



RT5030

Ver. 750275-2.0

5×RealBlot快速半干转膜缓冲液 5×RealBlot Fast Semi-Dry Transfer buffer

产品编号及规格:

RT5030

500 ml

储存、运输及效期:

4-8°C 贮存; 常温运输; 有效期一年。

产品简介:

5×RealBlot快速半干转膜缓冲液使用独特配方, 使用半干转法 (Semi-dry blot), 能在10-20分钟内高效快速地将蛋白转移到印迹膜 (PVDF膜或NC膜) 上。

产品特点:

- 快速和环保: 快速转膜液可以不使用甲醇, 减轻了对实验者和环境的伤害。
- 兼容性好: 快速转膜液能兼容Tris-甘氨酸胶, Bis-Tris胶等多种凝胶。
- 转移效率高: 快速转膜液能在10-20分钟内完成蛋白的转印。

使用方法:

转膜前的准备:

半干转转印滤布 (货号: SP1010) 或2张半干转专用超厚滤纸 (厚度2.4 mm); 裁好的转印膜; 足够的1×快速半干转膜缓冲液; 无水甲醇; 无水乙醇。

- 按照下表配制1×快速转膜液

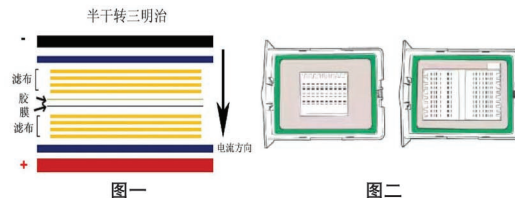
加入顺序	组份	1×转膜缓冲液配制量 500 ml
1	5×转膜缓冲液	100 ml
2	超纯水	约300 ml
3	无水乙醇或无水甲醇	100 ml
4	超纯水	定容至500 ml

注: 1.1 按照顺序加入各种溶液。如果加入转膜液后不加水而是加入醇将会产生沉淀。

1.2 乙醇和甲醇两者选择其一。用乙醇更环保, 用甲醇转膜效果更好。

1.3 配好的转膜缓冲液4度预冷30-60分钟再使用, 将会大大降低转膜时的发热量。

- 将滤布或滤纸浸泡在1×快速转膜液中, 完全浸湿3-5分钟。
2. 将滤布或滤纸浸泡在1×快速转膜液中, 完全浸湿3-5分钟。
3. **PVDF膜使用前要用无水甲醇润湿30秒**, 随后浸泡在1×快速转膜液中, 平衡3-5分钟。NC膜无需处理, 直接浸泡在转膜缓冲液中, 平衡3-5分钟。
4. 将凝胶在超纯水中浸泡漂洗2分钟, 去除胶表面的SDS; 随后将凝胶浸泡在1×快速转膜液中。
注意: 水中漂洗时间不要过长, 否则可能会影响分子量较大蛋白的转移。
5. 按照以下顺序做好转印三明治结构:



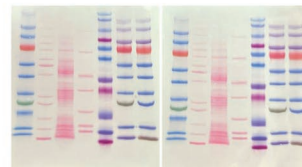
- 5.1 排列顺序 (图一): 1 负极 (阴极) -2 一张超厚滤纸或四层滤布 -3 凝胶 -4 转印膜 -5 一张超厚滤纸或四层滤布 -6 正极 (阳极)
- 5.2 凝胶在转印槽中的排列 (图二): 一板胶尽量布排在转印槽中间位置; 两板胶把小片段靠近 (foot-to-foot) 布排在转印槽中间位置。
6. 用滚轮赶出气泡。

分子量范围和凝胶浓度		一块小型胶 (7.3×8.5 cm)	两块小型胶 或一块中型胶 (8.5×13.5 cm)
1.5 mm凝胶		以下条件增加5-10 min	
1.0mm凝胶	高分子量 > 130 kD	恒流1.3A, 20 min	恒流2.5A, 20 min
	混合分子量 5-130 kD	恒流1.3A, 15 min	恒流2.5A, 15 min
	低分子量 < 30kD	恒流1.3A, 10 min	恒流2.5A, 10 min

注: 不同厂家半干转仪器设置可能有所不同, 请根据厂家说明书适当调整。

实验示例:

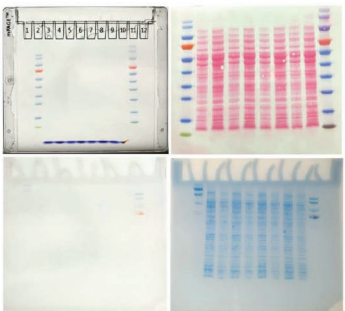
1. Tris-甘氨酸凝胶转膜:

Real-Times
RT5030Bio-Rad
10026938

凝胶: 4-18% Tris-甘氨酸胶
电泳: 1×TGS 200V 50 min
滤纸: 2.4mm厚滤纸
转印膜: 0.2 μm NC膜
仪器: 伯乐Trans-Blot Turbo
转膜条件: 恒流1.3A 15 min
染色: 丽春红染色

实验示例:

2. Bis-Tris凝胶:

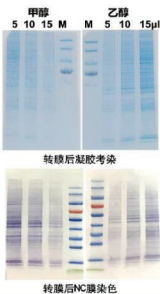


凝胶: 4-20% Sigma mPAGE Bis-Tris胶
 电泳: 1×Tris-MOPS-SDS电泳缓冲液 150V 53 min
 样品: 细菌裂解物(2 µg/µl), 上样5 µl, 10 µl
 转膜缓冲液: 1×RealBlot快速半干转膜缓冲液
 介质: 滤布 (Cat:SP1010), 每边四层
 转印膜: 0.2 µm NC膜
 仪器: 伯乐Trans-Blot Turbo半干转机器
 转膜条件: 恒流1.3A 15 min
 膜染色: 丽春红染色

常见问题:

Q1. 为什么转膜后胶上还是有可见的预染Marker或考马斯亮蓝染色后胶上有比较多的残余蛋白?

A1: 目前没有任何一种转膜方法可以做到100%完全把蛋白从凝胶转移到膜上, 转移结束后凝胶上总是或多或少地残留着蛋白。一般说来, 快速半干转可以比较完全地把预染Marker转移到膜上, 然而对目的蛋白转移来说, 或多或少在胶上会有残余。相对于低分子量蛋白来说, 高分子量蛋白在胶上的残余会更加明显。如果半干转转膜后发现预染Marker在胶上都明显可见, 说明您需要优化转膜条件。可以延长转膜时间或/和使用甲醇配制转膜缓冲液。我们的实验结果发现, 使用甲醇配制转膜缓冲液至少可以提高20%的转膜效率(下图)。



凝胶: 4-20% Tris-甘氨酸预制胶
 电泳: 1×TGS电泳缓冲液 200V 50min
 样品: K562细胞总蛋白
 M: 预染蛋白Marker (Cat: RTD6105)
 转膜缓冲液: 1×RealBlot转膜缓冲液
 20%甲醇(左)或乙醇(右)
 介质: 滤布 (Cat:SP1010), 每边四层
 转印膜: 0.2 µm NC膜
 仪器: 伯乐Trans-Blot Turbo半干转机器
 转膜条件: 恒流1.3A 15 min
 染色: 印迹膜可逆染色试剂盒(Cat:RTD6302)

Q2. 配制1×转膜缓冲液时, 可以使用甲醇代替乙醇吗?

A2: 可以使用甲醇代替乙醇, 并且使用甲醇配制的转膜缓冲液转膜效率要高于乙醇(左图)。然而, 考虑到甲醇的毒性和环境的不友好, 请谨慎选择是否使用。

Q3. 转膜缓冲液含有SDS吗?

A3: 转膜缓冲液中含有SDS, SDS带负电荷, 可以有效提高转移效率。

Q4. 转膜结束后发现三明治温度很高, 有烧胶变黄的现象, 应当如何避免?

A4: 使用推荐的转膜条件, 基本可以避免烧胶现象。如果出现了烧胶现象, 可以采用以下方案优化。第一 提前将浸泡有厚滤纸(厚2.4 mm)或滤布的转膜缓冲液4度预冷30-60分钟。第二 尽量不要使用多层叠加放置的薄滤纸(一般湿转用的滤纸厚度会低于1 mm), 它们吸水和保水能力较弱, 在高电流的转膜条件下缓冲液很容易挥发殆尽, 导致烧胶现象。第三 如果无奈使用多层薄滤纸进行半干转实验, 建议缩短转膜时间, 然而会导致转膜效率降低, 胶上残余较多。

Q5. 5×RealBlot快速半干转膜缓冲液能用于伯乐Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell吗?

A5: 伯乐的SD系统是老式半干转系统, 5×RealBlot快速半干转膜缓冲液与其不兼容, 不建议使用。

Q6. 5×RealBlot快速半干转膜缓冲液适用于哪些半干转机器?

A6. 目前已经测试的机器列表如下:

公司	仪器名称	备注
伯乐 Bio-Rad	Trans-Blot Turbo Transfer System	可以平替伯乐配套缓冲液 Trans-Blot Turbo 5× Transfer Buffer(货号10026938)
赛默飞 Thermo	Pierce G2 Fast Blotter	可以平替Pierce 1-Step Transfer Buffer 1×(货号84731)
	Power Blotter Systym & XL Systym	可以平替Power Blotter 1-Step Transfer Buffer, 5× concentrate (货号PB7300)
北京鸿涛基业	HT-1000TBT 半干转印系统	可以配套
北京韦克斯	WIX-fastBLOT 快速转印系统	可以配套
北京龙方	LF-GZY02型 半干转印电泳槽	可以配套
ACE	S-TRANS快速多通道半干转印仪	可以配套
广州道一	FTB95 蓝箭快转仪	可以配套