

Immunofärbung durch HRP und AP Protokolle

Färbung durch Peroxidase (in Lösung)

Ansatz für den Nachweis der Peroxidase-Aktivität (Immunoassay):

1 mg TMB (Best.-Nr. 6350) in 0,1 ml Dimethylsulfoxid (Best.-Nr. 4720) auflösen.
9,9 ml einer 0,1 M Natriumacetat-Lösung (pH 6,0) (Pulver: Best.-Nr. 6779) hinzufügen, filtrieren und H₂O₂ (Best.-Nr. 8070) (Endkonzentration 0,01 %) zugeben.

Immer frisch ansetzen!

Inkubation 10-30 min bei Raumtemperatur (ca. 50 µl pro Mikrotiterwell)
anschließend Zugabe von 50 µl 1 M H₂SO₄, Best.-Nr. X873, pro Well.
Photometrische Quantifizierung bei 450 nm.

Literaturhinweis: Bos E.S. *et. al.* (1981) *J. Immunoassay* 2:187

Färbung durch Alkalische Phosphatase (Präzipitat)

Versuchsprotokoll zur Anwendung von BCIP-p-Toluidinsalz/NBT bei Immunoblot-Verfahren:

Stammlösungen (Stabilität bei +4 °C ein Jahr):
0,5 g NBT (Best.-Nr. 4421) in 10 ml 70 % Dimethylformamid (Best.-Nr. T921).
0,5 g BCIP-p-Toluidinsalz (Best.-Nr. 6368) in 10 ml 100 % Dimethylformamid.
Inkubationspuffer für die Alkalische Phosphatase:
100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM TRIS (pH 9,5).

Frische Substratlösung:

66 µl der NBT-Stammlösung + 10 ml des Inkubationspuffers, gut mischen,
33 µl BCIP Stammlösung hinzufügen. Innerhalb einer Stunde verbrauchen.

Blot-Entwicklung:

Ca. 10 ml der Substratlösung pro 15 x 15 cm² Membranoberfläche.
Entwicklung bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden (ca. 30 min).

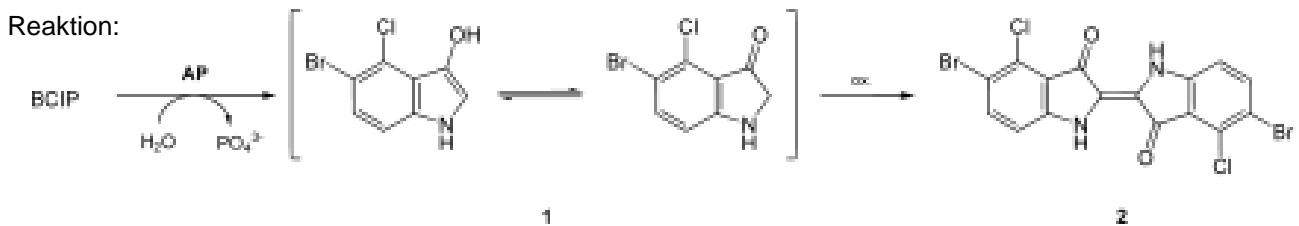
Reaktions-Stopp:

Mit PBS/20 mM EDTA spülen.

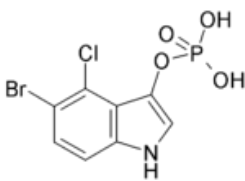
Technische Info

NBT / BCIP Reaktionsmechanismus

Von der alkalischen Phosphatase katalysierte Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP oder X-Phosphat) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT). Hierbei wird BCIP durch die enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe in das entsprechende Indoxyl überführt, das zu einem Keton tautomerisiert. Unter basischen pH-Werten dimerisiert das Keton und entwickelt eine schwach blaue Farbe, wobei H⁺ freigesetzt wird. Dieses reduziert schließlich das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zum purpurnen Diformazan. Beide Farbstoffe fallen dabei in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle aus und färben die entsprechende Stelle dunkelviolett an.



BCIP:



NBT:

