Western Blot Transfer - Häufig gestellte Fragen

1. Wie lange dauert die Immunfärbung wenn PeproTech's Western Blot Protokoll verwendet wird?
   Der Western Transferprozess dauert ungefähr 6 Stunden vom Transfer des Proteins bis zur Sichtbarmachung der Banden.

2. Was für eine Art von Molekulargewichtsmarker sollte verwendet werden?
   PeproTech verwendet den Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard in allen Western Blots, die wir in unseren Labors durchführen, aber es muss nicht dieser Molekulargewichtsmarker verwendet werden. Allerdings sollte ein pre-stained Molekulargewichtsmarker verwendet werden, sofern man nicht mit der ECL-Methode arbeitet.

3. Ist beim Western Blot die Verwendung einer Positivkontrolle notwendig?
   Ja, um genau zu wissen wie sich das Zielprotein im Western Blot darstellt, sollte auf dem Gel eine Positivkontrolle verwendet werden. Wenn PeproTech Antikörper im Western Blot verwendet werden, empfehlen wir dafür das entsprechende rekombinante Protein von PeproTech zu verwenden, welches für den Antikörper als Immunogen verwendet wurde.

4. Ist das Bewegen der Membran während der Inkubationszeiten wichtig?
   Ja, es ist wichtig dass die Membran während der Inkubationszeiten bewegt wird. Wenn die Membran nicht bewegt wird, können die Antikörper, der Blockpuffer und der Waschpuffer nicht gleichmäßig auf die Membran einwirken und so einen fleckigen oder ungleichmäßigen Hintergrund erzeugen. Es kann auch die Erkennung der Proteine durch die Antikörper beeinträchtigen.

5. Ist es notwendig während des Proteintransfers Fließpapier zu verwenden?
   Ja, während des Proteintransfers ist es notwendig das Fließpapier als Barriere einzusetzen, da es hilft das Gel und die Membran vor Schaden durch direkten Kontakt mit den Schwämmen bzw. Elektrodenplatten zu bewahren, ohne den elektrischen Stromfluss zu beeinträchtigen.

6. Muss das in PeproTech's Western Transfer Protokollen empfohlene Farbentwicklungssystem benutzt werden?
   Nein. Es gibt viele Farbentwicklungssysteme die für die Visualisierung in Western Blots verwendet werden können. Allerdings muss das ausgewählte System mit dem verwendeten Enzymkonjugat kompatibel sein. PeproTech verwendet einen Sekundärantikörper, der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. NBT/BCIP ist für die Verwendung mit diesem Enzym geeignet, und wird daher für die Visualisierung unserer Western Blots eingesetzt.

7. Warum sind einige Ergebnisse von Western Blots stärker als andere, wenn man verschiedene Lots des gleichen Antikörpers verwendet?
   Aufgrund der Natur polyklonaler Antikörper können von Lot zu Lot Abweichungen auftreten.

8. Kann im Western Blot ein Enzym-konjugierter Primärantikörper anstelle eines Primär/Sekundär-Antikörpersystem verwendet werden?
   Ja, im Western Blot kann auch ein Enzym-konjugierter Primärantikörper anstelle eines Primär/Sekundär-Antikörpersystems verwendet werden. Allerdings wird durch die Verwendung eines markierten Sekundärantikörpers, der den antigenspezifischen Primärantikörper erkennt, das im Western Blot sichtbare Signal im Vergleich zu der Verwendung eines Enzym-konjugierten Primärantikörpers verstärkt.

Copyright PeproTech, Inc.