BIOZOL

Diagnostica Vertrieb GmbH, Oehleckerring 11-13

22419 Hamburg, Germany

Telephone: +49 (0)89 3799666-6 | **Fax:** +49 (0)89 3799666-99

E-Mail: info@biozol.de

Western Blot

Fluoreszenz-Western-Blotting mit Biotium

Biotium ist unser Partner für innovative Fluoreszenz-Tools, die Sie sonst nirgendwo finden. Die erfahrenen Chemiker und Biologen von Biotium entwickeln hochmoderne Fluoreszenz-Tools, die Wissenschaftlern durch überragende Leistung und fachkundige Unterstützung neue Möglichkeiten eröffnen.

Biotium bietet Ihnen Tipps zum Fluoreszenz-Western-Blotting.

Fluoreszenz-Western-Blotting

Protokoll von Biotium

Benötigte Materialien:

- VersaBlot™ Total Protein Normalization Kits von Biotium (optional)
- Ponceau S (optional)
- Blockierpuffer (siehe allgemeine Hinweise unten)
- PBS oder TBS mit 0,1 % Tween®-20 (siehe allgemeine Hinweise unten)
- Primärantikörper
- Sekundärantikörper (nicht erforderlich bei Verwendung eines markierten Primärantikörpers)

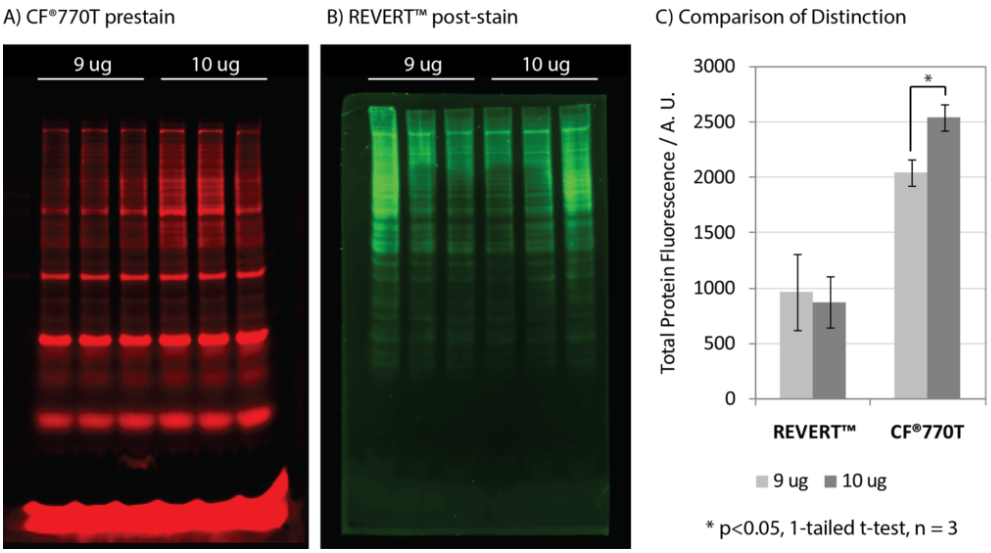


Abb: VersaBlot™ Total Protein Normalization Kit

Überblick:

1. Optional: Vorfärbung des Gesamtproteins
2. SDS-PAGE und Proteintransfer durchführen (~2 Stunden) (optionaler Haltepunkt)
3. Optional: Proteintransfer überprüfen
4. Blockierung (30–60 Min.)
5. Inkubation mit dem Primärantikörper (2 Stunden oder über Nacht)
6. Waschschritte (~30–60 Min.)
7. Inkubation mit dem Sekundärantikörper (bei markiertem Primärantikörper nicht erforderlich) (30 Min. bis 2 Stunden)
8. Waschschritte (~30–60 Min.)
9. Membran trocknen (optionaler Haltepunkt)
10. Fluoreszenz scannen

Allgemeine Überlegungen zum fluoreszierenden Western-Nachweis:

- Der Multiplex-Fluoreszenz-Western-Nachweis erfordert ein Bildgebungssystem, das in der Lage ist, mehrere fluoreszierende Konjugate zu erkennen. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollten Sie einen Gel-Imager oder Scanner verwenden, der speziell für die Bildgebung von fluoreszierenden Blots entwickelt wurde.

- Far-Red- oder Nahinfrarot-Farbstoffe sind für den fluoreszierenden Western-Blot optimal, da der Hintergrund in diesen Wellenlängen geringer ist. Sichtbare Fluoreszenzfarbstoffe können verwendet werden, weisen jedoch aufgrund der höheren Autofluoreszenz von Proteinen und Blotting-Membranen im sichtbaren Spektrum in der Regel ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis auf.
- Die optimale Proteinbeladungsmenge variiert je nach Detektionsmethode und Expressionsniveau des Zielproteins, liegt jedoch bei den meisten Anwendungen zwischen 1 und 10 µg/Spur.
- Blaue Markierungsfarbstoffe im SDS-PAGE-Beladepuffer können im fernroten/nahinfraroten Spektrum fluoreszieren; für den Fluoreszenz-Western-Nachweis wird ein Beladepuffer mit einem orangefarbenen Markierungsfarbstoff empfohlen.
- Für den fluoreszierenden Western-Blot können sowohl Nitrocellulose- als auch PVDF-Membranen verwendet werden, allerdings kann die Autofluoreszenz je nach Hersteller der Blotting-Membran stark variieren. Nach unseren Erfahrungen weisen Nitrocellulose- und PVDF-Membranen mit geringer Fluoreszenz eine ähnliche Hintergrundfluoreszenz auf, doch PVDF kann eine höhere Empfindlichkeit bieten, möglicherweise aufgrund einer stärkeren Proteinbindung.
- Nach dem Proteintransfer können getrocknete Blotting-Membranen vor dem Nachweis monatelang bis zu mehreren Jahren bei Raumtemperatur gelagert werden.
- 9-cm²-Petrischalen fassen 5–10 ml und eignen sich gut zum Waschen und Inkubieren von Mini-Blots. Alternativ sind im Handel schwarze Blotting-Boxen für fluoreszierende Western-Blots in verschiedenen Größen für Blots oder Membranstreifen erhältlich.
- Vor der Entwicklung chemilumineszenz- und fluoreszenzbasierter Western-Nachweismethoden wurden für den Western-Nachweis üblicherweise Substrate für alkalische Phosphatase verwendet. Damals war Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) der Puffer der Wahl für Western-Blots, da Phosphatpuffer die Signalentwicklung der alkalischen Phosphatase stören konnten. Nach unserer Erfahrung können PBS und TBS für den routinemäßigen fluoreszierenden Western-Nachweis mit ähnlichen Ergebnissen verwendet werden. Einige Forscher bevorzugen TBS für den Nachweis von Phosphoproteinen, da sie befürchten, dass Phosphatpuffer die Bindung von phosphospezifischen Antikörpern stören könnten.
- BSA, Magermilchpulver und Fischgelatine können als Blockier- und Antikörperverdünnungspuffer für Western Blots verwendet werden. Diese Blockiermittel werden üblicherweise in einer Konzentration von 1–5 % in PBS (oder TBS) + 0,1 % Tween®20 eingesetzt. Kommerziell erhältliche Blockierpuffer, die speziell für den fluoreszierenden Western-Nachweis entwickelt wurden, wie beispielsweise unser TrueBlack® WB Blocking Buffer, können einen geringeren Hintergrund als andere Blockiermittel liefern.

- Es kann sinnvoll sein, das Volumen der für das Blotting verwendeten Antikörperlösungen durch die Verwendung von verschließbaren Beuteln oder kleinen Behältern zu minimieren. Es sollte jedoch genügend Lösung verwendet werden, damit sich diese ungehindert über den Blot bewegen kann, ohne dass sich Blasen bilden.
- Bei den Blockierungs- und Waschschritten sollten Sie nicht am Volumen sparen. Verwenden Sie für einen Mini-Blot 5–10 ml Puffer. Der Blot sollte sich ungehindert im Puffer bewegen können.

Prozedur:

1. Optional: Um das Gesamtprotein in Ihrer Probe zur Bestätigung des Transfers und zur Western-Normalisierung fluoreszenzmarkiert zu machen, verwenden Sie ein Kit zur Vorfärbung des Gesamtproteins, wie beispielsweise unsere VersaBlot™ Total Protein Normalization Kits, und befolgen Sie dabei die Anweisungen des Kits.
2. Führen Sie die SDS-PAGE und den Western-Transfer gemäß den Standardprotokollen durch.
3. Hinweis: Nach dem Transfer können die Membranen mit Wasser gespült, getrocknet und zwischen Filterpapierblättern bei Raumtemperatur über Monate oder länger gelagert werden.
4. Optional: Bestätigen Sie den Proteintransfer durch Abbildung der Vorfärbung des Gesamtproteins (falls verwendet) oder durch Färbung der Membran mit Ponceau-S-Farbstoff gemäß den Anweisungen des Herstellers.
5. Hinweis: Ponceau S kann zur visuellen Färbung von Zelllysatproteinen bei ca. 10 µg Gesamtprotein pro Spur verwendet werden, ist jedoch möglicherweise nicht empfindlich genug, um geringere Proteinbeladungsmengen nachzuweisen. Unser Mix-n-Stain™ Total Protein Prestain Kit kann bereits 1 ng Gesamtprotein pro Spur nachweisen.
6. Bei Verwendung von PVDF-Membranen befeuchten Sie die Membran erneut mit Methanol und spülen Sie sie anschließend mit Wasser ab. Bei Nitrocellulose-Membranen fahren Sie mit Schritt 5 fort.
7. Legen Sie den Blot in eine saubere Schale mit einem Blocking-Puffer Ihrer Wahl. Verwenden Sie ausreichend Puffer, damit der Blot vollständig bedeckt ist und sich frei in der Schale bewegen kann.
8. Blockieren Sie die Membran 30 Minuten bis 1 Stunde lang bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.
9. Verdünnen Sie den primären Antikörper auf die empfohlene Konzentration in frischem Blocking-Puffer. Gießen Sie den Blocking-Puffer ab und geben Sie so viel verdünnte Antikörperlösung hinzu, dass sich die Membran frei bewegen kann, ohne dass Blasen oder

trockene Stellen zurückbleiben.

10. Inkubieren Sie die Membran unter leichtem Schütteln 1–2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Bei Verwendung fluoreszenzmarkierter primärer Antikörper vor Licht schützen.
11. Spülen Sie die Membran dreimal mit PBS oder TBS mit 0,1 % Tween®-20 und waschen Sie sie anschließend fünfmal jeweils 5–10 Minuten lang unter Schwenken. Verwenden Sie eine großzügige Menge Waschpuffer, damit sich die Blots während des Waschens frei bewegen können.
12. Wenn Sie fluoreszenzmarkierte Primärantikörper verwenden, fahren Sie mit Schritt 11 fort. Wenn Sie markierte Sekundärantikörperkonjugate verwenden, fahren Sie mit Schritt 10 fort.
13. Verdünnen Sie den Sekundärantikörper in frischem Blocking-Puffer in der vom Hersteller für den Western Blot empfohlenen Konzentration (in der Regel im Bereich von 50–100 ng/ml). Geben Sie ihn wie in Schritt 7 auf den Blot. Inkubieren Sie 30 Minuten bis 2 Stunden unter leichtem Schütteln.
14. Hinweis: Bei einigen Sekundärantikörper-Konjugaten im nahen Infrarotbereich muss dem Puffer zusätzliches Detergens zugesetzt werden. Beachten Sie die Empfehlungen in den Herstellerangaben zu Ihrem Antikörperkonjugat und Ihrem Blocking-Puffer.
15. Waschen Sie die Membran wie in Schritt 9 beschrieben.
16. Spülen Sie den Blot einmal in Puffer ohne Detergens ab und trocknen Sie ihn, bevor Sie ihn mit einem kompatiblen Fluoreszenz-Bildgebungssystem abbilden.
17. Hinweis: Getrocknete Blots können zwischen Filterpapierblättern bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und nach Monaten oder sogar Jahren erneut gescannt werden.
18. Hinweis: Halten Sie die Blots stets feucht und lagern Sie sie in Puffer, wenn sie gestrippt und mit weiteren Antikörpern untersucht werden sollen.