

PRODUKT-INFORMATION

AquaSpark™ Alkaline Phosphatase Substrate

Kat.-Nr. 42593

AquaSpark™ Alkaline Phosphatase Substrate ist ein optimiertes Chemilumineszenzsubstrat für den Nachweis von alkalischer Phosphatase (AP) in Immunoassays, insbesondere im ELISA. Das Substrat ist ebenfalls für den Nachweis von von AP-konjugierten Antikörpern im Western- oder Southern Blot geeignet.

Lagerung: Die AquaSpark™ Alkaline Phosphatase Substrate Stocklösung (2 mM in DMSO) sollte bei -15 °C bis -25 °C lichtgeschützt gelagert werden.

Arbeitslösung

Zur Herstellung der Arbeitslösung wird die Stocklösung mit 100 mM Tris-HCl, pH 9,7, mit 1 mM MgCl₂ verdünnt. Die frisch hergestellte Arbeitslösung vor Gebrauch 30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Durch diese kurze Vorinkubation wird das durch freie Dioxetan-Moleküle verursachte Hintergrundsignal beseitigt.

Die AquaSpark™ Arbeitslösung ist bei Raumtemperatur über mehrere Stunden und bei +2 °C bis + 8 °C bis zu einer Woche stabil.

Die empfohlene Endkonzentration des AquaSpark™ Substrates beträgt 10 µM. Für optimale Ergebnisse kann die Endkonzentration des Substrates für die jeweiligen Testbedingungen angepasst werden.

Zur Herstellung von 2 ml einer 10 µM Arbeitslösung wird die Substrat-Stocklösung wie folgt verdünnt: 10 µl AquaSpark Alkaline Phosphatase Substrat (2 mM in DMSO) werden zu 1990 µl Tris-Pufferlösung gegeben, anschließend gut mischen.

100 µl AquaSpark™ Alkaline Phosphatase Substrat (2 mM in DMSO) ergeben 20 ml Arbeitslösung.

Emission und Detektion

Das Emissionsmaximum des aktivierten Substrates liegt bei 508 nm. Für die Detektion der AquaSpark™ Chemilumineszenz wird der Bereich 500 - 520 nm empfohlen.

Sandwich-ELISA Protokoll

1. Beschichtung des ELISA-Platte mit einer definierten Menge Fänger-Antikörper.
2. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen an der Plattenoberfläche.
3. Pipettieren der Antigen-haltigen Probe auf die Platte.
4. Waschen der Platte, so dass ungebundenes Antigen beseitigt wird.
5. Zugabe eine Antigen-spezifischen Antikörpers (Primärantikörper).
6. Zugabe eines AP-markierten Sekundärantikörper zur Detektion.
7. Waschen der Platte, so dass ungebundener Sekundärantikörper beseitigt wird.
8. Herstellung der Substrat-Arbeitslösung und die frische Arbeitslösungen vor Gebrauch 30 min inkubieren. Alternativ kann die Lösung auch am Vortag vorbereiten und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden.

PRODUKT INFORMATION

AquaSpark™ Alkaline Phosphatase Substrate

Kat.-Nr. 42593

Western Blot Protokoll

- Puffer zur Herstellung der Blockierungs- und Waschlösung

TBS-T Puffer:

1x TBS Puffer (SERVA Kat.-Nr. 42596, 10x Konzentrat)
mit 0,05 % (v/v) Tween 20 (SERVA Kat.-Nr. 37170)

1. Die Proteine werden mittels Elektrophorese, z. B. SDS PAGE getrennt.
2. Anschließend werden die Proteine aus dem Gel mittels Elektro-Blotting (Semi-dry oder Tank) auf eine Membran (PVDF, Nitrocellulose) transferiert.
3. Nach dem Blotten wird die Transfermembran gründlich mit dest. H₂O gespült.
4. Danach wird die Blot-Membran für 20 - 60 min in Blockierungspuffer (Mini-Gel Format: 20 ml) unter Schütteln, z. B. mit SERVA BlueShake inkubiert. Alternativ kann der Blockierungsschritt auch über Nacht bei +4 °C erfolgen.
5. Min. 1 h Inkubation der Blotmembran mit Primärantikörper (Verdünnung in Blockierungspuffer) unter Schütteln, z. B. mit SERVA BlueShake bei RT.
6. Waschen der Membran: 5 x mit 30 ml TBS-T jeweils 5 min.
7. 30 min Inkubation der Blotmembran mit AP-markiertem Sekundärantikörper (Verdünnung in Blockierungspuffer entsprechend den Herstellerangaben) unter Schütteln, z. B. mit SERVA BlueShake bei RT.
8. Waschen der Membran: 5 x mit 30 ml TBS-T jeweils 5 min.
Längeres Waschen reduziert die Hintergrundsignale.
9. Herstellung der Substrat-Arbeitslösung (5 -1 0 ml für Minigel-Format) und die frische Arbeitslösungen vor Gebrauch 30 min inkubieren. Alternativ kann die Lösung auch am Vortag vorbereiten und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden
10. Die Substrat-Arbeitslösung wird direkt auf die Membran pipettiert, überschüssige Lösung entfernen.
11. Detektion und Analyse der Chemilumineszenz erfolgt entweder mit eine geeigneten Dokumentationsystem, z. B. SERVA Musketeer oder mit Hilfe eines Films.
12. Wird ein Film zur Bildgebung verwendet, sollten eine geeignete Fixierungs- und Entwicklungslösung benutzt werden.

Die Lichtemission von AquaSpark™ ist intensiv. Wir empfehlen deshalb kurze Belichtungszeiten.

Vers 0219