % Magermilchpulver in TBST bzw. PBST oder in 1 x Roti[®]-Block blockiert.
- VII.3 Primäre Antikörper-Inkubation in Blockierungslösung, i. d. R. für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Verwenden Sie hier Ihren spezifischen Proben-Antikörper. Wenn Sie nur eine einzige Antikörperinkubation durchführen, entfallen die Schritte 3 und 4.
- VII.4 Waschen in TBST bzw. PBST, 4 x für jeweils 5 min bei Raumtemperatur unter Schwenken
- VII.5 Sekundäre Antikörper-Inkubation. Verwenden Sie eine Mischung aus Ihrem eigenen sekundären Antikörper und dem rekonstituierten Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockierungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken.
- VII.6 Waschen in TBST bzw. PBST, 4 x für jeweils 5 min bei Raumtemperatur unter Schwenken
- VII.7 Farb- oder Chemilumineszenznachweis zur Detektion der Banden. Lassen Sie die Farbreaktion inkubieren, bis die gewünschte Bandenstärke erreicht ist. Bei dem Chemilumineszenznachweis gilt: nach der Inkubation (z.B. in Roti[®]-Lumin) überschüssige Substratlösung mit einem Filterpapier aufsaugen und sofort die Chemilumineszenz mittels einer Kamera oder eines Röntgenfilms detektieren (siehe Abb. 2). Typische Belichtungszeiten bei Verwendung einer Kamera liegen zwischen 20 sec und 3 min, bei Verwendung eines Röntgenfilms können unter den vorgegeben Bedingungen noch kürzere Expositionszeiten ausreichen.

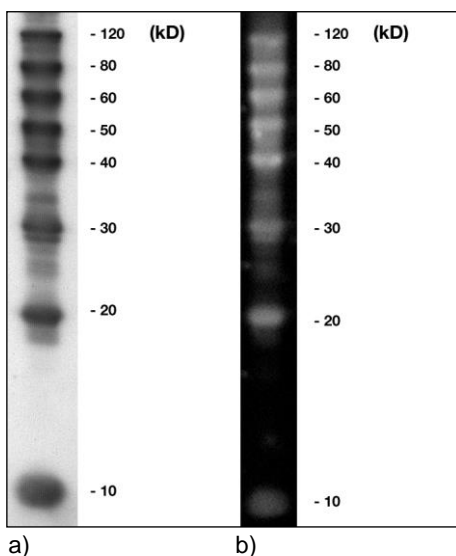


Abb.2: Roti[®]-Mark WESTERN Marker auf Roti-PVDF Membran nach Chemilumineszenz-Nachweis mit Roti-Lumin. Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat 1:1000.

a): 5 µl Roti[®]-Mark WESTERN Marker, Blockierung mit 1 x Roti[®]-Block, Detektion mittels Röntgenfilm, Belichtung 15 Sekunden

b): 2,5 µl Roti[®]-Mark WESTERN Marker, Blockierungslösung 1% Magermilch in TBST, Detektion mittels CCD-Kamera, Belichtung 45 Sekunden

VIII Trouble-Shooting

VIII.1 Zu starke oder zu schwache Signale der Markerbanden.

- Die angegebenen Mengen an aufzutragendem Marker und eingesetzter Antikörper-Verdünnung sind Richtwerte und auf das jeweils verwendete System anzupassen. Sie können abhängig von verwendeter Blotmembran, Transferpuffer, Blockierungslösung, Peroxidase-Substrat und Detektionssystem variieren.
- Vermeiden Sie eine Überladung des Gels. Die Auftragung von 5 µl Marker bei Standard-Mini-Gelen ist in den meisten Fällen ausreichend. Eine zu große Menge Marker kann auch durch folgenden Mechanismus zu einer Signalabschwächung führen: eine große Menge Antikörperkonjugat bindet an die hohe Menge Markerproteinmoleküle; das führt zu einer hohen Peroxidaseaktivität, die schließlich so stark sein kann, dass das Substrat schneller umgesetzt ist als es aus der Umgebung nachfließen kann.
- Ein ähnlicher Effekt kann durch die gleichzeitige Verwendung von anti-Rabbit sekundären Antikörpern erzeugt werden, da diese an den in Kaninchen erzeugten Roti[®]-Mark WESTERN Marker-Antikörper binden und so die Enzymaktivität an den Markerbanden verstärken können. Hier empfiehlt sich eine stärkere Verdünnung des Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugates von 1:4000.
- Die Menge an aufzutragendem Marker und eingesetzter Antikörper-Verdünnung ist ebenfalls abhängig von dem nachzuweisenden spezifischen Protein. Steht zu erwarten, dass das spezifische Signal nur schwach ist und für die Detektion deshalb besonders lange belichtet werden muss, sollte weniger Marker (2,5 µl oder weniger) eingesetzt werden, evtl. kombiniert mit einer höheren Antikörper-Verdünnung.
- Zu schwache Signale der Markerbanden können durch schlechte Transfereffizienz beim Blotten verursacht werden. Beachten Sie die Blot-Zeiten und die Angaben des Geräteherstellers. Testen Sie den Proteintransfer durch Färbung des Gels bzw. der Membran nach dem Blotten (z.B. durch Roti[®]-Blue, Roti[®]-Red oder Roti[®]-Green) und setzen Sie gegebenenfalls andere Transferpuffer bzw. längere Zeiten ein. Bei Einsatz von weniger als 1,25 µl Marker in Kombination mit kurzen Blottingzeiten kann das Signal der Proteinbande von 120 kDa fehlen.

VIII.2 Das spezifische Signal ist zu schwach

- Beim gleichzeitigen Einsatz des Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugates mit anti-Rabbit-Antikörpern kann unter Umständen die Signalstärke des spezifischen Proteins beeinflusst werden. Wie unter VIII.1 beschrieben können anti-Rabbit-Antikörper eventuell auch an das Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat binden und stehen dann für die spezifische Reaktion in geringerem Maße zur Verfügung. In solchen Fällen wird empfohlen, zunächst die eingesetzte Konzentration des Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugates zu verringern (z.B. Verdünnung bis 1:4000) und die Konzentration des eigenen sekundären Antikörpers zu verdoppeln.

VIII.3 Hoher Hintergrund

- Achten Sie auf gründliches Waschen nach der Antikörperinkubation.
- Testen Sie andere Blockierungslösungen. Die gelegentlich angewandte Blockierung durch 3 %iges BSA führt häufig zu hohem Hintergrund. Setzen Sie z. B. 1 % Magermilchpulver in TBST bzw. PBST oder 1 x Roti[®]-Block ein.

VIII.4 Die Signalstärke der Markerbanden ist sehr unterschiedlich

- Eine gleichmäßige Bandenintensität in der Chemilumineszenz ist nicht für alle Detektionssysteme in gleicher Weise gegeben. Bei manchen Substraten kann die Signalentwicklung der 10 kD- und 20 kD-Bande längere Zeit erfordern als die der übrigen Banden. Bei Einsatz von weniger als 1,25 µl Marker in Kombination mit kurzen Blottingzeiten kann das Signal bei 120 kD fehlen.

VIII.5 Zusatzbanden

- Oberhalb von 120 kDa kann nach der Detektion eine Zusatzbande auftreten, die i. d. R. im Gel kaum zu sehen ist. Es handelt sich um ein Agglomerat der Markerproteine, dessen Auftreten chargenabhängig ist. Weiter schwache Zusatzbanden können sich oberhalb und unterhalb der 30 kD Proteinbande finden. Hierbei handelt es sich um Nebenreaktionen des HRP-konjugierten markerspezifischen Antikörpers mit *E. coli* spezifischen Proteinen, die durch den Herstellungsprozess (rekombinante Expression in *E. coli*) im Marker enthalten sind. Die Detektion wird durch diese leichten Nebenbanden in keiner Weise behindert oder die Auswertung erschwert.

IX. Zusammensetzung

Der Marker enthält acht rekombinant in *E. coli* hergestellte Proteine mit definierten, regelmäßigen Molekulargewichten, vorreduziert und acyliert. Die Proteine garantieren eine möglichst gleichmäßige Bandenstärke in der Chemolumineszenz. Der tatsächliche Masseanteil der einzelnen Proteine beträgt 0,1 bis 0,2 mg/ml und ist chargenabhängig, eine Proteinmengenabschätzung wird mit diesem Marker deshalb nicht empfohlen. Die Proteine liegen gelöst in 50 mM TrisHCl (pH 6,8), 2 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 10 % Saccharose, 8,7 % Glycerin vor.

Das Antikörperkonjugat besteht aus 0,1 mg bzw. 0,01 mg Meerrettichperoxidase-konjugierter IgG-Fraktion aus Kaninchen gegen den Roti[®]-Mark WESTERN Marker (Konzentration 0,2 mg/ml) in gepufferter Lösung (phosphatgepufferte Natrium-/Kaliumsalzlösung, pH 6,5, mit ca. 5 % BSA, 30 % Glycerin, Gentamycin, Cytochrom C und Thimerosal, gesamt 500 µl bzw. 50 µl).

X. Empfohlene Reagenzien

Roti [®] -Blot 1	Transferpuffer für Semi-Dry Blotting	L509.1
Roti [®] -PVDF	PVDF-Blotmembran	T830.1
Roti [®] -Blue	Colloidale Coomassie-Färbung	A152.1
Roti [®] -Red	Hochsensitive Fluoreszenzfärbung für Gele	1045.1
Roti [®] -Green	Hochsensitive Fluoreszenzfärbung für Gele und Blots	1000.1
Roti [®] -Block	Proteinfreie Blockierungslösung	A151.1
Roti [®] -Lumin	HRP-Nachweisreagenz für Chemolumineszenz	P078.1
Roti [®] -Stock 10 x PBS	10 x PBS Stocklösung, autoklaviert und steril filtriert	1058.1
Roti [®] -Stock 10 x TBS	10 x TBS Stocklösung, autoklaviert und steril filtriert	1060.1
Roti [®] -Stock 10 x PBST	10 x PBST Stocklösung, autoklaviert und steril filtriert	1059.1
Roti [®] -Stock 10 x TBST	10 x TBST Stocklösung, autoklaviert und steril filtriert	1061.1

Roti[®]-Mark WESTERN Set	1 Set	⚠ Achtung H319	0947.1
	1 MINI-Set	P305+P351+P338-P337+P313	0947.2
Roti[®]-Mark WESTERN Marker	0,5 ml	⚠ Achtung H319	0948.1
Roti[®]-Mark WESTERN HRP-Konjugat	0,1 mg / 500 µl		0949.1

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5

76185 Karlsruhe

Postfach 100121

76231 Karlsruhe

Telefon: +49 (0) 721/5606-0

Telefax: +49 (0) 721/5606-149

E-Mail: info@carlroth.de

Internet: www.carlroth.de