

## Produktinformation

### PIA-PINK-COMFORT KIT

Gebrauchsfertige Lösung mit Nanogold-konjugierten polyklonalen Sekundärantikörpern aus Ziege.



Produktname	Produktnummer	Symbol	Inhalt	Volumen
PIA-PINK-COMFORT KIT <b>Rabbit</b>	# 103-21		PIA-PINK-COMFORT Rabbit Staining Solution	1 x 50 mL
			PIA-PINK-Block Blocking Solution	1 x 50 mL
PIA-PINK-COMFORT KIT <b>Mouse</b>	# 104-21		PIA-PINK-COMFORT Mouse Staining Solution	1 x 50 mL
			PIA-PINK-Block Blocking Solution	1 x 50 mL
PIA-PINK-COMFORT KIT <b>Human</b>	# 105-21		PIA-PINK-COMFORT Human Staining Solution	1 x 50 mL
			PIA-PINK-Block Blocking Solution	1 x 50 mL

### Inhalt des Kits

Das PIA-PINK-COMFORT KIT enthält gebrauchsfertige Lösungen für immunologische Assays, insbesondere für Western Blot Nachweise. Jedes Kit enthält ein Gefäß mit 50 mL Staining Solution (Färbelösung) und eines mit 50 mL Blocking Solution (Blockierungslösung). Der Inhalt ist ausreichend für die Immunfärbung von 500 cm<sup>2</sup> Fläche, was z.B. 9 Mini-Blots (9 x 6 cm) bzw. 5 Midi-Blots (11 x 9 cm) entspricht.

### PIA-PINK-COMFORT Immunnachweisverfahren

Die PIA-PINK Färbelösung besteht aus Nanogold-konjugierten polyklonalen Sekundärantikörpern aus Ziege. Nanogold hat eine gut sichtbare rote Farbe. Antikörper der entsprechenden Zielspezies (Kaninchen, Maus oder Mensch) werden über ihr Fcy-Fragment an die PIA-PINK-Färbelösung gebunden. Die Methode wird als partikelbasierter Immunoassay (PIA) bezeichnet.

Im Gegensatz zu den mehrstufigen Verfahren der klassischen Immunoassays wird der PIA zeitsparend ohne Waschschrte durchgeführt. Nach kurzer Blockierung freier Bindungsstellen erfolgt die Antikörperinkubation in einem Schritt. (Abbildung 1)

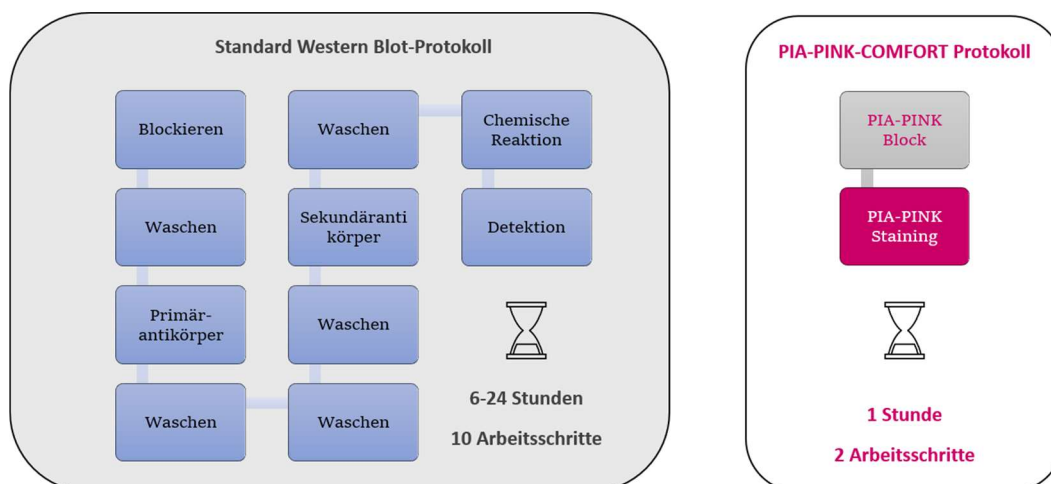


Abbildung 1: Links: Ablauf des klassischen Immunoassay mit 10 Arbeitsschritten und je nach Protokoll 6 bis 24 Stunden Zeitaufwand bis zum Erhalt des Ergebnisses. Rechts: Ablauf des 2-schrittigen partikelbasierten-Immunoassay mit PIA-PINK-COMFORT. Das Ergebnis ist binnen einer Stunde sichtbar.

## PIA-PINK-COMFORT Anwendung

PIA-PINK-COMFORT ist optimiert für die Anwendung im Western Blot Immunoassay, kann aber auch in Dot-Blot Assays verwendet werden. Die Nanogold-Partikel geben einen starken Kontrast in der Elektronenmikroskopie oder gute Streuung in der Dunkelfeldmikroskopie, daher sind die PIA-PINK-Produkte auch für den immunologischen Nachweis auf Mikroskopie-Proben, wie histologischen Schnitten, Sekreten oder Viruskulturüberständen, geeignet.

### Antigen Immunoassay

In der klassischen Anwendung werden Antigene über Primärantikörper nachgewiesen. PIA-PINK-COMFORT ermöglicht den Nachweis in nur einem Inkubationsschritt, da der Primärantikörper zunächst mit PIA-PINK-COMFORT hybridisiert wird. So entsteht durch spontane und gerichtete Bindung eine sichtbare, antigenspezifische molekulare Sonde. Abbildung 2 zeigt schematisch die Hybridisierung von PIA-PINK-Maus mit primärem IgG-Typ Antikörper aus muriner Kultur. PIA-PINK Partikel sind in so geringer Menge sichtbar, dass die Primärantikörper sehr sparsam verwendet werden. Lediglich 0,5 pmol (0,07 µg) Primärantikörper pro mL PIA-PINK Staining Solution bilden gesättigte Hybride mit 80 Primärantikörpern pro Nanogold-Partikel. Durch die hohe Verdünnung von 1/14.000 für einen 1 mg/mL Primärantikörper ergibt sich eine sehr hohe Spezifität, durch die räumliche Anordnung der Primärantikörper auf den Nanogoldpartikeln wird trotz der hohen Verdünnung ein schneller Nachweis erreicht.

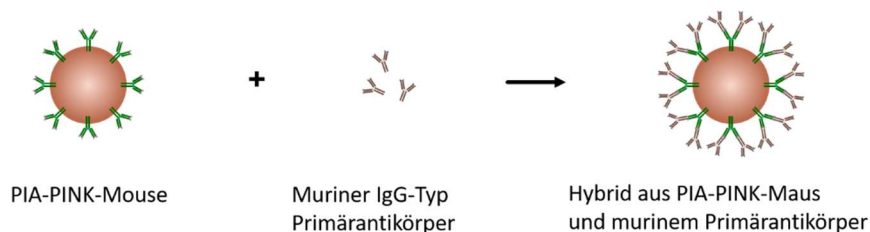


Abbildung 2: Hybridisierung von Primärantikörpern aus murinen Kulturen mit PIA-PINK Mouse Staining Solution. Die mit rotem Nanogold konjugierten anti-Maus IgG Sekundärantikörper binden den Primärantikörper über dessen Fc $\gamma$ -Fragment. Die spezifische Region des Primärantikörpers, die für die Bindung an das Antigen benötigt wird, bleibt frei zugänglich. Das Hybrid ist die signalgebende Einheit, die für den Immunnachweis des Antigens verwendet wird.

### Analyse von Proteinen im Western Blot

Die Hybride aus PIA-PINK und Primärantikörper können in der Analyse von Proteinen im Western Blot Immunoassay verwendet werden. Abbildung 3 zeigt beispielhaft die optische Auswertung.

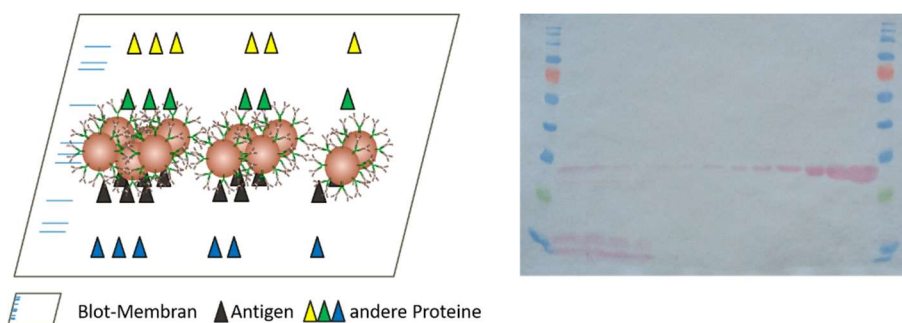


Abbildung 3: Links: Schematische Darstellung der Bindung von Hybriden aus Primärantikörpern und PIA-PINK-COMFORT an das Antigen des Primärantikörpers im Western Blot. Rechts: Western Blot auf Cellulosenitrat (NC) nach reduzierendem 10 % SDS-PAGE. Auftrag verschiedene Expressionsversuche mit poly-Histidin getaggtter Tev-Protease (Spur 2-5) und Konzentrationsreihe gereinigter Tev-Protease zur Quantifizierung (Spur 6 bis 14), Molekulargewichtsmarker in den Spuren 1 und 15. Freie Bindestellen wurden durch 5-minütige Inkubation mit PIA-PINK-BLOCK abgesättigt. Die Immunfärbung wurde mit dem Hybrid aus Maus anti-His-Tag IgG und PIA-PINK-COMFORT Mouse durchgeführt. Immunfärbung für 1 h auf einem Rotationsschüttler mit 100 UPM. Kamera: Canon 400D.

## Quantifizierung des Antigen Western Blot

Die Ansammlung der Nanogold-Partikel auf der Membran ist abhängig von der Konzentration der Epitope sowie der Inkubationszeit. Der Immunnachweis ist dabei in Echtzeit sichtbar. So ist die Immunfärbung von 100 pmol Antigen (3 µg 30 kDa) innerhalb von 5 Minuten sichtbar, weniger konzentrierte Spots folgen. Die Nachweisgrenze für PIA-PINK-COMFORT liegt bei etwa 30 fmol Antigen (1 ng bei 30 kDa Protein) pro Bande. Die Immunfärbung wird nicht verstärkt und ist daher über einen weiten Bereich quantitativ. (Abbildung 4)

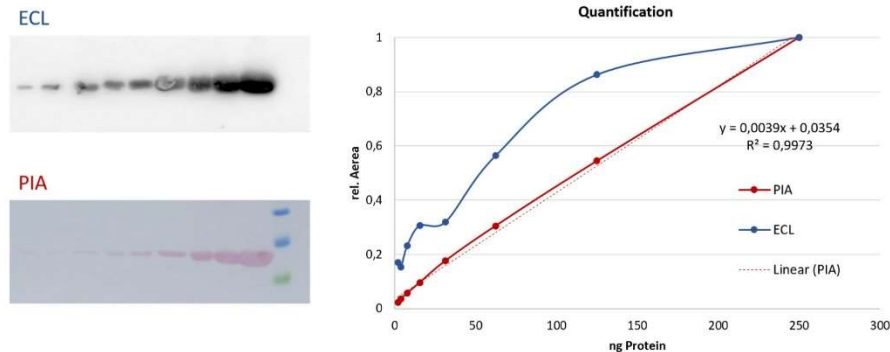


Abbildung 4: Quantifizierung einer Western-Blot-Verdünnungsreihe. Vergleich zwischen enhanced Chemiluminescence (ECL) Immunoassay und partikelbasiertem Immunoassay (PIA-PINK-COMFORT). Es wurden jeweils 250 ng; 125 ng; 63 ng; 31 ng; 16 ng; 8 ng; 4 ng; 2 ng und 1 ng H6-Tev-Protein pro Well über 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und mittels semi-dry Verfahren auf Cellulosenitrat (NC) geblottet. Je eine NC wurde mit dem ECL-Protokoll behandelt und eine mit PIA-PINK-COMFORT Protokoll.

**ECL (oben links):** Blockieren mit 1 % BSA in 1 x TBS-T 1 h; waschen mit 1x TBS-T 15 min; Inkubation mit 1. Antikörper Maus-Anti-Poly-His-Tag Antikörper (1:1.000) in 10 mL 1 % BSA in 1x PBS 16 h im Kühlraum; 3 x waschen á 10 min; Inkubation mit 2. Antikörper Ziege Anti-Maus-HRP Antikörper (1:10.000) in 10 mL 1 % BSA in 1x PBS 1 h; 3 x waschen á 10 min; Chemische Reaktion: 6 mL Clarity Western ECL Substrate; Detektion und Dokumentation: ChemiDoc MP Imaging System 5 min. Gesamt-Assay-Zeit ECL: 19 h.

**PIA (unten links):** Blockieren 5 min; Färbung: Inkubation 1 h mit Hybrid aus PIA-PINK-COMFORT Mouse 10 mL und 0,7 µL 1mg / mL 1. Antikörper Maus-Anti-Poly-His-Tag Antikörper (1:15.000). Membran auf Filterpapier getrocknet. Dokumentation: Nikon EOS 400 D. Gesamt-Assay-Zeit PIA: 70 Min.

**Quantifizierung (rechts):** Image J und Microsoft EXCEL Das ECL-Signal zeigt keine durchgehende Linearität, erreicht Sättigung und Störungen im Blot machen sich bei der Quantifizierung stark bemerkbar. PIA-PINK zeigt Linearität über den gesamten Bereich eine gute mit einem Regressionskoeffizienten von 0,9973.

## Analyse von Antikörperfragmenten im Western Blot

Werden Antikörper analysiert, kann die PIA-PINK-Färbelösung ohne Hybridisierung verwendet werden. Abbildung 5 zeigt beispielhaft den Immunnachweis von Antikörperproben im Western Blot. Die Bindung erfolgt auch am denaturierten, reduzierten  $\gamma$ -Fragment des Fc-Teils der schweren Kette. Mittels nicht-reduzierendem oder nativem oder nichtDies ist attraktiv in der Analyse von Proben aus der Antikörperproduktion, der Immunisierung oder der Identifikationen der Wirtsspezies.

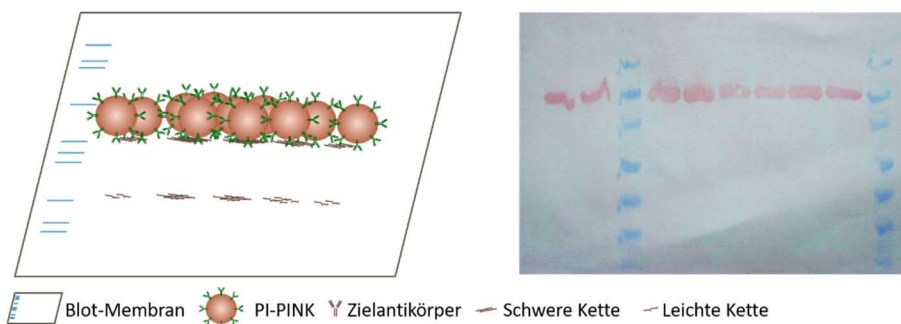


Abbildung 5: Links: Darstellung der direkten Bindung von PIA-PINK-COMFORT an die schwere Kette des entsprechenden Zielantikörpers auf Höhe der 50 kDa Bande im Western Blot nach reduzierender SDS-PAGE. Rechts: Western Blot auf Cellulosenitrat (NC) nach 12% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Auftrag verschiedene Reinigungsfractionen von humanisiertem Antikörper (Herceptin). Freie Bindestellen abgesättigt durch 5-minütige Inkubation mit PIA-PINK-BLOCK. Färbung mit PIA-PINK-COMFORT human, 1 h RT; 100 UpM auf Rotationsschüttler.

**PIA-PINK-COMFORT Kurzanleitung**  
**Immunfärbung von Antigenen im Western Blot**

**Vorarbeiten**

- Benötigte Mengen der PIA-PINK-COMFORT KIT Lösungen steril entnehmen und auf Raumtemperatur bringen.
- 10 mL PIA-PINK-COMFORT mit 0,7 µg Primärantikörper mischen und 1 h hybridisieren lassen.

**Immunfärbung mit PIA-PINK-Hybrid nach dem Proteintransfer auf Membran**

- Blot-Membran in eine saubere Schale legen und mit Blocking Solution bedeckt 5 Minuten schüttelnd inkubieren, dann die Blockierungslösung abgießen.
- Blot-Membran mit der Hybridlösung bedecken und 1 h schüttelnd inkubieren. Die Anreicherung der Immunfärbung kann während der Inkubation beobachtet werden.
- Membran entnehmen und trocknen.
- Die Färbung bewerten und fotografieren, ggf. Inkubation fortsetzen.

**PIA-PINK-COMFORT Kurzanleitung**  
**Immunfärbung von Antikörpern im Western Blot**

**Vorarbeiten**

- Benötigte Mengen der PIA-PINK-COMFORT KIT Lösungen steril entnehmen und auf Raumtemperatur bringen.

**Immunfärbung mit PIA-PINK nach dem Proteintransfer auf Membran**

- Blot-Membran in eine saubere Schale legen und mit Blocking Solution bedeckt 5 Minuten schüttelnd inkubieren, dann die Blockierungslösung abgießen.
- Blot-Membran mit PIA-PINK Staining Solution bedecken und 1 h schüttelnd inkubieren. Die Anreicherung der Immunfärbung kann während der Inkubation beobachtet werden.
- Membran entnehmen und trocknen.
- Die Färbung bewerten und fotografieren, ggf. Inkubation fortsetzen.

## Ausführliche Anleitung zur Immunfärbung mit PIA-PINK-COMFORT

Diese Anleitung beschreibt die Verwendung von PIA-PINK-COMFORT im Western Blot Immunoassay für Midi-Blots (11 x 9 cm), für deren Bedeckung 10 mL Reagenz benötigt werden. Sollten Sie größere oder kleinere Membranen verwenden, passen Sie die Anleitung bitte entsprechend an, berücksichtigen Sie dabei, dass die Membran während der Färbung durchgehend mit PIA-PINK-Lösung bedeckt sein sollte.

Zusätzlich benötigte Materialien: Primärantikörper (IgG-Typ, affinitätsgereinigt), Präzisionspipette, 15 mL Reagenzgefäß, saubere Inkubationsschale, Filterpapier, Schüttler, Digitalkamera

### Vorarbeiten

#### PIA-PINK Abfüllen

Benötigte Mengen der PIA-PINK-COMFORT KIT Lösungen steril entnehmen und auf Raumtemperatur bringen. PIA-PINK-COMFORT enthält keine Biozide, bitte füllen Sie die benötigte Menge unter möglichst sterilen Bedingungen ab, um die restliche Lösung keimfrei zu halten. Sie können die Lösungen auch erneut steril filtrieren (0,45 µm PES) und bis zur Verwendung kühl lagern.

#### Hybridisierung des Primärantikörpers mit PIA-PINK

Sollen Antigene nachgewiesen werden, bitte zunächst die passende PIA-PINK Staining Solution mit Primärantikörper hybridisieren. Sollen Antikörper nachgewiesen werden entfällt dieser Teil.

10 mL PIA-PINK-COMFORT in ein 15 mL Reaktionsgefäß füllen. 0,7 µL einer 1 mg/mL Primärantikörper-Lösung hinzufügen und durch mehrmaliges Invertieren gut durchmischen. Ist die Primärantikörperlösung konzentrierter, diese bitte zunächst mit 1x PBS oder Blocking Solution auf 1 mg/mL verdünnen. Die Lösung für 1 Stunde unter Schütteln inkubieren, um eine gleichmäßige Hybridlösung zu erhalten. (Abbildung 6)



Abbildung 6: Herstellung der Hybridlösung durch Zugabe des Primärantikörpers zu PIA-PINK-MOUSE.

PIA-PINK ist Fc $\gamma$ -spezifisch, daher bilden nur Antikörper vom Typ IgG, andere Globuline (wie IgA, IgM, IgE) werden nicht hybridisiert. Bei Verwendung von Seren oder anderen nicht affinitätsgereinigten Primärantikörpern kann es zu Konkurrenz um die Bindestellen am rot-gefärbten Sekundärantikörper kommen. Auch ein Überschuss an Primärantikörpern führt zur Störung des Nachweises, da Antigen vom überschüssigen Antikörper blockiert wird.

*Bitte verwenden Sie möglichst genau 0,07 µg affinitätsgereinigten Primärantikörper pro mL PIA-PINK-COMFORT, im Zweifelsfall eher weniger, als mehr Primärantikörper. Ist die Antikörperkonzentration unbekannt, testen Sie 1/20 der vom Hersteller für Western Blots empfohlenen Verdünnung.*

#### Western Blot

Nach der Gelelektrophorese transferieren Sie die Proteine wie gewohnt auf eine Blot-Membran, wie Cellulosenitrat (NC) oder PVDF-Membran. Nach dem Transfer die Blot-Membran von beiden Seiten unter fließend Wasser von Gel-Rückständen befreien.



## Immunfärbung mit PIA-PINK

### 1. Blockieren

Die Blot Membran in eine saubere Schale legen und mit 10 mL PIA-PINK-BLOCK bedecken. Freie Proteinbindestellen durch 5-minütige Inkubation unter intensivem Schütteln absättigen. Dann die Blockierungslösung verwerfen. (Abbildung 7)



Abbildung 7: Inkubation der Blot-Membran mit PIA-PINK-BLOCK Blockierungslösung.

### 2. Immunfärbung und Detektion

Den vorbereiteten Blot mit dem Hybrid aus Schritt 1 bedecken und für eine Stunde unter kräftigem Schütteln inkubieren. 75 bis 100 Umdrehungen pro Minute (UpM) auf einem Rotationsschüttler sind optimal, langsames Schütteln verlängert die Inkubationszeit. Die Bindung des Hybrids an das Antigen führt zur Anreicherung der roten Nanogold-Partikel auf der Proteinbande. Die Zunahme der Farbeintensität kann während der Inkubation beobachtet und auch fotografiert werden. Sie können die Immunfärbung jederzeit abbrechen oder unterbrechen und für mehrere Stunden unbeaufsichtigt fortsetzen. In der Regel ist das Signal nach 1-stündiger Inkubation ausreichend. Wenn eine längere Inkubation gewünscht wird, bitte Abdecken, um Verdunstung zu unterbinden und sicherstellen, dass der Blot ständig von der Hybridlösung bedeckt ist, um Austrocknungseffekte zu vermeiden. Zur Dokumentation, den Blot aus der Inkubationsschale nehmen und auf Filterpapier trocknen. Die zunächst noch rosa erscheinende Membran entfärbt sich beim Trocknen und die Bandenfärbung tritt intensiver hervor. Sie können den Blot mit einer Digitalkamera fotografieren oder auch im Geldokumentationssystem erfassen (Einstellung wie bei Ponceau-Rot-Färbung). (Abbildung 8)



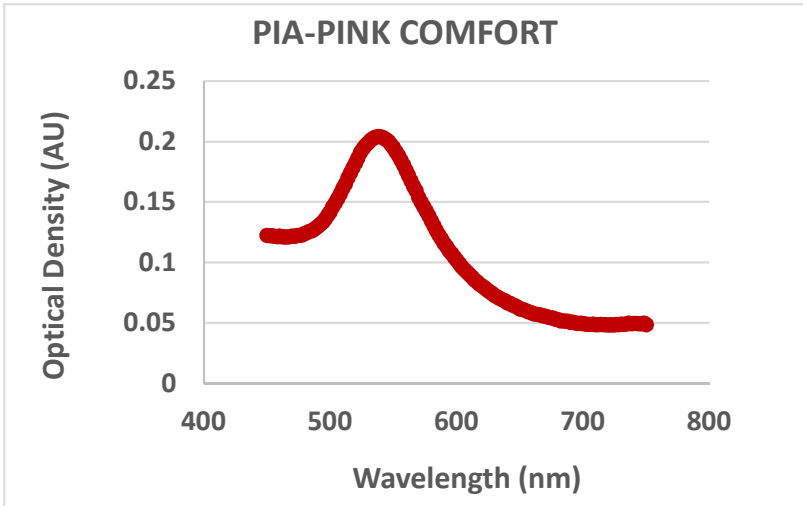
Abbildung 8: Immunfärbung mit der Hybridlösung aus PIA-PINK-COMFORT Mouse und murinem Primärantikörper.

## Quantifizierung

Die Intensität der Färbung korreliert mit der Menge des Antigens. Die Quantifizierung der PIA-PINK-Ergebnisse kann durch Analyse der Pixeldichte auf digitalen Bildern der Blots erfolgen. Zur Quantifizierung können geeignete Programme, wie ImageJ oder Image Studio Light verwendet werden. Auch einige Geldokumentationssysteme bieten eine Software zur Quantifizierung des kolorimetrischen Nachweises an.

Standard-Proteinverdünnung und Analyt müssen aus demselben Blot bestimmt werden. PIA-PINK bietet Ihnen einen linearen Bereich über 2 Größenordnungen. (Abbildung 4) Den Bereich können Sie weiter ausdehnen, indem Sie über die Färbezeit mehrere Aufnahmen desselben PIA-PINK Blots erstellen und somit den jeweiligen Nachweisbereich flexibel erfassen. So können auch Analyte unbekannter Konzentration sicher im linearen Bereich bestimmt werden.

## Produkteigenschaften

<b>Produktname</b>	<b>PIA-PINK-COMFORT KIT</b>														
<b>Beschreibung</b>	Gebrauchsfertige Lösung von Nanogold-konjugiertem Ziege anti-IgG-Fc Sekundärantikörpern sowie Blockierungslösung zur Verwendung in Immunologischen Nachweisen. Alternative zu Enzym- oder Farbstoffmarkierten Antikörpern.														
<b>Antikörper</b>	Affinitätsgereinigt, IgG (Fc) spezifisch, polyklonal aus Ziege # 103-21 Goat-Anti Rabbit IgG (Fc) # 104-21 Goat-Anti Mouse IgG (Fc) # 105-21 Goat-Anti Human IgG (Fc)														
<b>Spezifität</b>	Reagiert mit IgG aus der entsprechenden Spezies. Bindet am Fc-Teil der schweren Kette, jedoch nicht an Fc-freie Derivate. Bindung zu anderen Serumproteinen wurde nicht detektiert.  Kreuz-Reaktivität mit Seren der jeweils anderen Spezies unter 0,01 %.														
<b>Konjugation</b>	60 nm Goldnanopartikel mit einem Absorptionsmaximum von ca. 540 nm. OD (540) 0,2.  <table border="1"><caption>PIA-PINK COMFORT Optical Density Spectrum</caption><thead><tr><th>Wavelength (nm)</th><th>Optical Density (AU)</th></tr></thead><tbody><tr><td>400</td><td>0.12</td></tr><tr><td>500</td><td>0.18</td></tr><tr><td>540</td><td>0.21</td></tr><tr><td>600</td><td>0.10</td></tr><tr><td>700</td><td>0.05</td></tr><tr><td>800</td><td>0.05</td></tr></tbody></table>	Wavelength (nm)	Optical Density (AU)	400	0.12	500	0.18	540	0.21	600	0.10	700	0.05	800	0.05
Wavelength (nm)	Optical Density (AU)														
400	0.12														
500	0.18														
540	0.21														
600	0.10														
700	0.05														
800	0.05														

<b>Weitere Komponenten</b>	Wasser, BSA, PBS, Tween 20, Citrat @ pH 7.4
<b>Empfohlene Anwendung</b>	Western Blot
<b>Mögliche Anwendungen</b>	Dot-Blot, Slot-Blot, Vertical-Flow-Assay, Elektronenmikroskopie, Dunkelfeldmikroskopie
<b>Produktform</b>	<p>Packung mit zwei Reagenzfläschchen, die jeweils 50 ml der gebrauchsfertigen PIA-PINK-COMFORT Färbelösung und der gebrauchsfertigen PIA-PINK-BLOCK Blockierungslösung enthalten.</p> <p>Die Menge ist ausreichend für die Immunfärbung von 500 cm<sup>2</sup> Membran. Idealerweise werden mindestens 0,1 ml pro cm<sup>2</sup> Inkubationsfläche verwendet, um eine gleichmäßige und vollständige Abdeckung der Membran zu ermöglichen und ausreichend Konjugat bereitzustellen.</p> <p>Der für das Antigen spezifische Primärantikörper wird vom Anwender nach Anleitung zugefügt.</p>
<b>Transport</b>	Umgebungstemperatur (4 °C - 30 °C)
<b>Lagerung</b>	Kühl (4 °C - 8 °C) und vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt lagern. Nicht einfrieren.
<b>Haltbarkeit</b>	1 Jahr ab Empfangsdatum. Das Verfallsdatum kann verlängert werden, wenn die Testergebnisse für den vorgesehenen Verwendungszweck akzeptabel sind.

**Nur für Forschung und Entwicklung, nicht für medizinische Anwendungen zugelassen.**

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an [info@pina-tec.de](mailto:info@pina-tec.de).

Stand 09.01.2024



PiNa-Tec® Katja Werner  
Notkestraße 85 - D-22607 Hamburg

Telefon: +49 (0) 40 646 33960 - Mobil: +49 (0) 176 209 40402  
Email: [katja.werner@pina-tec.de](mailto:katja.werner@pina-tec.de) - Internet: [www.pina-tec.de](http://www.pina-tec.de)