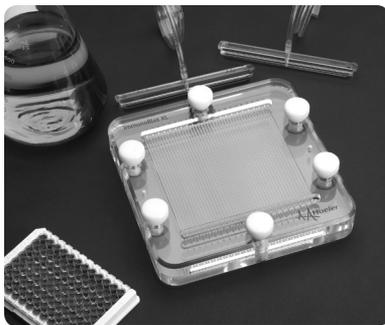
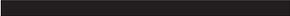


ImmunoBlot e ImmunoBlot XL

Instruções de operação





Conteúdo

Introdução	1
Desembalar e inventário.....	2
Instruções.....	3
Selecione e bloquear membrana	3
Coloque membrana.....	3
Aspirar e apresentar soluções de anticorpos.....	4
Incubar.....	4
Remover soluções de anticorpos primários e lavar a mancha.....	5
Introduzir anticorpo secundário e incubar	6
Remover e desenvolver o blot	7
Limpar o ImmunoBlot.....	7
Solução de problemas.....	8
Apêndice A: Notas técnicas.....	10
Apêndice B: Detecção utilizando ECL ocidentais sistemas de detecção de blotting	16
Solicitação de informações.....	18

Introdução

Transferência de proteínas ou ácidos nucleicos, fraccionados por electroforese em gel, para uma superfície da membrana imobilizante aumenta a sensibilidade de uma vasta gama de métodos de detecção, reduz o tempo de análise e faz sequencial de sondagem possível. Em particular, fez eventual utilização de processos imunológicos que não são práticos para levar a cabo em um gel. Para material de ensaio sobre uma folha de membrana com sondas diferentes simultaneamente comumente requer primeiro o corte da membrana, para um número de tiras paralelas. Este procedimento no entanto destrói a correspondência entre as pistas ou posições diferentes sobre um gel.

O ImmunoBlot® e ImmunoBlot XL preservar essa correspondência, minimizando o volume de reagentes de detecção necessários para pistas individuais. Duas placas de plástico transparente, uma lisa e uma com canais, um grampo 15 × 15 cm a membrana de transferência de definir e separar as pistas de gel originais em canais individuais. Estes canais separados permitem o uso de reagentes de detecção diferentes (anticorpos primários, secundários conjugados de anticorpos, antigénios e/ou substratos de reacção) em cada canal.

Existem 2 principais aplicações para o ImmunoBlot e ImmunoBlot XL:

Anti-soros múltipla ou sondas podem ser testados contra uma única amostra de proteína ou de ácidos nucleicos. A única amostra é carregada através de toda a parte superior de uma placa de gel, em seguida, executar e apagar a uma membrana. Quando fixada ao ImmunoBlot, a membrana pode ser testada contra os anti-soros múltipla ou sondas.

Um anti-soro única ou sonda pode ser testada contra antigénios múltiplos ou ácidos nucleicos.

Os dois modelos diferem no número e volume dos canais para reagentes. O ImmunoBlot tem 25 canais que mantêm um volume máximo de 250 µl cada. O ImmunoBlot XL tem 45 canais que mantêm um volume máximo de 140 µl cada.

Desembalar e inventário

Desembrulhe com cuidado todos os pacotes e comparar o conteúdo com a lista de embalagem, certificando-se todos os itens chegaram. Se qualquer parte estiver faltando, entre em contato com seu escritório de vendas local. Inspeccione todos os componentes de danos que possam ter ocorrido quando o aparelho estava em trânsito. Se qualquer parte estiver danificado, contate imediatamente a transportadora. Certifique-se de manter todo o material de embalagem para pedidos de indemnização ou de usar caso seja necessário para devolver a unidade.

Instruções

O detalhe a seguir os passos para a sondagem de uma membrana usando o ImmunoBlot.

Selecione e bloquear membrana

①

Selecione uma membrana de escolha (nitrocelulose, Hybond ECL™; PVDF, Hybond P; baixo fluorescente PVDF, Hybond LFP) para o ensaio e cortada para:

Comprimento: 15 cm

Largura: Corte para acomodar canais a serem utilizados, largura máxima para todos os canais: 15 cm

②

Bloquear membranas com a proteína não-específica em excesso.¹

③

Nota: Se as membranas foram bloqueadas armazenado numa solução de proteína livre, re-bloqueá-las durante 1 a 2 minutos num tabuleiro de solução de bloqueio.

Coloque membrana

①

Remova a placa de acrílico topo da ImmunoBlot e vire-o.

②

Com o rosto antígeno-rolamento da membrana enfrentar os canais ImmunoBlot, posicionar a membrana de modo que abrange todos os channels.²

③

Coloque um novo, a almofada de vedação seco (fornecido com a unidade) sobre a membrana.

④

Definir a placa de fundo da unidade de sobre a placa de topo de modo invertido os pinos de alinhamento cair no lugar.

⑤

Garantir que não haja diferença entre as placas superior e inferior.

¹Ver Apêndice A, Nota 1, Bloqueio da membrana.

²Ver Apêndice A, Nota 2, Alinhamento da membrana.

Recomendação: Use uma ponta de pipeta descartável ligado a um aspirador de vácuo água para esta finalidade.

Importante! Tome cuidado para não tocar a ponta da pipeta em qualquer lugar na unidade, exceto no buraco amostra desejada.

Aspirar e apresentar soluções de anticorpos

1

Aspirar o excesso de líquido a partir dos canais através dos orifícios numerados.

Nota: Para evitar a secagem da membrana, os canais devem ser carregados dentro de cinco (5) minutos de aspiração.

2

Adição da solução de anticorpo através dos orifícios numerados.

Pressione a ponta da pipeta firmemente em cada buraco e injetar o líquido rapidamente em uma única ação suave até que o canal está cheio. Tome cuidado para não introduzir bolhas.³

3

Adicionar tampão para todos os canais não utilizadas, que cobrem a membrana.

modelo	número de canais	volume do canal aproximada ⁴
ImmunoBlot	25	250 µl
ImmunoBlot XL	45	140 µl

Incubar

1

Coloque a unidade numa plataforma de agitação com os canais alinhados na direcção do balanço.

Nota: Para obter melhores resultados, use uma velocidade de agitação lenta (5 a 6 ciclos de inclinação por minuto). Uma plataforma giratória agitação não é eficaz para esta finalidade.

2

Incubar a unidade sobre a plataforma de agitação durante 30 a 60 minutos à temperatura ambiente.

³Ver Apêndice A, Nota 3, Eliminando bolhas.

⁴Ver Apêndice A, Nota 4, Volumes óptimos.

Remover soluções de anticorpos primários e lavar a mancha

Use o colector de lavagem para remover a solução de anticorpos e lavar o blot.

1

A posição das 2 partes idênticas do colector de lavagem nas ranhuras em cada lado da placa de topo e pressionar firmemente até que os O-rings estão sentados na slots.⁵

2

Para aspirar todas as amostras simultaneamente, primeiro ligar peças da tubagem fornecido com a unidade de ambas as partes do colector usando um encaixe luer. Agora, ligar a extremidade aberta do tubo a partir do pedaço colector para uma armadilha ligado a uma fonte de vácuo.

Em seguida, coloque a extremidade aberta do tubo a partir do pedaço segundo colector para um copo contendo tampão de lavagem.

Quando iniciar as soluções de vácuo de anticorpos nos canais são removidos eo tampão de lavagem é extraída a partir do outro lado. Consulte o seu protocolo de detecção Ocidental para obter instruções de lavagem. Para a detecção Ocidental recomendamos, pelo menos, 2 lavagens rápidas em tampão seguido por duas lavagens mais longos em tampão (5 min enquanto de balanço é suficiente) antes de introduzir os anticorpos secundários.

⁵Ver Apêndice A, Nota 5,
Montagem dos anéis nas ranhuras.

Introduzir anticorpo secundário e incubar

A incubação do anticorpo secundário pode ser realizada quer na unidade ou em uma bandeja.⁶

Para realizar a incubação na unidade ImmunoBlot:

1

Injectar a solução de anticorpo secundário para os canais cuidadosamente com uma pipeta única ou multi-canal.

2

Incubar a unidade numa plataforma de agitação com os canais alinhados na direcção de balançar para 30 a 60 minutos à temperatura ambiente.

3

Aspirar a solução de anticorpo secundário usando uma fonte de vácuo ou pipeta, tal como descrito antes (página 5, passo 2) e lava-se o blot com tampão de lavagem durante alguns segundos. Lavar o blot evita a contaminação cruzada de canais por diferentes anticorpos secundários em todos os canais ao remover a mancha da unidade.

⁶Ver Apêndice A, Nota 6, Incubação do anticorpo secundário.

Remover e desenvolver o blot

1

Desparafuse o ImmunoBlot e separar as duas metades.

2

Descartar o bloco de vedação utilizado e lavar a membrana num tabuleiro com 3 a 5 mudanças de tampão para um total de 10 a 15 minutos.

3

Desenvolver a mancha seguindo as instruções do seu kit de detecção Ocidental (Ver também o Apêndice B).

Limpar o ImmunoBlot

Limpar a unidade completamente depois de cada utilização efectuando o seguinte:

1

Lavar a unidade ImmunoBlot e multiforme a lavagem em água destilada.

2

Use um não abrasivo, um agente de limpeza alcalina laboratório que não deixa resíduo após a lavagem, tal como um detergente para a limpeza de artigos de vidro destina-se a cultura de tecidos. Agentes de limpeza concentrados devem ser diluídas a força normal.

3

Mergulhe a unidade ImmunoBlot e colector de lavagem em solução de limpeza e escova suavemente com uma escova macia tomando cuidado para não arranhar as superfícies interiores.

4

Lavar a unidade ImmunoBlot e lavagem colector cuidadosamente com água da torneira, seguido por água destilada.

Para facilmente enxaguar os pequenos furos numerados, montar a unidade e as unidades múltiplas sem uma membrana e uma almofada de vedação, e lavar com água destilada.

Recomendação: Uma solução de 1% da solução de limpeza 7X (Flow Laboratories, 50 ml de concentrado em 5 litros de água quente).

Nota: Não autoclave o aparelho ImmunoBlot ou colector de lavar roupa.

Não exponha a unidade ImmunoBlot ao álcool ou outros solventes orgânicos.

Solução de problemas

problema	causas possíveis	recomendações
Vazamento - A solução de anticorpo mudou-se para canais adjacentes.	As zonas secas da membrana actuar como mechas para o fluido a partir de áreas adjacentes.	Sempre pré-molhado a membrana antes da montagem no aparelho. Encher cada canal, que cobre a membrana com tampão.
	Membrana não cobrir o comprimento total do canal.	Assegurar que a membrana é cortado no tamanho correcto.
	Fluido em canais sobrecarregados derramou quando a unidade foi abalada causando a contaminação dos canais adjacentes.	Não encha demais canais.
	Almofadas reutilizados de vedação não vedação adequada.	Não re-utilizar blocos de vedação como eles comprimem durante o uso.
	Incubação bandeja.	Considere incubando sua blot com anticorpo secundário no ImmunoBlot ao invés de incubação bandeja. (Veja o Apêndice A:. Nota 6)
	Membrana é despojado de bloqueio da proteína.	Por favor, tome cuidado para não retirar a mancha de bloquear a proteína, enquanto a lavagem antes da adição do anticorpo primário. Por favor, siga as instruções do seu kit de detecção de Western blotting. Um protocolo de amostra é dado no Apêndice B.
Sensibilidade baixa	Canais sujos continham anticorpos que contaminou o experimento.	Limpe o aparelho após cada utilização. Para dicas de limpeza, consulte a seção a Limpo ImmunoBlot, na página 7.
	Quando baixa afinidade ou anticorpos título baixo são utilizados a uma diluição elevada (1:100.000 ou superior), alguma diminuição da intensidade do sinal podem ser observadas. Os anticorpos podem tornar-se empobrecido no pequeno volume do canal de ImmunoBlot.	Aumentar o anticorpo de dobragem 2-5 conc. Aumentar o volume de solução de anticorpo por canal. Para fazer isso, insira padrão 200 µl ponteiras plásticas em ambas as portas de entrada para cada canal. Estes irão servir como reservatórios para volumes de amostra maiores do que o volume do canal em si, enquanto que a incubação no balancim. Injectar a amostra de anticorpo utilizando uma ponta que, em seguida, permanece na porta de entrada e transforma-se tal reservatório um. Realizar as incubações anticorpo secundário em uma bandeja. (Veja o Apêndice A, Nota 6.)

problema	causas possíveis	recomendações
Bolhas (Nota: Pequenas bolhas geralmente se movem quando a unidade é abalada e geralmente não afetam os resultados)	Soluções eram muito frias.	Trazer soluções à temperatura ambiente antes de colocar as amostras.
	Gás dissolvido emerge a partir da solução como a temperatura sobe.	
	Canais continha gotas residuais de líquido antes de as amostras foram carregadas.	Inclinar a unidade e líquido aspirado a partir da extremidade inferior de cada canal com uma ponta de pipeta de plástico ligado a um vácuo forte.
	Técnica de pipetagem incorreta foi usada.	Assento a ponta da pipeta firmemente no furo numerados e dispensar a amostra com uma única acção suave.
	Almofadas de vedação estavam úmidos antes da montagem.	Certifique-se que as almofadas de vedação estão secos antes de montá-los no ImmunoBlot.
	Má qualidade ou mal conservados pipeta introduzida bolhas nos canais.	Tentar injetar amostras com uma pipeta ou marca diferente de ponta.
Manifold é difícil de inserir.	Bolhas formadas ao longo do tempo.	Coloque uma camada de plástico entre a membrana eo bloco de vedação.
	O-rings podem necessita de lubrificação ou substituição.	Para lubrificar: <ul style="list-style-type: none"> • Remover os O-rings cuidadosamente com a ponta de uma espátula plana de pesagem. • Aplique graxa de silicone de ânimo leve. • Reinstalar.

Apêndice A: Notas técnicas

Nota 1: Bloqueio da membrana

As membranas devem ser sempre bloqueado antes de montar no ImmunoBlot. Por favor, siga as instruções para o bloqueio previsto no seu kit de detecção de Western blotting.

Geralmente, 5% de leite magro seco ou 5% de BSA são utilizados como agentes de bloqueio.

O bloqueio com detergentes de Tween-20 ou outro por si só não é recomendado porque pode causar difusão lateral lenta de proteínas através da membrana de nitrocelulose. Sugerimos realizar o passo inicial de bloqueio em uma solução contendo proteína (tal como BSA a 5%), sem detergente. Evitar lavagens extensas com soluções contendo nenhuma proteína antes da montagem da membrana na ImmunoBlot.

Em muitos casos, o bloqueio de satisfatórios podem ser alcançados por incubação com PBS/10% de vitelo recém-nascido serum/0.1% de Tween-20 para um mínimo de uma hora à temperatura ambiente. No entanto, agentes bloqueadores diferem na sua eficácia dependendo das circunstâncias. Para blots de lisados de células inteiras, bloqueando com 50 a 100% de soro pode ser muito eficaz na redução da ligação não específica.

Nota 2: Alinhar a membrana

Para experiências ocidentais blotting, é importante que faixas de rodagem e bandas de proteína na membrana alinhem com os canais da unidade de ImmunoBlot. Isto pode ser realizado em 2 passos:

Passo 1.

Utilizar a especialmente concebidos ImmunoBlot pentes no momento da electroforese. Isto assegura que as pistas sobre o gel e, subsequentemente, as faixas de rodagem e bandas de proteína sobre o blot, estão alinhados com os canais do ImmunoBlot.

Combs com espaçamentos bem que correspondem os espaçamentos pista das unidades de ImmunoBlot estão listados abaixo. Note que o número de poços nem sempre igual ao número de pistas em uma proporção de 1:1.

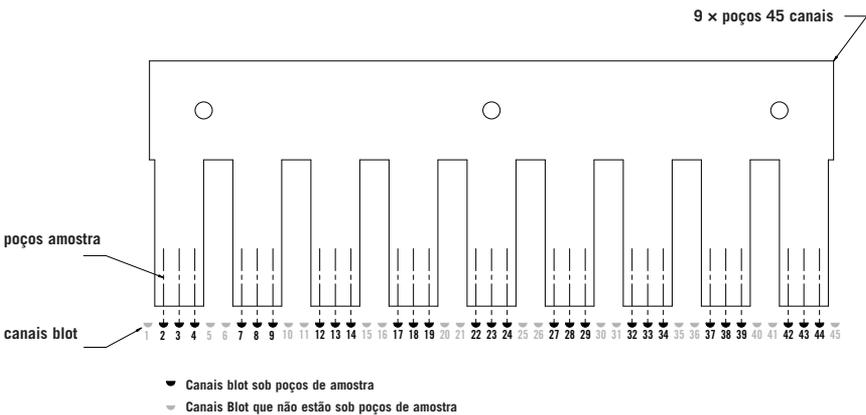


Fig A. O pente 9-assim 1,0 mm (PR511-9-1.0) se alinha com os 45 canais do ImmunoBlot XL e pode ser usado para sondar 9 amostras com até três sondas por amostra.

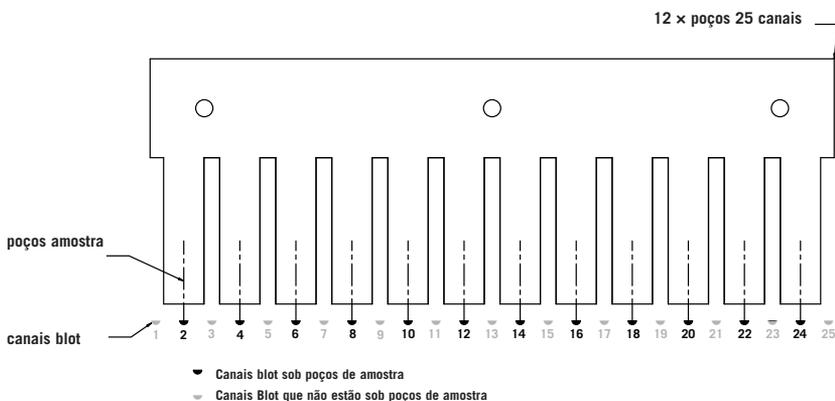


Fig B. Os 12-poços 1,0 mm pente (PR511-12-1.0) se alinha com os 25 canais do ImmunoBlot e pode ser usado para sondar 12 amostras com uma sonda por amostra.

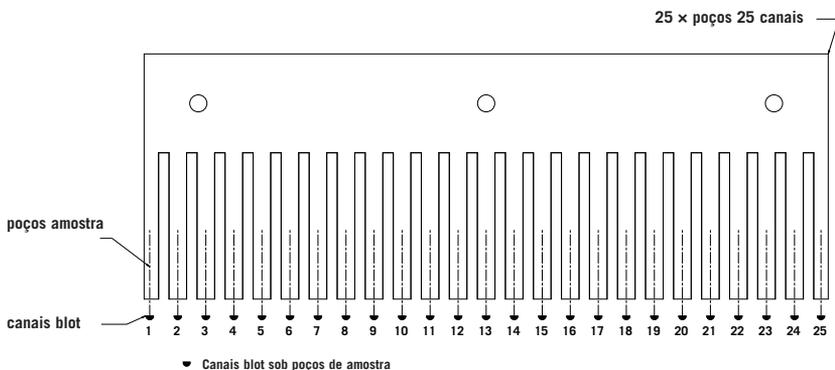


Fig C. A 25-poços pente 1,0 mm (PR511-25-1.0) também se alinha com os 25 canais do ImmunoBlot e pode ser usado para sondar 25 amostras com uma sonda por amostra.

Passo 2.

Depois de os géis são apagados, as bandas na membrana não são visíveis. Adicionando um corante não-reactivo irá tornar mais fácil para alinhar a membrana. Isto pode ser feito de uma de duas maneiras:

A. Para cargas maiores de proteína (>250 ng)

Ponceau S pode ser utilizado para corar as proteínas reversivelmente sobre a membrana após a transferência electroforética.

Lavar a membrana rapidamente em água e mancha em 0,2% Ponceau S por 1 a 2 minutos, em seguida, destain em várias mudanças de água destilada até que as bandas vermelhos aparecem contra um fundo branco. Uma vez que a mancha é perdida durante o passo subsequente de bloqueio, bandas de proteína deve ser marcado nesta fase com furos ou com um lápis pontiagudo. O blot também podem ser fotocopiado.

Blots coradas Ponceau S pode ser armazenado durante meses a 4 °C, mantido húmido entre folhas de parafilme ou tampão de papel de filtro saturado. Blots também pode ser congelada numa bolsa de plástico.

Pó Ponceau S deve ser dissolvido em água destilada para fazer uma solução de trabalho. A solução pode ser reutilizada para várias semanas ou meses, dependendo do número de manchado membranas.

B. Para cargas mais baixas de proteína (<250 ng), verde de metilo, Pironina Y ou Deep Purple podem ser utilizados para marcar permanentemente o topo eo fundo do gel para o alinhamento subsequente com os ImmunoBlot canais.

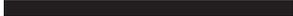
Quando o carregamento do gel, adicionar cerca de 5 µl de verde de metilo (0,1% solução em glicerol a 50%) ou Y Pironina (solução 0,05% em glicerol a 50%) para as pistas desejados. Estes corantes migrar apenas à frente da frente de corante azul de bromofenol no gel, e irá transferir permanentemente para a membrana. Uma segunda aliquota do corante adicionado ao gel perto do final da execução de electroforese vai entrar no gel resolver em 5 a 10 minutos e servem para marcar a parte superior do gel. Por favor tenha em mente que estes corantes fluorescentes podem interferir com métodos de detecção ocidentais blotting e deve ser removido antes da imagem. Se for deixado sobre a membrana que irá resultar em sinais não específicos na detecção fluorescente Western blotting.

Nota 3. Eliminar bolhas

Pequenas bolhas nos canais, geralmente, não afecta a reacção de extremidade, e deve mover-se para trás e para a frente sobre a superfície da membrana quando a ImmunoBlot é agitada. Para eliminar as bolhas de grandes dimensões, retirar a solução a partir do canal e re-injecção. Para mais informações, consulte a seção Solução de problemas.

Nota 4. Volumes óptimos

O volume óptimo para os canais de ImmunoBlot irá variar um pouco dependendo do tipo de membrana utilizada. A solução adicionada deve quase (95%) encher todo o canal. Reduzir o volume se a solução transborda do porto de entrada quando a unidade é incubada em uma plataforma de agitação.



Nota 5. Colocar os anéis nas ranhuras

Se suas unidades múltiplas de lavagem não se encaixam nas ranhuras facilmente, aplique uma pequena quantidade de graxa de silicone em torno dos anéis. Coloque a unidade multiforme solta no slot e pressione para baixo no lado do colector para você. Em seguida, pressione no lado longe de você do lugar do colector firmemente no slot.

Nota: Tenha cuidado ao realizar incubações de bandeja, porque os anticorpos monoclonais de baixa afinidade pode se dissociar dos seus respectivos antígenos ao longo do tempo. A incubação de uma bandeja permite tais anticorpos de se difundir através da solução de incubação e religar em outro lugar no blot. Estrias, tais como coloração é detectável entre pistas de amostras ou em faixas de controlo negativo na posição de um ou mais bandas fortemente reactivos.

Nota 6. Secundárias incubações de anticorpos

Por favor, siga as instruções fornecidas com o sistema de detecção de Western blotting. Quando o anticorpo secundário é usado na ImmunoBlot a uma diluição elevada (1:100.000 ou superior), alguma diminuição da intensidade do sinal podem ser observadas. Isto pode ser devido à depleção de anticorpos no pequeno volume do canal. O problema pode geralmente ser corrigido por:

1. O aumento da concentração de anticorpo 2-5 vezes
2. Aumentando o volume de anticorpo, ou
3. Removendo a membrana a partir da unidade e realizando a incubação do anticorpo secundário em uma bandeja.



Apêndice B: Detecção utilizando ECL ocidentais sistemas de detecção de blotting

Hoefler recomenda que você execute rotulagem e detecção de manchas seguindo as instruções fornecidas na sua rotulagem de western blotting, e kit de detecção. Abaixo está um protocolo geral com base na GE Healthcare (antiga Amersham Biosciences) ECL Kit de Detecção de Western Blotting.

Existem vários sistemas de detecção de ECL ocidentais blotting disponíveis.

O protocolo geral seguinte é sugerido:

1

Após electroforese e transferência de proteínas separadas para nitrocelulose ou PVDF (Hybond LFP baixo fluorescente para a mais alta sensibilidade) da membrana, bloquear locais não específicos com uma solução adequada de bloqueio.

2

O bloqueio é seguido por duas lavagens rápidas em Tween PBS/0.1% (PBS-T).

3

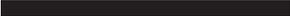
Imergir e incubar a membrana com um anticorpo-anti-génio primário específico de concentração otimizado.

4

Remover a membrana com duas lavagens rápidas de PBS-T seguido por 2 lavagens mais longos (2 × 5 min com agitação).

5

Incubar a membrana com uma concentração otimizado do anticorpo secundário conjugado.



6

Resumidamente enxaguar a membrana com duas mudanças de tampão de lavagem, seguido por 4 lavagens mais longas em PBS-T (4 × 5 min com agitação).

7

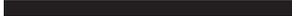
Deteção de solução A e B são misturados e pipetados sobre a membrana para uma incubação curto.

8

Drenar reagente de deteção em excesso e embrulhar a membrana em Saran-Wrap antes da exposição a filme de raios X.

Solicitação de informações

produto	quantidade	código
ImmunoBlot , para utilização com a membrana de gel de tamanho padrão (por exemplo, SE600). 25 faixas de sonda espaçadas 5,3 milímetros de intervalo. Inclui placa superior, placa inferior, 2 parafusos, distribuidor de lavagem (2 peças), 2 pedaços de tubos, conexões, tubos e 5 blocos de vedação.	1	PR625
ImmunoBlot XL , para utilização com a membrana de gel de tamanho padrão (por exemplo, SE600). 45 faixas de sonda espaçadas 3,0 milímetros de intervalo. Inclui placa superior, placa inferior, 2 parafusos, distribuidor de lavagem (2 peças), 2 pedaços de tubos, conexões, tubos e 5 blocos de vedação.	1	PR645
Plástico Pads de vedação	10	PR630-31
Lavar Kit Manifold	1	PR630-32
Vedações	2	PR630-33
Manifold Luer conectores	4	PR630-34
Grampo	1	PR630-36
Placa superior para PR625	1	PR625T
Placa superior para PR645	1	PR645T
Prato fundo	1	PR630-37
Pente, 9 poços 1,0 mm	1	PR511-9-1.0
Pente, 12 poços 1,0 mm	1	PR511-12-1.0
Pente, 25 poços 1,0 mm	1	PR511-25-1.0



Hoefer, Inc.

84 October Hill Road
Holliston, MA 01746

Toll Free: 1-800-227-4750

Telephone: 1-508-893-8999

Fax: 1-508-893-0176

E-mail: support@hoeferinc.com

Web: www.hoeferinc.com

Hoefer e ImmunoBlot são marcas registradas da Hoefer, Inc.

ECL é uma marca comercial da GE Healthcare (antiga Amersham Biosciences).

© 2012 Hoefer, Inc.

Todos os direitos reservados.

Impresso nos USA.

