



ROTI®Lumin

Chemolumineszenz-Substrat für Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Reporter-moleküle

I. Beschreibung

ROTI®Lumin ist ein chemilumineszierendes Substrat für Anwendungen mit Peroxidase-gekoppelten Reporter-molekülen. ROTI®Lumin zeigt eine gute Sensitivität und kaum Hintergrundreaktion und kann in Blotting- und Mikrowell-Applikationen verwendet werden. ROTI®Lumin ermöglicht die mehrfache Verwendung eines Blots mit unterschiedlichen Proben. Versuchsergebnisse werden durch die Detektion mittels Röntgenfilmen dauerhaft dokumentiert. In Microwell-Applikationen werden die positiven Reaktionen schnell und einfach im Luminometer vermessen. ROTI®Lumin kann in Microwell- oder Blotting-Prozeduren, wie z.B. ELISA, Western-Blotting, Southern-Blotting, Dot-Blotting und Kolonie-Hybridisierungen verwendet werden.

II. Prinzip

Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) setzt in Anwesenheit von Wasserstoff-Peroxid Luminol um. Dabei entsteht ein Anion im angeregten Zustand. Beim Zurückfallen auf den Grundzustand wird Licht emittiert. Die maximale Intensität wird innerhalb von 5 Minuten erreicht und 1-2 h auf hohem Niveau gehalten.

III. Membranen

ROTI®Lumin kann mit Nitrocellulose, Nylon und PVDF-Membranen verwendet werden. Wir

empfehlen die Verwendung von ROTI®PVDF (T830.1), ROTI®Nylon plus (K058.1) und ROTI®NC Membranen (HP40.1).

IV. Blockierungsreagenzien

Wir empfehlen auf Milchpulver- oder Casein basierende Blockierungsreagenzien. Bei Verwendung von BSA oder serumbasierenden Blockierungsreagenzien kann ein erhöhter Hintergrund auftreten. Bei Western-Blot Applikationen empfehlen wir die Verwendung von ROTI®Block (A151.1), einem optimierten Blockierungsreagenz auf Polymerbasis.

V. Anwendung

- Führen Sie Ihre, Western-Bot bzw. die Immunnachweis-Prozedur durch.
- Führen Sie nach Verwendung des HRP-Antikörpers oder z.B. HRP-Streptavidin mindestens 3 Waschschritte im entsprechenden Puffer durch.
- Mischen Sie gleiche Volumina von ROTI®Lumin 1 und ROTI®Lumin 2. Erwärmen Sie diese ROTI®Lumin Arbeitslösung vor Gebrauch auf Raumtemperatur. Die ROTI®Lumin Arbeitslösung ist bei Raumtemperatur 1 h und im Temperaturbereich von 2 °C - 8 °C 24 h stabil. Sie muss nicht vor Licht geschützt werden.

Für ELISAs:

Wir empfehlen 100 µl /Well ROTI®Lumin Arbeitslösung und eine Integrationszeit im Luminometer von 1 Sekunde zu verwenden. Sie erhalten gleichbleibende Ergebnisse im Bereich von 5 - 45 min. nach Zugabe der ROTI®Lumin Arbeitslösung.

Für Blot-Applikationen:

Wir empfehlen, ca. 1 ml ROTI®Lumin Arbeitslösung pro 10 cm² Membran zu verwenden.

- Inkubieren Sie die Membran für ca. 1 min in ROTI®Lumin Arbeitslösung. Dieser Schritt kann bei Licht erfolgen.
- Entnehmen Sie die Membran der ROTI®Lumin Arbeitslösung und lassen Sie überschüssiges Substrat von einem Filterpapier aufsaugen. Halten Sie die Membran dabei senkrecht und berühren Sie mit einer Ecke der Membran das Filterpapier.
- Legen Sie die Membran zwischen zwei durchsichtige Plastikfolien (z.B. Prospekthülle).
- Legen Sie für 1-10 min einen Röntgenfilm auf. Die Licht-Emmission beginnt direkt nachdem die Membran der ROTI®Lumin Arbeitslösung entnommen wurde und bleibt ca. 1-2 h auf hohem Niveau.
- Entwickeln Sie den Film.

VI. Mehrmaliges Verwenden eines Blots, Entfernen von Antikörper und Sonden

Für Western-Blots

- Waschen der Membran in TBST-Puffer
- Inkubation in ROTI®Free Stripping-Puffer für 30 min. bei 56 °C (z.B. im Schüttelwasserbad) im Abzug.
- 2x Waschen in TBST für je 20 min.
- Blockieren der Membran (s. IV.)
- Zugabe des primären Antikörpers und weiterer Nachweis nach Protokoll.

Eine Kontrolle des Strippens kann erfolgen durch kurze Chemolumineszenz-Färbung nach dem Waschen in TBST. Nach mehrmaligem Strippen kann eine leichte Abnahme der Signale membrangebundener Proteine und eine Zunahme des Hintergrundes auftreten.

Anmerkung:

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.

Für Southern-Blots:

- Waschen Sie die Membran 5 min mit einem Waschpuffer.
- Bedecken Sie die Blotmembran mit Strip-Puffer (s.u.) und inkubieren Sie unter leichtem Schütteln bei 55 °C für 20 min.
- Waschen Sie die Membran 2 x 5 min in 2x SSC.
- Die Membran muss anschließend erneut prähybridisiert werden.

VII. Zusätzlich benötigte Reagenzien

Waschpuffer: (Beispiel)

100 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,5 % Tween 20.

Strip-Puffer:

Für Western-Blots: ROTI®Free Stripping-Puffer (Best.-Nr. 0083.1, 3337, 3319)

Für Southern-Blots: (auf 55 °C vorwärmen) 0,2 N NaOH, 0,1 % SDS

SSC: ROTI®Stock 20x SSC (Best. Nr. 1054.1)

TBST: ROTI®Stock 10 x TBST (Best. Nr. 1061.1)

PBST: ROTI®Stock 10 x PBST (Best. Nr. 1059.1)

Blockierung: ROTI®Block (Best. Nr. A151.1)

Casein (Best. Nr. 8569.1)

Milchpulver (Best. Nr. T145.1)

VIII. Trouble Shooting

Blotting

Zu starkes Signal oder hoher Hintergrund	<ul style="list-style-type: none"> • Vermindern Sie die Expositionszeit • Vermindern Sie die Konzentration des HRP-Konjugats • Erhöhen Sie die Blockierungszeit • Erhöhen Sie die Waschschritte • Tragen Sie weniger Probe auf das Gel auf
Kein Signal	<ul style="list-style-type: none"> • Überprüfen Sie den Transfer, indem Sie das entsprechende Gel mit Coomassie oder Ethidiumbromid färben

	<ul style="list-style-type: none"> • Überprüfen Sie den Proteintransfer, indem Sie die Membran mit Ponceau S oder Amido-Black anfärben • Überprüfen Sie, ob der HRP-Antikörper bezüglich Ihres primären Antikörpers spezifisch ist • „Verblitzen“ des Signals. Verringern Sie die Konzentration an primärem und sekundärem Antikörper
Schwaches Signal	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhen Sie die Expositionszeit • Legen Sie die Membran zur Exposition auf ein Filterpapier, das mit ROTI®Lumin getränkt ist • Erhöhen Sie die Konzentration des HRP-Konjugats • Erhöhen Sie die Inkubationszeit für das HRP-Konjugat • Tragen Sie mehr Probe auf das Gel auf

ELISA

Zu starkes Signal oder Hintergrund	<ul style="list-style-type: none"> • Vermindern Sie die Konzentration des HRP-Konjugats • Vermindern Sie die Inkubationszeit des HRP-Konjugats • Erhöhen Sie die Blockierungszeit • Erhöhen Sie die Waschschritte • Setzen Sie weniger Probe ein
Kein Signal	<ul style="list-style-type: none"> • Überprüfen Sie, ob der Luminometer korrekt arbeitet • Überprüfen Sie ob der HRP-Antikörper bezüglich Ihres primären Antikörpers spezifisch ist
Schwaches Signal	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhen Sie die Konzentration des HRP-Konjugats • Erhöhen Sie die Inkubationszeit für das HRP-Konjugat • Setzen Sie mehr Probe ein

IX. Lagerung

Lagern Sie ROTI®Lumin Stocklösungen immer lichtgeschützt bei ca. 4 °C (2-8 °C).

Angesetzte Arbeitslösungen können bei Raumtemperatur für ca. 1 h oder bei 4 °C für ca.

1 Tag aufbewahrt werden. Arbeitslösungen müssen nicht lichtgeschützt aufbewahrt werden.

X. Haltbarkeit

ROTI®Lumin Stocklösungen sind bei sach- und fachgerechter Lagerung 1 Jahr ab Produktion haltbar.

XI. Inhalt

Ein MINI-Kit enthält:

25 ml ROTI®Lumin 1 (P079)

25 ml ROTI®Lumin 2 (P080)

Ausreichend für 500 cm² Membran.

Ein Kit enthält:

120 ml ROTI®Lumin 1 (P079)

120 ml ROTI®Lumin 2 (P080)

Ausreichend für 2 400 cm² Membran.

Die Einzelbestandteile dieses Kits können nicht separat nachgekauft werden.

ROTI®Lumin	P078.2	1 Mini-Kit
	P078.1	1 Kit

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.de • www.carlroth.de

ip 07/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428. Geschäftsführer: André Houdelet