



# 全濕式電泳轉漬槽

## 操作說明書

本說明適用於本公司產品:GHE420E, GHE420F。

(全程請戴手套操作, 以免污染轉印紙)。

### 蛋白質轉漬

#### 一. 準備事項.

轉漬緩衝液配製:

Tris base	6.25mM	0.75g
Glycine	48mM	3.6g

加入去離子水 750ml 溶之, 再以去離子水調至 1ℓ, 無須適整 pH 值, 其 pH 值應介於 8.2 ~ 8.4。最後再放入冰箱中(4℃)預冷。

- \*. SDS 不建議添加, 因為 SDS 的存在會降低蛋白質與 membrane 的 binding 效果。
- \*. methanol 的濃度在 5 ~ 10% 時, 是可以增加蛋白質與 membrane 的 binding 效果。一般是轉漬分子量越小, 所用的 methanol 濃度越高, 但是 methanol 濃度越高, 會使得轉漬時間變長, 因此建議 methanol 的濃度為 0~5%。
- \*. 轉漬緩衝液不要重複使用, 否則容易過熱。

#### 二. 方法步驟:

- 1) 電泳後, 取出 SDS-PAGE 膠片浸在轉印緩衝液中, 緩衝液中不能有 methanol。
- 2) 取出轉印槽, 先倒入一半轉印緩衝液。
- 3) 取轉印紙切成約如膠片大小, 先在方形培養皿中已少許甲醇浸溼數秒種, 再放入轉印槽中的緩衝液 10min 後使用。另取數張濾紙, 以及兩片方形黑色轉漬墊, 都放在轉印槽的緩衝液備用。
- 4) 取出轉印夾打開平放, 先墊一片轉漬墊, 鋪上一張溼濾紙, 小心疊上已潤溼的轉印紙, 其間不能有氣泡; 轉印紙再滴上數滴緩衝液後, 小心平鋪膠片上去, 加蓋一層濾紙, 及另一片轉漬墊, 同樣地都不能有氣泡, 即可把整個轉印三明治卡夾裝好。此時必須有夾緊的感覺, 如果太鬆則需增加濾紙張數。

(膠片疊到轉印紙時, 最好一次成功, 不要重作, 否則蛋白質色帶可能會印上 1070126

最後產生重疊影像。

- 5) 將轉印三明治放入已經放有一半轉印緩衝液的轉印槽中, 注意有轉印紙的那一面朝向正極(紅色), 膠片那面朝向負極(黑色)。
- 6) 當三明治都放入轉印槽後, 以轉印緩衝液蓋滿所有的三明治, 小心動一動卡夾, 除去附在卡夾內外的氣泡, 將預冷好的冰磚置入槽內, 蓋上蓋子, 同時接好電源。
- 7) 以適合的轉漬條件開始進行轉印, 溫度會漸漸上升, 轉印適當時間後中止轉印, 取出轉印三明治, 打開後依次取出轉印紙及膠片。
- 8) 轉印後的膠片可以繼續進行 CBR 染色, 看有無蛋白質殘留。若電泳時加有已染色蛋白質 marker, 則可在轉印紙上看到不同顏色的色帶, 確定轉印成功, 並可評估轉印效率。

### 三. 轉漬條件:

轉漬 Buffer 最好是預冷過。

固定電壓測試: 使用高電壓高電流的電源供應器進行轉漬。

條件如下:

固定電壓 DC100V 進行轉漬, 時間最長不要超過 50 分鐘。

蛋白質分子量	膠體厚度	轉漬時間
200 KD	1.0 m/m	35 min
200 KD	1.5 m/m	50 min

固定電壓 DC200V 進行轉漬, 時間最長不要超過 25 分鐘。

蛋白質分子量	膠體厚度	轉漬時間
200 KD	1.0 m/m	16 min
200 KD	1.5 m/m	25 min

※以上條件供參考, 如果要延長轉漬時間, 請務必注意過熱的情況。

## 限制電流, 限制電壓:

GHE 420E	400mA	~100V	60min
GHE 420F	400mA	~100V	60min

※以上條件供參考, 如果要縮短轉漬時間, 則可將 current 提高, 但必須注意溫度同樣會上升。

## 四. 註解討論:

1. 根據轉漬情況, 一般可分為(a)轉漬不完全. (b)band 不夠清晰. (c)binding 在 membrane 上不夠理想。以下就這幾個方向討論:

## a. 轉漬不完全:

- ①在 membrane 上完全空白: 注意是否有氣泡阻礙通電, 注意有無接反電極, 注意 transfer buffer 是否配錯。
- ②蛋白質分子無法移出膠體: 注意是否延長轉漬時間或增加電場強度, 注意轉漬前不能染色, 考慮用薄一點的膠體, 降低膠體的濃度, 考慮加入 SDS 於 transfer buffer 中, 避免使用過量的 methanol。

b. band 不夠清晰: 裝置好轉漬槽時請儘快進行轉漬, 當 gel 與 membrane 接觸時請一次完成, 請注意不要徒手碰觸 membrane, 如果膠體與 membrane 接觸不夠緊密時請增加濾紙張數來調整。

## c. binding 在 membrane 上不夠理想:

- ①在 chemical 上的因素: 注意是否使用合適的 membrane type, transfer buffer 中不含 SDS, 是可以增加蛋白質與 membrane 的 binding 效果, methanol 是可以促進 nitrocellulose 的 binding。
- ②在 membrane 上的因素: 處理 membrane 時請戴手套, membrane 必須作適當保存, 當轉漬小分子時請選用 0.2  $\mu$ m 孔徑的 membrane, 注意樣品量是否已超過 membrane 表面區域所能負荷的容量。

2. 轉漬條件僅供參考, 如果轉漬時間過長, 請務必考量降溫, 一般使用預冷過的 buffer 及適當的轉漬條件, 在室溫中即可完成轉漬實驗。

3. 膠片及轉印紙應作記號, 以分辨左右或正反面, 免得呈色後分不清樣品的次序。

4. 建議實驗室根據自身的設備, 建立起轉漬實驗的條件。