



ROTI®Block

Blockierungsreagenz für Western-Blot und ELISA

A. Einleitung

ROTI®Block ist ein innovatives Blockierungsreagenz auf Polymerbasis.

- Kontaminationen Ihrer Nachweissysteme durch Fremdproteine sind ausgeschlossen. Die Signalstärke bleibt konstant.
- Spezifische Bindungsstellen bleiben erhalten während unspezifische Wechselwirkungen unterdrückt werden. Die Signalstärke in Western-Blot und ELISA wird erhöht.
- Die gebrauchsfertige Lösung erspart Ihnen das oftmals mühsame Lösen, wie es bei anderen kommerziell erhältlichen Blockierungsreagenzien üblich ist.
- ROTI®Block ist mit allen Chemilumineszenz-Systemen kompatibel.

B. Anwendung

ROTI®Block Arbeitslösung

Verdünnen Sie das ROTI®Block Konzentrat vor Gebrauch 1:10 mit H₂O_{dd}. Setzen Sie diese Arbeitslösung für die Blockierungsschritte und die Inkubation der Antikörper ein.

Variationen der Arbeitskonzentration

ROTI®Block kann in Konzentrationen von 10x (ohne Verdünnung) bis zu 0,1x (Verdünnung 1:100) eingesetzt werden. Die optimale Konzentration richtet sich hierbei nach der genaueren Art des Blots (Antigen/Antikörper-Kombination, Membran, Puffersystem etc.) und kann nur experimentell bestimmt werden. Bei den die allermeisten Blot-Detektionen führt allerdings die Anwendung von 1x ROTI®Block (Verdünnung 1:10) zu sehr guten Ergebnissen und sollte auf jeden Fall im ersten Ansatz verwendet werden. Eine Optimierung kann durch Variation der Konzentration in späteren Ansätzen erfolgen.

Kompatibilität mit Puffersystemen

ROTI®Block mit allen gängigen Puffersystemen verwendbar. Da ROTI®Block selbst auf einem Phosphatpuffersystem basiert, wird die größtmögliche Kompatibilität mit PBS/PBST oder ähnlichen, ebenfalls phosphatgepufferten Systemen erreicht.

Blot-Techniken und ROTI®Block

Bei Blotting-Techniken sollte die gesamte Membran durch die ROTI®Block Arbeitslösung bedeckt sein.

Blockierungszeit und Bedingungen

Die Blockierung erfolgt bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln. Blockierungszeiten von 30 min bis zu Übernacht-Inkubationen haben sich bewährt.

Primäre und sekundäre Antikörper

Die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern kann direkt in ROTI®Block Arbeitslösung erfolgen.

Alternativ kann die ROTI®Block Arbeitslösung nochmals 1:10 mit PBS oder PBST verdünnt werden.

In Antikörper-Nachweisreaktionen müssen alle Komponenten optimal aufeinander abgestimmt sein. Wir empfehlen deshalb, die Blockierungseffizienz in Ihrem spezifischen Nachweissystem vor Beginn der Versuche auszutesten uns zu optimieren. Bitte beachten Sie dies besonders bei Nachweissystemen mit Antikörpern, die spezifisch gegen Protein-Phosphorylierungen gerichtet sind, da es hier in Ausnahmefällen zu Wechselwirkungen mit dem Blockierungsreagenz kommen kann.

Tipp:

Führen Sie bei Verwendung von Peroxidasegekoppelten Reportermolekülen bitte vor dem Einsatz Ihres Chemilumineszenz-Substrats (ROTI®Lumin, P078, ROTI®Lumin plus, 3692, oder ROTI®Lumin ultra, 3734) drei Waschschritte mit PBS oder PBST durch.

C. Mehrmaliges Verwenden eines Blots - Entfernen gebundener Antikörper

Bei vergleichenden Analysen wird ein Blot nachfolgend mit mehreren Antikörpern inkubiert. Als Zwischenschritt können die Antikörper der vorherigen Inkubation vom Blot abgewaschen werden.

- Waschen der Membran in TBST-Puffer

- Inkubation in ROTI®Free Stripping-Puffer (Best.-Nr. 0083.1) für 30 min. bei 56 °C (z.B. im Schüttelwasserbad) im Abzug.

Zum Strippen von AP-Konjugaten empfehlen wir eine Inkubation bei 70 °C für 30-60 min. Nach 2maligem Waschen in TBST für je 20 min. sollte die Membran zunächst geblockt werden, bevor der erste Antikörper zugegeben wird. Eine Kontrolle des Strippens kann erfolgen durch kurze Chemolumineszenz-Färbung nach dem Waschen in TBST. Nach mehrmaligem Strippen kann eine leichte Abnahme der membrangebundenen Proteine und eine Zunahme des Hintergrundes auftreten.

- Waschen Sie die Membran bei Raumtemperatur für 2 x 10 min mit H₂O und anschließend 1 x 10 min in PBST oder TBST. Verwenden Sie für die Waschschritte große Volumina.

Tipp:

Bei Verwendung von ROTI®Block bleibt die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen unter diesen Bedingungen stabil. **Es ist kein weiterer Blockierungsschritt nötig.** Sie können direkt Ihren Blot mit dem nächsten Antikörper inkubieren.

TBST: ROTI®Stock 10 x TBST (Best. Nr. 1061.1)
(25 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl,
3 mM KCl, 0,05 % Tween 20)

PBST: ROTI®Stock 10 x PBST (Best. Nr. 1059.1)
(137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄,
2 mM KH₂PO₄, pH 7,4, 0,05 % Tween 20)

D. Lagerung

ROTI®Block sollte nicht über längere Zeit erwärmt oder starken Temperaturschwankungen ausgesetzt werden. Für die längerfristige Aufbewahrung ohne Verwendung empfehlen wir eine Lagerung bei ca. 15 °C. Ein entstehender Niederschlag kann in der Regel durch Bewegen auf einem Rührtsch bei etwa 24 °C innerhalb von ca. 24 Stunden wieder in Lösung gebracht werden.

ROTI®Block	A151.1	250 ml
	A151.4	500 ml
	A151.2	1 l
	A151.3	2,5 l

Instructions for use



ROTI®Block

Blocking reagent - for Western blotting and ELISA

A. Introduction

ROTI®Block is an innovative, ready-to-use blocking reagent made on a polymer basis with following advantages.

- Your detection system is not contaminated by any foreign proteins. The signal intensity remains constant.
- Specific binding sites are preserved whilst nonspecific reactions are suppressed. Signal intensity during Western blotting and ELISA is increased.
- The ready-to-use solution saves you time and labour by eliminating the need for dissolving.
- ROTI®Block is compatible with all chemiluminescent applications.

B. Application

ROTI®Block working solution

Dilute ROTI®Block (10 x concentrate) before use 1:10 with H₂O (distilled). The diluted solution can be used directly.

Variation of working concentration

ROTI®Block may be used in concentrations of 10x (w/o dilution) up to 0.1x (diluted 1:100) eingesetzt werden. Optimal concentrations depend on the parameters valid for the particular blotting system, like for instance, antibody / antigen pairing, membrane, buffer system used etc., and may be established by systematic screening.

However, for most blot detections a concentration of 1x ROTI®Block (dilution of 1:10) leads to very good results and is definitely recommended for use in the first approach. Optimisation may be done in subsequent approaches by varying the concentration used.

Compatibility with buffer systems

Overall, ROTI®Block may be used with all general buffer systems used for blotting detection. Since ROTI®Block itself is based on a phosphate buffered system, utmost compatibility is achieved by using PBS/PBST or similar buffer system for the whole approach.

Blotting applications and ROTI®Block

When blocking nonspecific binding sites on blots, the whole membrane should be covered with ROTI®Block working solution.

Blocking time and temperature

Blocking should occur under gentle shaking at room temperature. A blocking period from 30 mins to an overnight incubation has proved successful.

Antibodies and ROTI®Block

Incubate membrane with primary and secondary antibody diluted in ROTI®-Block working solution. Alternatively, incubation can occur in ROTI®-Block working solution diluted 1:10 in PBS or PBST. In detection systems using antibody-antigen binding, all components have to be established and optimally assembled. We, therefore, recommend to test and optimise the blocking efficiency in your specific detection system prior to starting important assays. Please consider this especially when using antibodies specifically directed against protein phosphorylations, since in exceptional cases interactions of such antibodies with the blocking reagent may cause weakness of signals or high background.

Tip: Following incubation with peroxidase-labeled (HRP) reporter molecules, perform at least three washes before using a luminol-based chemiluminescent detection system (ROTI®Lumin, P078, ROTI®Lumin plus, 3692, or ROTI®Lumin ultra, 3734).

C. Stripping and Reprobing

In comparative analysis a blot is subsequently probed with several primary antibodies. In order to do that, the

antibodies of the previous incubation should be removed from the blot.

- Wash membrane in TBST-buffer
- Incubate in ROTI®Free Stripping Buffer (Art. No. 0083.1) for 30 minutes at 56 °C (e.g. in a water bath with shaking device) in fume hood.

In order to strip AP-conjugates, we recommend incubation at 70 °C for 30-60 minutes. After washing twice in TBST for 20 minutes each time, the membrane should be blocked first before the first antibody is added. The stripping can be controlled with brief chemoluminescence staining after washing in TBST. A slight reduction of membrane-bound proteins and an increase in the background can occur after repeated stripping.

- Wash membrane at room temperature for 2 x 10 mins with H₂O and for 1 x 10 mins in PBST or TBST. Use large volumes for washing.

Tip: By using ROTI®Block the blocking of nonspecific binding sites will remain stable. **No additional blocking is required.** Your blot may now be directly incubated with the next antibody.

TBST: ROTI®Stock 10 x TBST (Art. No. 1061.1) (25 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05 % Tween 20)

PBST: ROTI®Stock 10 x PBST (Art. No. 1059.1) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 0.05 % Tween 20)

See also ROTI®Fair, our user friendly TBST and PBST tablets and pouches in our Webshop

D. Storage

ROTI®Block should neither be heated for a longer period nor go through several cooling and heating cycles. For longer-term storage without use, we recommend storage at approx. 15 °C. Any precipitate formed can usually be dissolved again within approx. 24 hours by agitating on a stirring table at approx. 24 °C.

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
P.O. Box 100121 • 76231 Karlsruhe
Phone: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.com • www.carlroth.com

s.s. 06/2021

The company is a limited partnership with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRA 100055. Roth Chemie GmbH, with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRB 100428, is the personally liable partner. Managing Director: André Houdelet. Sales tax identification number: DE 143621073.

ROTI®Block	A151.1	250 ml
	A151.4	500 ml
	A151.2	1 l
	A151.3	2.5