

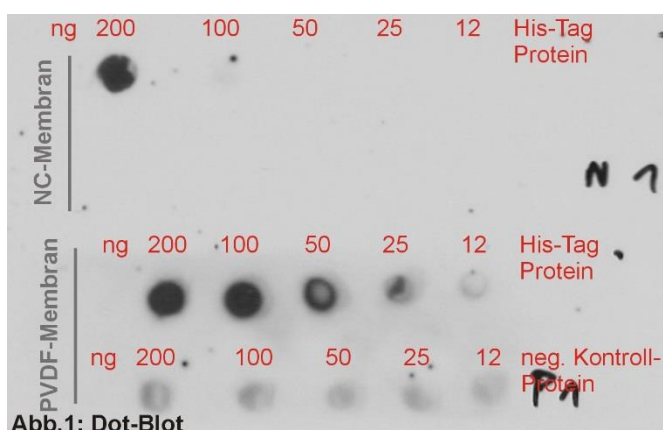


Etablierung des Anti-His-HRP Antikörpers (3894.1)

Verwenden Sie PVDF-Membranen, um ein gutes Signal zu erhalten (s.u.). Inkubieren Sie die Membran auf jeden Fall 1 min. in Methanol, schwenken Sie sie dann 1-2 min. in PBS.

Dot-Blot Verfahren

1. Herstellung einer Standardreihe mit der Kontrollproteinlösung durch sukzessive Verdünnung in Gelladepuffer (nach Lämmli, s.u.). Die Konzentration der Kontrollproteinlösung beträgt 3 mg/ml, davon repräsentiert das HIS-getaggte Kontrollprotein (40 kDa) 1/30 (100 ng/μl). Empfohlene Verdünnungsreihe: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. *Optional:* Von der eigenen Proteinlösung gleiche Verdünnungen in Gelladepuffer ansetzen.
2. Membran in Methanol und PBS inkubieren (s.o.), auf ein Filterpapier (s.u.) positionieren und die restliche Flüssigkeit mit einem Filterpapier absaugen.
3. Je 2 μl Kontrollproteinlösung und davon ausgehende Verdünnungsreihe aufpipettieren. Die Lösung sollte als distinkter Tropfen auf der Membran sichtbar bleiben und zieht etwa innerhalb einer Minute komplett ein. Aufgetragene Mengen: 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12 ng Kontrollprotein
Optional: Von der eigenen Proteinlösung ebenfalls 2 μl und eventuelle Verdünnungen aufpipettieren.
4. Nachdem die Proteinlösungen eingezogen sind, Membran noch ca. 1 min auf dem feuchten Papier inkubieren, um die Proteine fest an die Membran zu absorbieren. Die Membran muss hierbei feucht bleiben.
5. Blockierung: Inkubation in PBST (wir empfehlen 0,2 % Tween 20) mit 10 % fettarmem Milchpulver für 1 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (RT).
6. Antikörperinkubation: verdünnen von Anti-HIS-HRP 1:1000 in PBST (0,2 % Tween 20) mit 5 % fettarmem Milchpulver, Inkubation für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT.
7. Waschen: 3 x 10 min. in PBST (0,2 % Tween 20)
8. Detektion mit einem geeigneten Substrat, z.B. DAB, ROTI®Lumin oder ROTI®Lumin plus (s.u.). Exposition des Films für 1- 5 min.



Technische Info

Western-Blot Verfahren

1. Herstellung einer Standardreihe mit der Kontrollproteinlösung durch sukzessive Verdünnung in Gelladepuffer (nach Lämmli, s.u.). Die Konzentration der Kontrollproteinlösung beträgt 3 mg/ml, davon repräsentiert das HIS-getaggte Kontrollprotein (40 kDa) 1/30 (100 ng/µl). Empfohlene Verdünnungsreihe: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. *Optional:* Von der eigenen Proteinlösung gleiche Verdünnungen in Gelladepuffer ansetzen.
2. SDS-Gelelektrophorese nach Anleitung oder Standardprotokollen durchführen. Wir empfehlen eine 10 %ige Gelmatrix oder ein Gradientengel 4-20 %. Auftrag: jeweils 10 µl der unverdünnten Kontrollproteinlösung und der Verdünnungen. Aufgetragene Mengen: 1 µg, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62 ng Kontrollprotein *Optional:* Von der eigenen Proteinlösung ebenfalls 10 µl und eventuelle Verdünnungen aufpipettieren.
3. PVDF-Membran in Methanol und PBS inkubieren (s.o.). Das Gel nicht färben und nach Standardprotokollen transferieren. Das Kontrollprotein von 40 kDa muss hierbei sicher geblottet werden.
4. Färben sie das Gel nach dem Transfer zur Kontrolle (s.u.) und färben Sie die Membran mit Ponceau-Lösung (s.u.), um den korrekten Transfer zu überprüfen.
5. Membran in 10 mM Tris (pH 8,0) / 150 mM NaCl (s.u.) 10-20 min. bei Raumtemperatur (RT) entfärben und ca. 1 min. in PBS äquilibrieren.
6. Blockierung: Inkubation in PBST (wir empfehlen 0,2 % Tween 20) mit 10 % fettarmem Milchpulver für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT.
7. Antikörperinkubation: verdünnen von Anti-HIS-HRP 1:1000 in PBST (0,2 % Tween 20) mit 5 % fettarmem Milchpulver, Inkubation für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT.
8. Waschen: 4 x 10 min. in PBST (0,2 % Tween 20)
9. Detektion mit einem geeigneten Substrat, z.B. DAB, ROTI®Lumin oder ROTI®Lumin plus (s.u.). Exposition des Films für 1- 5 min.

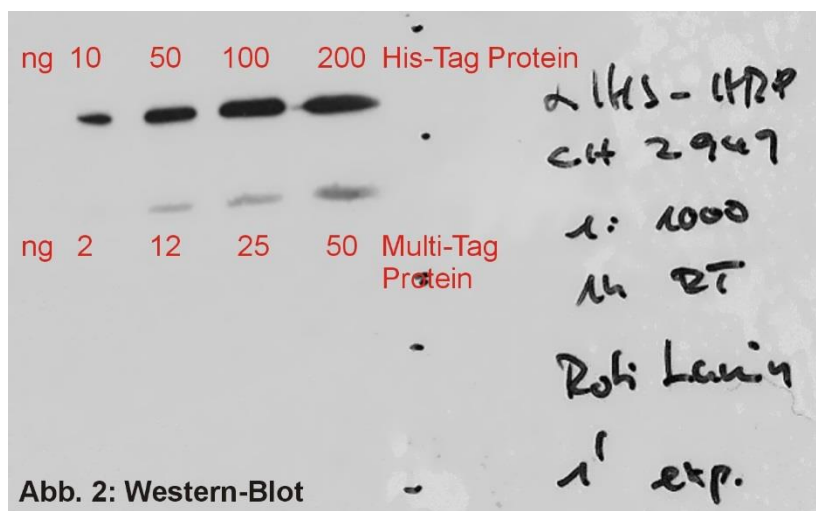


Abb. 2: Western-Blot

Technische Info

Empfohlene Reagenzien und Zubehör

Proteinladepuffer	ROTI®Load 1	(Best.-Nr. K929.1)
Proteinmarker	ROTI®Mark 10-150	(Best.-Nr. T850.1)
Gelfärbelösungen	ROTI®Blue quick (Schnellfärbung)	(Best.-Nr. 4829.1)
	ROTI®Blue (Coomassie® G250)	Best.-Nr. A152.2)
Ponceau-Färbung	Ponceau S	(Best.-Nr. 5938.2)
	Trichloressigsäure	(Best.-Nr. 8789.1)
Membran-Entfärbung	Tris	(Best.-Nr. 4855.1)
	NaCl	(Best.-Nr. 3957.3)
Membran	ROTI®PVDF	(Best.-Nr. T830.1) (Muster erhältlich)
Filterpapier	ROTILABO®Blottingpapier 0,35 mm	(Best.-Nr. CL64.1) (Muster erhältlich)
PBST	ROTI®Fair PBST 7.4 (Tabletten)	(Best.-Nr. 1116.1)
	ROTI®Stock-10x PBST	(Best.-Nr. 1059.1)
PBS	ROTI®Fair PBS 7.4 (Tabletten)	(Best.-Nr. 1112.1)
	ROTI®Stock-10x PBS	(Best.-Nr. 1058.1)
Detergenz	Tween 20	(Best.-Nr. 9127.1)
Blocking-Reagenz	Milchpulver, fettarm	(Best.-Nr. T145.1)
HRP-Substrate	ROTI®DAB Kit	(Best.-Nr. 9202.1)
	DAB	(Best.-Nr. CN75.1)
	ROTI®Lumin	(Best.-Nr. P078.2)
	ROTI®Lumin plus	(Best.-Nr. 3692.1)

MultiTag-Protein

0,1 mg/ml, affinitätsgereinigt, rekombinantes Protein mit His-Tag, GST-Tag, Myc- und DYKDDDDK-Ankersequenz.

Molare Masse (M) 31,6 g/mol, Lagertemp. -20 °C, Transporttemp.: gekühlt

Empfohlener Auftrag: 100 ng / Spur (Western-Blot), Verdünnung 1:100 (ELISA)

Markierung: His-Tag, GST-Tag, DYKDDDDK-Ankersequenz*, Myc-Ankersequenz

Anwendungen: Immunoblotting (Western-, Dotblot), ELISA, Proteinisolation

Aufreinigung und Spezifität: Affinitätsgereinigtes, rekombinantes Protein. Getestet für Affinitätschromatographie, Western-Blot und ELISA.

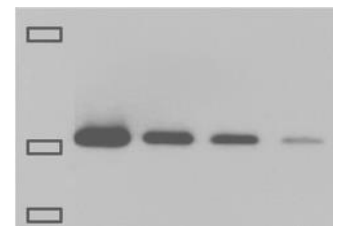
Lagerungspuffer: 1x PBS, pH 7,4

Stabilisierung: 0,1 % SDS

Abbildung: Western-Blot abnehmender Mengen des MultiTag-Proteins (300 ng - 10 ng). Nachweis mittels Anti-DYKDDDDK Serum (1:1000) und Roth Anti-Kanin-HRP. Detektion durch Chemolumineszenz.

Kästchen: Proteinmarker im Gel.

*Der DYKDDDDK-Anker ist sequenzidentisch mit der FLAG®-Sequenz von Sigma-Aldrich.



gh 02/2020