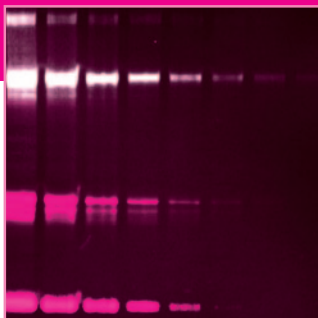


# AppliChem

👉 No.9

## CheLuminate: Усовершенствованная Хемилюминесценция



Наборы для определения пероксидазы хрена (HRP - Horseradish Peroxidase) с помощью усиленной хемилюминесценции при вестерн / саузери / нозерн блоттинге. Окисление люминола, катализируемое пероксидазой, сопровождается слабым испусканием света с длиной волны 425 нм. Добавление к буферу так называемого усилителя люминесценции превращает кратковременной световой сигнал в длительное свечение и значительно улучшает аналитические возможности реакции благодаря повышению интенсивности и длительности сигнала [1,2]. Типичными соединениями-усилителями люминесценции являются замещенные фенолы, наиболее популярными из которых являются р-йодофенол и р-гидроксикумариновая кислота.

# AppliChem

### Ключевые слова

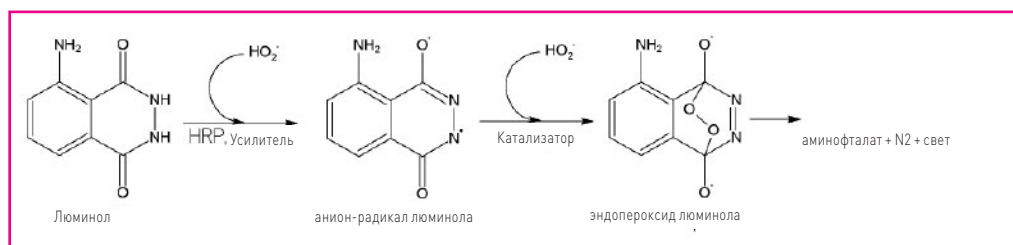
Люминол

Редокс-медиатор

Усилитель

Длительное свечение

Катализируемое пероксидазой хрена окисление люминола в присутствии усилителя представляет собой сложную многостадийную реакцию. Эффект усилителей люминесценции заключается в ускорении ферментативной реакции и повышении равновесной концентрации главного промежуточного продукта, аниона радикала люминола. Обычные системы, такие как большинство наборов ECL™ для определения усиленной хемилюминесценции (enhanced chemiluminescence), основаны на использовании только фенольных активаторов. Однако в недавней работе [3] было показано, что добавление в систему соответствующего катализатора значительно увеличивает интенсивность свечения:



На основе этого открытия фирмой AppliChem было разработано семейство хемилюминесцирующих субстратов CheLuminate-HRP, благодаря своим особым свойствам пригодных для использования в иммуноблоттинге (выбор подходящего для решения Ваших задач субстрата см. в таблице ниже).

Исключительная чувствительность: результатом интенсивного свечения субстратов CheLuminate-HRP является соответствующее повышение чувствительности метода. Даже экономичный вариант субстрата – PicoDetect Extended – по сравнению с фенольными усилителями обладает, по меньшей мере, в восемь раз большей чувствительностью – в нижней части пикограммового диапазона ( $10^{-12}$ ). Субстраты FemtoDetect имеют еще более низкий предел обнаружения, в верхнем фемтограммовом диапазоне ( $10^{-13}$ ); наибольшей чувствительностью, однако, обладает субстрат FemtoDetect Plus, позволяющий обнаружить несколько фемтограммов анализируемых компонентов ( $10^{-15}$ ).

**Длительный сигнал** – все субстраты обладают длительным свечением. Однако в субстрате FemtoDetect это свойство проявляется максимально: он способен к люминесценции в течение 12 ч – по меньшей мере, в десять раз дольше, чем стандартные субстраты, основанные на фенольных усилителях люминесценции.

**Различные способы регистрации сигнала** – хемилюминесцентный сигнал субстратов CheLuminate-HRP можно регистрировать как с помощью пленки, так и с использованием цифровых камер на основе ПЗС. Преимущество технологии ПЗС заключается в непосредственном получении и обработке изображений, более высокой чувствительности и разрешении, а также большем динамическом диапазоне.

**Большая безопасность** – все используемые для производства субстратов CheLuminate-HRP реактивы тщательно отбирались по критерию безопасности. Ни один из компонентов, используемых в CheLuminate-HRP, не вреден для человека.

**Большая стабильность** – срок хранения концентрированных реактивов CheLuminate-HRP при температуре 2–8°C составляет более

одного года. Рабочие растворы, полученные в результате смешивания двух компонентов набора в соотношении 1:1, стабильны при комнатной температуре в течение либо 7 суток (PicoDetect), либо 24 ч (PicoDetect Extended, FemtoDetect и FemtoDetect Plus).

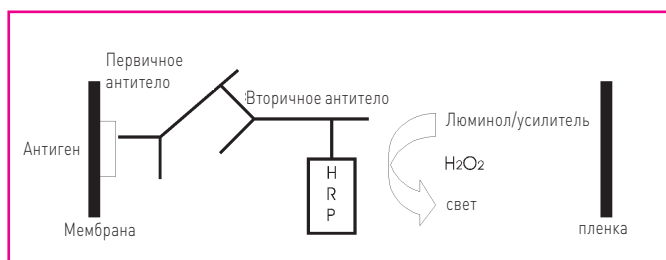
Наборы CheLuminate-HRP представляют собой полностью укомплектованные, готовые к применению системы для хемилюминесцентного обнаружения иммобилизованных белков (вестерн-блоттинг) и иммобилизованных нуклеиновых кислот (саузерн и нозерн-блоттинг), непосредственно или опосредованно конъюгированных с пероксидазой хрена. С помощью этого метода можно определять иммобилизованные на мембране специфические антигены и последовательности нуклеиновых кислот, меченые пероксидазой хрена либо непосредственно, либо опосредованно, с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена стрептавидина/антител. Субстрат легко готовится смешиванием двух компонентов, раствора люминола/усилителя люминесценции и раствора пероксида в соотношении 1:1.

Субстраты CheLuminate-HRP для хемилюминесцентного определения активности пероксидазы хрена при иммуноблоттинге						
№ продукта	Описание	Особенности	Чувствительность	Длительность сигнала	Стабильность РР**	Рекомендуемые диапазоны разведения антител
A3417	CheLuminate-HRP PicoDetect*	Высокая интенсивность свечения, эффект основан на фенольных усилителях люминесценции. Экономичен	Пикограммовый диапазон $10^{-12}$	1–2 ч	7 суток	Первичные: 1:100-1:5 000 Вторичные: 1:5 000-1:100 000
A7786	CheLuminate-HRP PicoDetect Extended	Высокая интенсивность свечения, по крайней мере, в 8 раз выше, чем у стандартных субстратов на основе фенольных усилителей люминесценции. Экономичен	Нижний пикограммовый диапазон $10^{-12}$	6 ч	24 ч	Первичные: 1:500-1:5 000 Вторичные: 1:20 000-1:100 000
A7807	CheLuminate-HRP FemtoDetect	Высокая интенсивность испускания, по меньшей мере, в 20 раз больше, чем при использовании стандартных субстратов на основе феноловых усилителей люминесценции. Благодаря длительному свечению имеется достаточно времени для многократной экспозиции и получения качественных изображений, пригодных для публикаций Дорогостоящие антитела могут быть разведены в 50 раз сильнее, чем при использовании стандартных хемилюминесцентных субстратов	Верхний фемтограммовый диапазон $10^{-13}$	12 ч	24 ч	Первичные: 1:1000-1:15 000 Вторичные: 1:25 000-1:150 000
A7879	CheLuminate-HRP FemtoDetect Plus	Самый чувствительный хемилюминесцентный субстрат из имеющихся, люминесценция, по крайней мере, в 150 раз интенсивнее, чем у стандартных субстратов. Позволяет разводить дорогостоящие антитела в 100 раз сильнее, чем при использовании стандартных хемилюминесцентных субстратов	Нижний фемтограммовый диапазон $10^{-15}$	8 ч	24 ч	Первичные: 1:5000-1:100 000 Вторичные: 1:100 000-1:500 000

\* Этот продукт, в отличие от остальных трех продуктов CheLuminate-HRP, содержит феноловый усилитель люминесценции!

\*\* РР = рабочий раствор

### Принципы методики обнаружения белков:



### Классический набор для хемилюминесцентного анализа: CheLuminate-HRP: PicoDetect (A3417)

Набор PicoDetect является классической хемилюминесцентной системой на основе фенольных усилителей люминесценции. В присутствии пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) пероксидаза хрена катализирует окисление циклических диацетилгидразидов, к которым относится люминол. Сразу после окисления люминол находится в возбужденном состоянии (промежуточный продукт реакции), после чего переходит в основное состояние с испусканием света. Усилители люминесценции, таких, как фенольные соединения, позволяют значительно усилить эмиссию света. С помощью этого метода можно определять иммобилизованные на мембране специфические антигены и последовательности нуклеиновых кислот, меченые пероксидазой хрена либо непосредственно, либо опосредованно, с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена стрептавидина/антител. Для обнаружения нанесите на мембрану 100 мкл/см<sup>2</sup> раствора субстрата (смесь реактивов А и В в соотношении 1 : 1).

### Принципы методики обнаружения нуклеиновых кислот:



- Химические свойства сравнимы со свойствами системы ECL™; обладает наименьшей интенсивностью свечения по сравнению с другими тремя наборами ChemLuminate-HRP.
- Высокая чувствительность – предел обнаружения в диапазоне пикограммов (10–12)
- Длительность свечения составляет 1<sup>2</sup> часа - имеется достаточно времени для оптимизации условий экспозиции
- Наиболее экономичный вариант – по сравнению с другими хемилюминесцентными субстратами стоимость намного ниже

### Новое поколение хемилюминесцентных наборов!

Следующие хемилюминесцентные наборы CheLuminate-HRP отличаются от классического набора CheLuminate-HRP PicoDetect. В данной системе катализируемое пероксидазой окисление люминола сопровождается длительным ярким свечением с длиной волны 425 нм. Интенсивность свечения пропорциональна активности пероксидазы. Включение в субстрат редокс-медиатора сильно повышает интенсивность сигнала и уменьшает фоновую люминесценцию.

### CheLuminate-HRP PicoDetect Extended (A7786)

По сравнению с фенольными субстратами начального уровня хемилюминесцентный субстрат CheLuminate-HRP PicoDetect Extended значительно усовершенствован. В частности, он обеспечивает:

- Высокую интенсивность люминесценции, по крайней мере, в 8 раз выше, чем при использовании субстратов на основе фенольных соединений, таких, как система ECL™
- Высокая чувствительность – предел обнаружения в диапазоне пикограммов (10<sup>-12</sup>)
- Длительную и устойчивую люминесценцию – в течение 6 ч – достаточно времени для оптимизации условий экспозиции
- Экономичность – стоимость намного ниже, чем у других хемилюминесцентных субстратов; дорогостоящие антитела можно разводить сильнее, чем при использовании других хемилюминесцентных субстратов.



Белки из лизата HT29 [аденокарцинома ободочной кишки] разделяли с помощью электрофореза и переносили на нитроцеллюлозу. Обработанный блокирующим раствором в фосфатно-солевом буфере [0,1% Твина + 5% сухого обезжиренного молока] в течение ночи мембрану инкубировали с моноклональными мышиными антителами к бактину в разведении 1:2000. Мембрану инкубировали с мечеными пероксидазой хрена козымими анти-мышиными антителами в разведении 1:200, после чего снова промывали. Для сравнения растворов субстратов исследование проводили дважды, то есть две одинаковым образом подготовленные мембраны инкубировали в течение одной минуты: (A) с субстратом PicoDetect Extended; (B) с субстратом конкурента на основе фенольных усилителей люминесценции. Избыток субстрата удаляли и определяли эмиссию света люминографом с ПЗС в течение 20 с.

Испускаемый субстратом PicoDetect Extended хемилюминесцентный сигнал можно регистрировать с помощью пленки или оборудования для получения изображений на основе технологии ПЗС. Более высокая стоимость оборудования для получения изображений компенсируется многими преимуществами, например, возможностью немедленного получения и обработки изображений, более высокой чувствительностью и разрешением, а также более широким динамическим диапазоном.

Хемилюминесцентный субстрат PicoDetect Extended обладает высокой чувствительностью, в этом отношении он превосходит большинство хемилюминесцентных продуктов. Для оптимизации рабочих характеристик может потребоваться дальнейшее разведение первичных и вторичных антител. Рекомендуются следующие разведения:

**Диапазон разведения первичных антител, исходя из концентрации маточного раствора 1 мг/мл: 1:500–1:5 000**

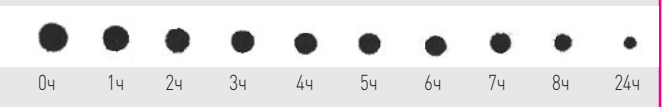
**Диапазон разведения вторичных антител, исходя из концентрации маточного раствора 1 мг/мл: 1:20 000–1:100 000**

### CheLuminate-HRP FemtoDetect (A7807)

Субстрат FemtoDetect имеет специальный состав, благодаря которому свечение имеет очень высокую интенсивность в сочетании с максимальной длительностью, что позволяет в полной мере использовать все преимущества оборудования на основе ПЗС. Его ключевыми свойствами являются:

- Очень высокая интенсивность люминесценции, по крайней мере, в 20 раз выше, чем у субстратов начального уровня, основанных на фенольных усилителях люминесценции
- Очень высокая чувствительность – предел обнаружения лежит в верхнем фемтограммовом диапазоне (10<sup>-13</sup>).
- Длительное испускание света – сигнал длится 12 ч, этого времени достаточно для многократной экспозиции с целью получения блотов очень высокого качества.
- Экономичность: дорогостоящие антитела можно разводить сильнее, чем при использовании других хемилюминесцентных субстратов.

### Хемилюминесцентный субстрат CheLuminate-HRP FemtoDetect исключительная интенсивность и длительность сигнала



Изображения точечного блота с 50 пг пероксидазы хрена после 5-минутной инкубации с хемилюминесцентным субстратом CheLuminate-HRP FemtoDetect. Сигнал регистрировали с помощью люминографа NightOwl (Berthold Technologies). Результаты считывали в указанные моменты времени после инкубации с экспозицией 10 минут за исключением последнего результата [1 ч].

Хемилюминесцентный сигнал, испускаемый субстратом FemtoDetect, обычно регистрируют с помощью оборудования на основе технологии ПЗС. К преимуществам оборудования с использованием технологии ПЗС относится возможность непосредственного получения и обработки изображений, более высокая чувствительность и разрешение, а также больший динамический диапазон. Поскольку субстрат FemtoDetect гораздо чувствительнее по сравнению со стандартными хемилюминесцентными субстратами, критически важно гораздо сильнее разводить первичные и вторичные антитела. Рекомендуются следующие разведения:

**Диапазон разведения первичных антител, исходя из концентрации маточного раствора 1 мг/мл: 1:1 000–1:15 000**

**Диапазон разведения вторичных антител, исходя из концентрации маточного раствора 1 мг/мл: 1:25 000–1:150 000**

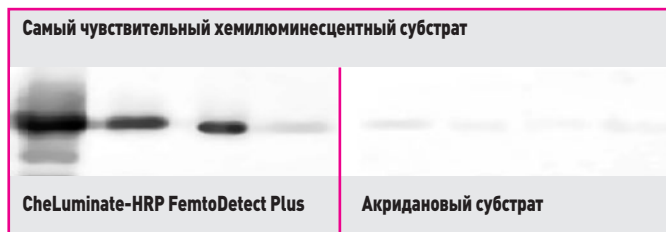
### CheLuminate-HRP FemtoDetect Plus (A7879)

Из всех имеющихся в настоящее время хемилюминесцентных субстратов для обнаружения активности пероксидазы хрена FemtoDetect Plus является самым ярким и наиболее чувствительным.

Особенности/ преимущества субстрата FemtoDetect Plus


- Исключительно интенсивная люминесценция, по крайней мере, в 150 раз сильнее, чем у субстратов с фенольными усилителями люминесценции начального уровня, или в 40–50 раз сильнее, чем у субстратов на основе акридаана.
- Чрезвычайно высокая чувствительность – предел обнаружения лежит в нижней области фемтограммового диапазона (10<sup>-15</sup>), что позволяет определять полосы белка, которые никогда раньше не удавалось обнаружить


- Благодаря длительной люминесценции – 8 ч – имеется достаточно времени для оптимизации условий экспозиции
- Наиболее экономичный вариант – стоимость намного ниже, чем у других хемилюминесцентных субстратов; более того, дорогостоящие антитела можно разводить в большей степени, чем при использовании других хемилюминесцентных субстратов.



Пробы, полученные в сериях разведений человеческого сывороточного альбумина [ЧСА], разделяли с помощью электрофореза и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. После обработки в течение часа блокирующим раствором в фосфатно-солевом буфере (0,1% твина + 5% сухого обезжиренного молока) мембрану инкубировали с мышиными анти-ЧСА антителами в разведении 1:25 000. Мембрану промывали и инкубировали с мечеными пероксидазой хрена козыми анти-мышиными антителами в разведении 1:100,000. После второй стадии промывки мембрану разрежали на две части и каждую инкубировали либо с субстратом CheLuminate-HRP FemtoDetect Plus, либо с субстратом конкурента на основе акридана. Затем на одну минуту на мембрану накладывали пленку.

Хемилюминесцентный сигнал, испускаемый субстратом FemtoDetect Plus, лучше подходит для регистрации с помощью оборудования на основе технологии ПЗС. Можно использовать пленку, однако в связи с исключительно интенсивной люминесценцией субстрата время экспозиции должно быть очень коротким и/или антитела должны быть разведены в большей степени. Рекомендуются следующие разведения антител:

 **Диапазон разведения первичных антител, исходя из концентрации маточного раствора 1 мг/мл: 1:5 000–1:100 000**

 **Диапазон разведения вторичных антител, исходя из концентрации маточного раствора 1 мг/мл: 1:100 000–1:500 000**

#### Оптимизация протоколов хемилюминесцентного обнаружения

1. **НЕОБХОДИМО** оптимизировать все компоненты системы, включая объем пробы, концентрацию первичных и вторичных антител, выбор мембраны и блокирующих реактивов. Поскольку эти субстраты очень чувствительны, при использовании CheLuminate-HRP требуется меньший объем пробы, первичных и вторичных антител, чем при работе с большинством имеющихся на рынке субстратов.
2. Антитела необходимо разводить до значительно более низкой концентрации, чем при использовании колориметрических систем с пероксидазой хрена. Для оптимизации соответствующих концентраций нужно проводить систематический анализ методом дот-блоттинга.
3. Оптимального для всех систем блокирующего реактива НЕ существует. Следовательно, для каждой системы вестерн-блоттинга **НЕОБХОДИМО** найти оптимальный блокирующий буфер. Подбор подходящего блокирующего буфера позволяет повысить

чувствительность системы и предотвратить возникновение неспецифического сигнала в результате перекрестной реактивности между антителом и блокирующим реактивом.

Более того, при переходе от одного субстрата к другому возможно уменьшение сигнала или усиление фона, если блокирующий буфер окажется не оптимальным для новой системы.

4. Необходимо использовать достаточное для покрытия поверхности блета количество промывочного и блокирующего буфера, раствора антител и рабочего раствора субстрата CheLuminate-HRP и следить, чтобы она **НИКОГДА** не высохла. Большие объемы блокирующего и промывочного буфера снижают неспецифический сигнал.

5. При работе с системой авидин/биотин НЕ пользуйтесь в качестве блокирующего реактива молоко, поскольку оно содержит непостоянное количество эндогенного биотина.

6. Для получения оптимальных результатов во время стадии инкубации используйте шейкер.

7. Для снижения неспецифического сигнала к блокирующему буферу, а также при приготовлении всех разведений антител следует добавлять Твин® 20 (конечная концентрация 0,05%). Используйте только высококачественные реактивы, гарантирующие низкое содержание пероксидов и других минорных компонентов.

8. **НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ** в качестве консерванта буферных растворов азид натрия. Азид натрия ингибирует пероксидазу хрена и может помешать проведению анализа с помощью этой системы.

9. НЕ касайтесь мембраны голыми руками. Всегда надевайте перчатки или используйте чистый пинцет. Все оборудование должно быть чистым и свободным от посторонних материалов. На металлических предметах (например, ножницах) не должно быть видимых следов ржавчины. Ржавчина может привести к «крапчатости» изображения и/или сильному фоновому сигналу.

10. Рабочий раствор субстрата CheLuminate-HRP стабилен в течение многих часов при комнатной температуре. Солнечные лучи или другой яркий свет ухудшают качество рабочего раствора. Для получения наилучших результатов храните рабочий раствор в защищающем от света сосуде и НЕ подвергайте действию ярких источников освещения. Рабочий раствор не портится при кратковременном воздействии обычного лабораторного освещения.

#### Литература

- [1] Kricka, L.J. (2000) *Methods Enzymol.* **305**, 370–390.
- [2] Heindl, D. & Josel, H.P. (1997) *Non-radioactive Analysis of Biomolecules*, page 258–261. Springer, Berlin.
- [3] Marzocchi, E. *et al.* (2008) *Anal. Biochem.* **377**, 189–194.

№ продукта	Описание	достаточно для
A3417	CheLuminate-HRP PicoDetect	1200 см <sup>2</sup> , 5000 см <sup>2</sup> , 10 000 см <sup>2</sup> , 1200 см <sup>2</sup> , 5000 см <sup>2</sup> , 10000 см <sup>2</sup>
A7786	CheLuminate-HRP PicoDetect Extended	500 см <sup>2</sup> , 1000 см <sup>2</sup> , 2500 см <sup>2</sup> , 5000 см <sup>2</sup>
A7807	CheLuminate-HRP FemtoDetect	500 см <sup>2</sup> , 2500 см <sup>2</sup> , 5000 см <sup>2</sup>
A7879	CheLuminate-HRP FemtoDetect Plus	200 см <sup>2</sup> , 1000 см <sup>2</sup> , 2000 см <sup>2</sup>
A8055	CheLuminate-HRP ELISA FemtoDetect	планшеты: 5x96 лунок
A8031	CheLuminate-HRP ELISA FemtoDetect Plus	планшеты: 2, 5 и 20x96 лунок

