

Immunofärbung durch HRP und AP

Protokolle

Färbung durch Peroxidase (in Lösung):

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

0,1 mg TMB in 0,1 ml Dimethylsulfoxid auflösen. 9,9 ml einer 0,1 M Natriumacetat-Lösung (pH 6,0) hinzufügen, filtrieren und H₂O₂ (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 pro Well).
Photometrische Quantifizierung bei 450 nm.

Literaturhinweis: BOS, E.S. u.a. (1981) *J. Immunoassay* 2, (3/4), 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 in 10 ml 70 % Dimethylformamid.

0,5 g BCIP-p-Toluidinsalz 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.

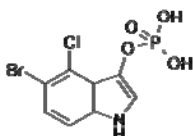
NBT / BCIP Reaktionsmechanismus

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.

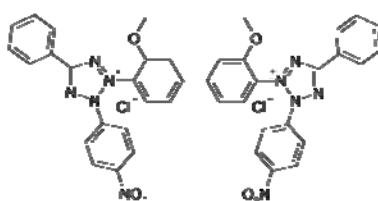
Reaktion:



BCIP:



NBT:



Carl Roth GmbH + Co. KG

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

gk 08.2008