



Transferpuffer und allgemeine Tipps für Blotting-Ansätze

Transferpuffer für Semi-Dry-Blotting

Im Semi-Dry-Blotting-System kann man sowohl ein kontinuierliches Puffersystem (identischer Puffer an Anode und Kathode), als auch ein diskontinuierliches Puffersystem (unterschiedliche Puffer an Anode und Kathode) verwenden. Die Transferleistung diskontinuierlicher Systeme ist in aller Regel höher, da die beiden Puffer getrennt nach den Bedürfnissen der beiden Elektroden ausgearbeitet sind.

Als diskontinuierliches Puffersystem empfehlen wir

Roti[®]-Blot 1 – für Standard-Proteine

Roti[®]-Blot 2 – für hydrophobe Proteine

Beide Roti[®]-Blot Systeme bestehen aus zwei unterschiedlichen Puffern, dem Anodenpuffer A (pH 7,8±0,1) und dem Kathodenpuffer K (pH 8,5±0,1). Der Blotstapel wird aufgebaut, indem die oberen Blottingpapiere mit Kathodenpuffer und die unteren Blottingpapiere mit Anodenpuffer getränkt werden. Eine ausführliche Anleitung zur Verwendung finden Sie bei den Produkten im Internet.

Kontinuierlicher Tris-Glycin-Puffer nach Bjerrum

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0-20 % Methanol, pH ca. 9,2 (nicht einstellen!) (nach **Bjerrum** und Schaefer-Nielsen (1986)). Dieser Puffer kann mit oder ohne 0,01-0,1 % SDS verwendet werden, häufig werden 0,0375 % SDS eingesetzt. Kann auch für den Blot nativer Proteine verwendet werden (mit ~0,04 % SDS und 0-10 % Methanol).

Ansatz: Stocklösung 1 Liter 10 x Puffer:

58,15 g TRIS (Base)

29,3 g Glycin

in 600 ml bidestilliertem Wasser lösen

optional: Zugabe von 5-50 ml SDS-Lösung 20 %

Auffüllen auf 1000 ml mit H₂O_{bidest}

1 Liter Arbeitslösung wird jeweils frisch angesetzt aus

100 ml 10 x Stocklösung

+ 700-800 ml H₂O_{bidest}

+ 100-200 ml Methanol

Kontinuierlicher CAPS Puffer

Empfohlen zum Blotten basischer Proteine und vor N-terminalen Sequenzierungen

CAPS-Stammlösung:

Lösen von 2.2 g CAPS (3-[Cyclohexylamino]-1 Propansulfonsäure) 90 ml destilliertem Wasser

Falls nötig, Einstellen des pH-Wertes auf 10,5-11,0 mit NaOH. Auffüllen auf 100 ml mit destilliertem Wasser. Lagerung bei +4 °C.

Transferpuffer:

Zu jeweils 10 ml CAPS Stammlösung zufügen von 80 ml destilliertem Wasser und 10 ml Methanol.

Gut mischen und vor Verwendung auf +4 °C vorkühlen.

Transferpuffer für Tank-Blotting

Im Tank-Blotting können ausschließlich kontinuierliche Puffersysteme verwendet werden. Der bekannteste Puffer ist der nach Towbin, Alternativen stellen die Puffer nach Bjerrum bzw. nach Dunn dar.

Tris-Glycin-Puffer nach Towbin

Der für Tank-Blotting am häufigsten verwendete Puffer ist der Puffer nach **Towbin** (Towbin et al. (1979) *PNAS USA* 76:4350-4): 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10-20 % Methanol, pH ca. 8,3 (nicht einstellen!).

Dieser Puffer kann mit oder ohne 0,01-0,1 % SDS verwendet werden.

Ansatz: Stocklösung 1 Liter 10 x Puffer:
30,3 g TRIS (Base)
144,1 g Glycin
in 600 ml bidestilliertem Wasser lösen
optional: Zugabe von 5-50 ml SDS-Lösung 20 %
auffüllen auf 1000 ml mit H₂O_{bidest}

1 Liter Arbeitslösung wird jeweils frisch angesetzt aus
100 ml 10 x Stocklösung
+ 700-800 ml H₂O_{bidest}
+ 100-200 ml Methanol

Tris-Glycin-Puffer nach Bjerrum (empfohlen native Proteine)

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 10-20 % Methanol, pH ca. 9,2 (nicht einstellen!) (nach **Bjerrum** und Schaefer-Nielsen (1986))

Dieser Puffer kann mit oder ohne 0,01-0,1 % SDS verwendet werden. (Verwendung für native Proteine mit 0,04 % SDS und 0-10 % Methanol).

Ansatz: Stocklösung 1 Liter 10 x Puffer:
58,15 g TRIS (Base)
29,3 g Glycin
in 600 ml bidestilliertem Wasser lösen
optional: Zugabe von 5-50 ml SDS-Lösung 20 %
auffüllen auf 1000 ml mit H₂O_{bidest}

1 Liter Arbeitslösung wird jeweils frisch angesetzt aus
100 ml 10 x Stocklösung
+ 700-800 ml H₂O_{bidest}
+ 100-200 ml Methanol

Natriumcarbonat-Puffer nach Dunn (empfohlen für basische Proteine)

10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 10-20 % Methanol, pH ca. 9,9 (nicht einstellen!) (nach **Dunn**, 1986)

Dieser Puffer kann mit oder ohne 0,01-0,1 % SDS verwendet werden.

Ansatz: Stocklösung 1 Liter 10 x Puffer:
8,4 g NaHCO₃
3,2 g Na₂CO₃
in 600 ml bidestilliertem Wasser lösen
optional: Zugabe von 5-50 ml SDS-Lösung 20 %
auffüllen auf 1000 ml mit H₂O_{bidest}

1 Liter Arbeitslösung wird jeweils frisch angesetzt aus
100 ml 10 x Stocklösung
+ 700-800 ml H₂O_{bidest}
+ 100-200 ml Methanol

Bitte beachten: Die Transferparameter sind abhängig vom verwendeten Puffersystem. Beispiele:

Transferpuffer	Blot über Nacht	Blotzeit 1 Std.	Blotzeit 3 Std.
<i>Puffer nach Towbin</i>	25-40 V	50-100 V	25-50 V
	40-80 mA	200-400 mA	100-200 mA
<i>Puffer nach Bjerrum</i>	25-40 V	50-100 V	25-50 V
	40-80 mA	200-400 mA	100-200 mA
<i>Puffer nach Dunn</i>	10 V	40-80 V	20-40 V
	40-80 mA	200-500 mA	100-250 mA

Transferpuffer für Southern-Blotting

1x (oder 0,5x) TAE
alternativ 1x (oder 0,5x) TBE
alternativ 20x SSC

Entsprechende Stocklösungen finden Sie im Anschluss unter „Empfohlene Reagenzien“.

Transferpuffer für Northern-Blotting

20 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0
Wir empfehlen, eine 10x Stocklösung mit DEPC-behandeltem Wasser anzusetzen und den pH-Wert mit NaOH einzustellen.

Sterilisation durch Filtration durch 0,45 µm Filter.

Aufbewahrung bei RT, lichtgeschützt.

Der Puffer verfärbt sich mit der Zeit ins strohgelbe. Dunklerer Puffer muss verworfen werden.

Allgemeine Daten

Stellen Sie sicher, dass über die volle Oberfläche des Blotsandwiches ein optimaler **Kontakt** zwischen Papier, Membran, Gel und Elektroden sichergestellt ist.

Berühren Sie niemals die Membran mit bloßen Händen, da dies die Oberfläche der Membran verändert und zu schlechter Bindung und späteren Fehlsignalen führt.

Transferpuffer dürfen niemals mehrfach benutzt werden !

Transferpuffer müssen sehr sorgfältig aus hochwertigen Reagenzien hergestellt werden. Vor allem Methanol muss in analytischer Qualität (p.a. oder Ph. Eur. verwendet werden, da Metallkontaminationen Elektrodenablagerungen bilden können und die Leitfähigkeit des Transferpuffers steigern. Der pH-Wert und die Pufferqualität verändern sich in Abhängigkeit von der verwendeten Reinheit. Die besten Ergebnisse werden erzielt mit Puffer von niedriger Ionenstärke und niedriger Leitfähigkeit.

Für das Blotten von **basischen Proteinen** empfehlen wir die Verwendung von Transferpuffern mit höherem pH-Wert, z.B. dem Natriumcarbonat-Puffers nach Dunn oder von CAPS-Puffersystemen (siehe oben). Im Towbin-Puffer (Tris, Glycin, Methanol, pH ~8,3) ist der Transfer ineffizient durch die elektrische Neutralität der Moleküle unter diesen Bedingungen. Grundlegend wird empfohlen, einen Puffer zu wählen, dessen pH 2 pH-Einheiten höher liegt, als der IEF der Proteine. Es sollte darauf geachtet werden, dass die Proteine vor dem Gelauftrag sorgfältig denaturiert werden, da sie sonst zur Kathode wandern können.

Stellen Sie den pH des Transferpuffers nicht ein, wenn es nicht eindeutig im Protokoll vorgeschrieben ist. Während des Transfers entstehen an der Anode H⁺ Ionen und an der Kathode OH⁻ Ionen, die über die feuchten Papierblätter abgeleitet werden müssen. Das Zufügen von Säure oder Lauge zum Puffer erhöht die Leitfähigkeit und führt sowohl zu einer erhöhten Hitzeentwicklung als auch zur verstärkten Bildung von Ionen an den Elektroden (OH⁻ an der Kathode und H⁺ an der Anode). Das Übermaß an Ionen bzw. der massiven Anstieg / Abfall des pH-Wertes kann von den

Papierblättern nicht mehr kompensiert werden und resultiert in braun-„verbrannt“ erscheinenden Blottingpapieren, bei starkem Auftreten sogar in Schäden an den Elektrodenplatten.

Verwenden Sie keine **Kathodenpuffer** mit pH-Werten unter 8,3, da bei längerem Gebrauch die Elektroden (vor allem die Kathode) Schaden nehmen können.

Methanol verhindert das Schwellen des Gels während des Transfers und verbessert die Absorption der Proteine an NC-Membranen. Zusätzlich wird durch Methanol die Porengröße verringert und die Proteine können durch hohe Methanolkonzentrationen im Gel ausfallen. Bei nativen Gelen bzw. dem Transfer von nativen Proteinen sollte kein oder nur wenig Methanol verwendet werden. Beim Transfer großer Proteine (>100 000 kDa) (vor allem auf PVDF-Membranen) sollte ebenfalls die Methanolkonzentration verringert werden (oder weggelassen), da hier auf jeden Fall SDS zugegeben werden muss und die Transfereffizienz großer Proteine unter Anwesenheit von Alkoholen herabgesetzt ist. Dieser Effekt beruht vermutlich auf a) der methanol-verursachten dichte Netzstruktur von Gel und Membran und b) auf einem „Strippen“ von SDS von den Proteinen durch anwesende Alkohole. Beim Transfer von Gradientengelen sollte auf jeden Fall Methanol zugesetzt werden, da sie sonst zur Trapezform anschwellen.

SDS verbessert die Transfereffizienz vor allem großer Proteine, erhöht allerdings die Spannung, Stromstärke und die entstehende Hitze. Weiterhin kann es bei sehr kleinen Proteinen / Peptiden, vor allem bei Nitrocellulosemembranen, zum Durchtritt der Peptide durch die Membran und damit zum Verlust führen. Vor allem beim Transfer kleinerer Proteine im Semi-Dry-Blot (SDB) auf NC-Membranen sollte SDS weggelassen werden. Beim Transfer auf PVDF-Membranen empfehlen wir, auf jeden Fall SDS (0,01-0,05 %) zuzusetzen, da die Blotting-Effizienz auf PVDF-Membranen durch SDS signifikant gesteigert wird.

Empfehlung (ca.) für SDS und Methanol im Western-Blot Transfer (SDB: Semi Dry Blotting)

	denaturierend		nativ	
	Methanol	SDS	Methanol	SDS
kleine Proteine /Peptide (ca. <20 kDa)	20 %	Tank: 0,01 % SDB: 0 % (NC) 0,01 % (PVDF)	5-10 %	Tank: 0,01 % SDB: 0 % (NC) 0,01 % (PVDF)
mittlere Proteine/Peptide (ca. 20-80 kDa)	10 %	Tank: 0,05 % SDB: 0,01 %	0-5 %*	Tank: 0,05 % SDB: 0,01 %
große Proteine/Peptide (ab ca. 80 kDa)	10 % NC 0-5 % (PVDF)	Tank: 0,1 % SDB: 0,05 %	0 %*	Tank: 0,1 % SDB: 0,05 %

* Nur für PVDF Membranen empfohlen

Membranen:

	PVDF	NC
Anfeuchten	Zwingend: in Methanol	In Wasser
Während des Transfers	SDS kann reduziert, aber nicht weggelassen werden. Die Anwesenheit von SDS verbessert die Bloteffizienz. Methanol kann weggelassen werden.	Methanol kann reduziert aber nicht weggelassen werden. Die Anwesenheit von Methanol verbessert die Proteinabsorption. SDS kann weggelassen werden. Vor allem kleine Proteine ohne SDS blotten (Gefahr des „Durchblottens“)

Achten Sie darauf, insgesamt mindestens 2 mm **Blotpapier** zu jeder Seite des Stapels zu verwenden. Zu wenig Blotpapier limitiert die Menge verfügbarer Pufferionen und führt zu einer verminderten Bloteffizienz sowie, längerfristig, zu einer Schädigung der Elektroden. Stellen Sie sicher, dass das Papier ausreichen angefeuchtet ist.

Die tatsächliche **Zeit**, die zum Blotten von Proteinen benötigt wird hängt von der Größe der Proteine ab. Große Proteine und lange Nukleinsäuren benötigen eine Transferzeit von bis zu 2 h, kleine Proteine weniger als 1 h. Wir empfehlen für den ersten Blot bei einem neuen Versuch eine Transferzeit von ca. 1 Stunde.

Die **Effizienz** und **Qualität** des Transfers hängt vom verwendeten Puffer, der Art der Proben und den

Parametern des Stromflusses ab. Generell werden bei geringerer Stromstärke und längerer Blotzeit bessere Resultate erzielt.

Sie können **mehrere Transfers** gleichzeitig durchführen, wenn Sie die einzelnen Transfereinheiten übereinander stapeln. Zur Trennung wird eine mit destilliertem Wasser befeuchtete Dialyse-Membran verwendet. Diese verhindert ein Durchwandern von kleinen Proteinen und somit eine Kontamination der zweiten Membran.

Wir empfehlen, alle Gele vor dem Transfer **in Transferpuffer zu equilibrieren** (15 min bis zu 1 Std.). Das Vorequilibrieren entfernt Reste von Elektrophoresepuffern und Salzen und verhindert damit die Hitzeentwicklung während des Transfers durch einen übermäßigen Anstieg der Leitfähigkeit. Weiterhin verringert es die SDS Konzentration im Gel und verhindert hierdurch eine zu schnelle Migration sowie das „Durchblotten“ durch NC-Membranen. Das Equilibrieren erlaubt auch dem Gel, seine endgültige, natürliche Größe zu erreichen und verhindert das Schwellen des Gels während des Transfers, wodurch die Banden unscharf werden können. Gradientengele sollten auf jeden Fall vorequilibriert werden, bis sie ihre Form nicht mehr verändern.

Während des **Tankblots** sollte der Puffer durch einen in die Kammer gelegten Rührfisch ständig leicht **bewegt** werden.

Das **Kühlen** des Transferpuffer vor Gebrauch und das Kühlen der Bloteinheit während des Transfers verringert die Gefahr einer Überhitzung und vermindert Schäden an Proteinen und Botter.

Empfohlene Power-Supply-Einstellungen

Blotten Sie mit konstanter Einstellung der **Stromstärke**.

Semi-Dry-Blotting: 2-5 mA / cm² Gelfläche

Tank-Blotting: 2-4 mA / cm² Gelfläche

Empfohlene Reagenzien

Reagenz	Best. Nr.
Capronsäure	8799
CAPS	9168
EDTA dinatriumsalz-dihydrat, p.a.	8043
Glycin, Blotting-Grade	0079
Methanol, Blotting-Grade	0082
Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)	6979
Natriumacetat-trihydrat, p.a.	6779
Roti [®] -Stock 20 % SDS	1057

Reagenz	Best. Nr.
Roti [®] -Blot 1 für Standardproteine	L509
Roti [®] -Blot 2 für hydrophobe Proteine	P039
Roti [®] -Stock 20x SSC	1054
Rotiphorese [®] 10x TAE Puffer	T845
Rotiphorese [®] 10x TBE Puffer	3061
Rotiphorese [®] 50x TAE Puffer	CL86
SDS, Blotting-Grade	0183
TRIS, Blotting-Grade	0188

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5
76185 Karlsruhe
Postfach 100121
76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Telefax: +49 (0) 721/ 5606-149
E-Mail: info@carlroth.de
Internet: www.carlroth.de

s.s. 06/2016