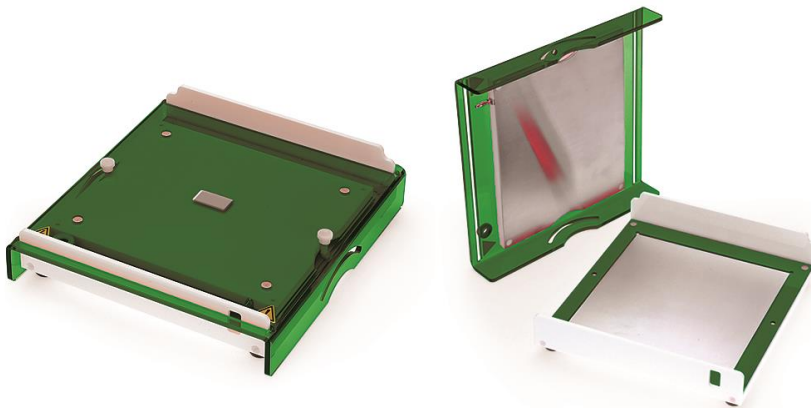


Gebrauchsanweisung



SEMI-DRY-BLOTTER MAXI

T788.1



ACHTUNG: Bei unsachgemäßer Anwendung besteht die Gefahr tödlicher Stromschläge.
Darf nur von sachkundigem Personal in Betrieb genommen werden.

**BITTE LESEN SIE DIE GEBRAUCHSANWEISUNG VOR VERWENDUNG DER APPARATUR
GRÜNDLICH DURCH.**

Bei der Entwicklung des Roth Semi-Dry-Blotters wurde besonders auf eine lange Haltbarkeit und konstante Qualität geachtet. Wenn sie die Apparatur gemäß der folgenden Gebrauchsanweisung betreiben erhalten sie die hohe Qualität über einen langen Zeitraum.

Versuchen Sie nicht die äußere Ummantelung zu öffnen oder Reparaturen selbst durchzuführen.

GARANTIE

Carl Roth GmbH + Co. gewährt eine Garantie von 12 Monaten, gültig ab dem Zeitpunkt der Auslieferung der Apparatur. Von der Garantie sind alle Zubehörteile ausgenommen. Die Garantie erstreckt sich ebenfalls nicht auf Schäden, die durch unsachgemäßen Gebrauch der Apparatur entstehen.

BESCHREIBUNG:

Der Semi-Dry-Blotter kann zum Blottern von DNA, RNA und Proteinen verwendet werden und benötigt in der Regel Transferzeiten von 30 bis 60 min. Sehr dünne Gele können auch in bereits 15 Minuten geblottet werden. Die Einheit kann mit Gelen von 0,25 mm bis zu 10 mm Gelstärke betrieben werden und ist kompatibel mit allen gängigen Blotting-Puffersystemen - kontinuierliche wie auch diskontinuierliche Blotting-Puffer - in Western-, Southern- und Northern Blotting Prozessen. Die Elektroden - Platin-beschichtete Anode und Edelstahl-Kathode – zeigen praktisch keinerlei Korrosion. Die sehr gleichmäßige Wärmeverteilung über die Elektrodenfläche und damit über das Blotsandwich bewirkt stabile Transferzeiten und verhindert wirksam den Verlust oder die Zerstörung Ihrer Proben während des Blottens.

SPEZIFIKATION:

- ✓ Robuste Plexiglaskonstruktion, alle Kontaktflächen chemisch verbunden
- ✓ Doppelt isolierte Kabel, belastbar bis zu 1000 V
- ✓ Anode (positive Elektrode) aus platinisiertem Titanium
- ✓ Kathode (negative Elektrode) aus rostfreiem Edelstahl
- ✓ Maximale Blotfläche: 20 x 20 cm
- ✓ Gerätemaße (L x B x H): 26 x 26 x 7 cm

KOMPONENTEN:

- 1 Semi-Dry Blotter mit Deckel
- 2 Kabel
- 1 Gebrauchsanweisung

UMGEBUNGSBEDINGUNGEN:

- ✓ Das Gerät darf nur in Innenräumen verwendet werden.
- ✓ Das Gerät kann ohne Sicherheitsverlust in einer Höhe von bis zu 2000 m über NN. verwendet werden.
- ✓ Die normale Arbeitstemperatur liegt zwischen 4 und 65 °C.
- ✓ Die maximale mögliche Luftfeuchtigkeit von 80 % bei Temperaturen von 31 °C nimmt bei Temperaturen von 40 °C linear auf 50 % ab.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Alle Roth Produkte, die ausgeliefert werden, haben eine strenge Qualitätskontrolle durchlaufen. Haben Sie noch zusätzliche Fragen, rufen Sie uns bitte unter 0721/5606-0 an.

BETRIEBSANWEISUNG:

A. Sicherheitsbelehrung:

- ✓ Bitte lesen Sie die Betriebsanweisung vor dem Verwenden der Apparatur.
- ✓ Vor Entfernen des Sicherheitsdeckels bitte alle Kontakte zum Spannungsgerät trennen.
- ✓ Überschreiten Sie nicht die maximale Stromstärke.
- ✓ Betreiben Sie diese Apparatur nicht auf einer Metallunterlage.
- ✓ Während der Betriebsnahme die Apparatur nicht bewegen.

HINWEIS:

Die Kabel des Semi-Dry-Blotters sind mit starren Steckerscheiden ausgerüstet. Sollten diese Anschlüsse nicht an die Buchsen Ihres Power-Supplys passen, empfehlen wir die Verwendung der Adapter K295.1

BETRIEBSBEDINGUNGEN:

Maximal Stromstärke: 1000 mA
Maximale Spannung: 100 Volt

B. Reinigung

- ✓ Stellen Sie vor Entfernen des Deckels sicher, dass die Apparatur vom Spannungsgerät getrennt ist. Zum Entfernen des Deckels heben Sie diesen vertikal mit den Fingern an.
- ✓ Das Gerät sollte sorgfältig mit warmem Wasser oder destilliertem Wasser gewaschen werden, um das Absetzen von Salzen zu verhindern. Bitte achten Sie darauf, die Elektroden nicht zu beschädigen. Kräftiges Säubern ist nicht nötig.
- ✓ Lassen Sie das Gerät vor der Verwendung lufttrocknen.
- ✓ Muss das Gerät gesäubert werden, sollte nur warmes Wasser und ein mildes Detergenz verwendet werden (Seife). Wasser mit einer Temperatur über 60 °C kann das Gerät beschädigen. Verwendbare Reagenzien sind z.B. Spülmittel und Hexan.
- ✓ Das Gerät sollte in der Spüllösung nicht länger als 30 min einweichen.
- ✓ Das Gerät sollte niemals mit folgenden Reinigungsreagenzien in Kontakt kommen, da sie irreversible Schäden anrichten: Aceton, Phenol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Methanol, Ethanol, Isopropanol, starke Basen (NaOH etc.).
- ✓ Stellen Sie sicher, dass die Kontakte und Elektroden sauber und trocken sind, bevor Sie die Apparatur verwenden oder lagern.

Eine **RNAse Dekontamination** ist in den allermeisten Fällen unnötig, auch wenn RNA-Gele geblottet werden sollen. Die RNA kommt nicht in Kontakt mit dem Blot-Gerät und während des Stromflusses sind RNAsen inaktiv.

Sollte trotzdem das Gerät RNAse-frei werden kann die Reinigung mit dem folgenden Protokoll durchgeführt werden:

Reinigen Sie das Gerät mit einem milden Detergens wie vorgegeben.

Waschen Sie 10 min mit 3 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

Spülen Sie mit 0,1 % DEPC-behandeltem, destilliertem Wasser.

Vorsicht: DEPC ist möglicherweise krebserregend. Treffen Sie immer die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen beim Gebrauch.

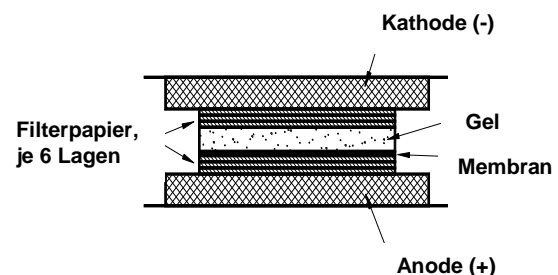
ROTI®Nukleinsäurefrei (Best. Nr. HP69) und RNAse AWAY™ (Best. Nr. A998) können ebenfalls verwendet werden. Bitte lesen Sie die Verwendung in der jeweiligen Bedienungsanleitung nach.

C. Aufbau des Blot-Sandwiches:

Details zu Blotting-Puffern finden Sie weiter unten. Die Anzahl Blotting-Papierstücke bezieht sich auf Papier von ca. 0,35 mm Stärke. Bei der Verwendung anderer Papiere muss die Anzahl entsprechend angepasst werden.

1. Äquilibrieren Sie das Gel in Kathodenpuffer (z.B. ROTI®Blot K).
2. Schneiden Sie pro Gel 12 Stücke Blottingpapier (0,35 mm Dicke) und ein Stück Blottingmembran in der Größe des zu blottenden Gels. **Berühren Sie niemals die Membran mit bloßen Händen**, da dies die Oberfläche der Membran verändert und zu schlechter Bindung und späteren Fehlsignalen führt.
3. Abhängig vom Material der verwendeten Membran muss die Membran vor dem Blotten vorinkubiert werden. Sollten Sie PVDF-Membran verwenden, tauchen Sie diese in 100 % Methanol bis keine weißen Bereiche mehr sichtbar sind. Bei der Verwendung von Nitrocellulose, äquilibrieren Sie diese bitte in Anodenpuffer. Bitte beachten Sie hier auch die Vorgaben des Membran-Herstellers.
4. Achten Sie darauf, überschüssige Lösung von der Membran abtropfen zu lassen.
5. Tränken Sie 6 Blotpapiere in Kathodenpuffer (ROTI®Blot K).
6. Tränken Sie 6 Blotpapiere in Anodenpuffer (ROTI®Blot A).

*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.*



7. Markieren Sie für die spätere Orientierung die Gelseite der Membran und kappen Sie als Markierung eine Ecke des Gels. Notieren Sie sich die Markierungen.
8. Legen Sie die 6 mit Anodenpuffer getränkten Blotpapiere auf die untere Elektrode (Anode). Stellen Sie sicher, dass alle Blotpapiere bündig aufeinanderliegen (s. Abbildung) und dass überschüssige Flüssigkeit entfernt ist.
9. Legen Sie die vorbereitete Membran bündig auf den Stapel mit Anoden-Blotpapieren. Achten Sie darauf, dass sich keine Luftblasen bilden. Luftblasen sofort mit den Fingern vorsichtig zur Seite herausdrücken (Handschuhe!) oder mit einer Pipette bzw. dem ROTILABO®-Verschlussroller zur Seite rollen.
10. Das Gel wird luftblasenfrei auf die Membran aufgelegt. Um einen guten Kontakt zu gewährleisten, kann vorsichtig etwas Transferpuffer aufpipettiert werden.
11. Legen Sie auf das Gel die 6 mit Kathodenpuffer getränkten Blotpapiere.
12. Stellen Sie sicher, dass alle Blotpapiere, Membran und Gel bündig aufeinanderliegen.
13. Rollen Sie einen Glasstab (z.B. Pipette) oder den ROTILABO®-Verschlussroller mit leichtem Druck über den Stapel, um eventuelle Luftblasen aus dem Sandwich zu entfernen.
14. Setzen Sie vorsichtig den Deckel des Blotters auf und ziehen Sie vorsichtig und gleichmäßig die Schrauben an, jede Schraube im Wechsel immer nur ein kleines Stück. Werden die Schrauben einzeln fest angezogen, kann die Blotqualität leiden.

Bitte beachten: Die Schrauben werden nur bei Acrylamidgelen bis zu 2 mm Stärke angezogen. Dickere Gele und Agarosegele werden mit offenen Schrauben geblottet – das Gewicht des Deckels reicht für die Stabilisierung und Beschwerung des Blots aus. Bei Unsicherheit kann ein Gewicht von ca. 1 kg aufgelegt werden (1 Liter).

HINWEIS: Sie können mehrere Transfers gleichzeitig durchführen, wenn Sie die einzelnen Transfereinheiten übereinanderstapeln. 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

D. Lauf des Blots

1. Schließen Sie die Kontakte an das Spannungsgerät an.
Bitte beachten: Das rote Kabel wird durch den Deckel in die Blotbasis eingesteckt. Das schwarze Kabel führt durch die Seite der Basis hindurch in den Deckel. Die Kabel wurden aus Sicherheitsgründen auf diese Weise angebracht – eine Berührung der Stecker während des Blots ist so ausgeschlossen.
2. Schließen Sie die Kabel (rot bzw. schwarz) an die entsprechenden Buchsen des Power Supplys an.
Bitte beachten Sie auf jeden Fall die Orientierung der Kabel, da ein falscher Anschluss die Edelstahl-Elektrode beschädigen kann.
3. Der Blotvorgang sollte bei ca. 2-5 mA pro cm² Gel durchgeführt werden, das entspricht in der Regel etwa 10-50 V. Beispielsweise sollte für ein 8 x 7 cm großes Gel eine Stromstärke von etwa 110 mA gewählt werden.
Stellen Sie das Spannungsgerät auf eine maximale Spannung von 100 V ein. Überschreiten Sie 1000 mA nicht.
4. Blotting-Zeit: ca. 1 h. Die tatsächliche Zeit, die zum Blotten 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 h.
Bitte beachten: 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.

E. Empfohlenes Material

Zubehör

ROTILABO®-Verschlussroller HE23.1

Power Supplies

Für Semi-Dry Blotting werden in aller Regel hohe Stromstärken benötigt (>250 mA). Das verwendete Power Supply muss diesen Anforderungen genügen. Wir empfehlen eines der folgenden Geräte:

Roth Power Supply BLOT (max. 300 V, 3000 mA, 300 W)	2909.1
Consort Power Supply EV261 (max. 600 V, 1000 mA, 300 W)	2804.1
Consort Power Supply EV202 (max. 300 V, 2000 mA, 300 W)	A543.1

Membranen

Membran	Porengröße	Einheit	Anzahl	Maße	Best.-Nr.
ROTI®Fluoro PVDF	0,2 µm	Bögen	2	20 x 13 cm	2831.1
		Rolle	1	330 x 26 cm	2803.1
ROTI®PVDF	0,45 µm	Rolle	1	375 x 26,5 cm	T830.1
ROTI®NC	0,2 µm	Rolle	1	30 x 300 cm	HP40.1
		Rolle	1	20 x 300 cm	HP41.1
		Bögen	10	10,2 x 13,3 cm	HP42.1
		Bögen	10	20 x 20 cm	HP43.1

ROTILABO®-Blottingpapier

Dicke	Anzahl	Maße	Best.-Nr.
0,18 mm	100	10 x 13 cm	CL68.1
	100	20 x 20 cm	CL69.1
	100	46 x 57 cm	CL70.1
	100	58 x 60 cm	CL71.1
0,35 mm	100	10 x 13 cm	CL64.1
	100	20 x 20 cm	CL65.1
	100	46 x 57 cm	CL66.1
	100	58 x 60 cm	CL67.1
1,0 mm	25	15 x 15 cm	CL72.1
	25	20 x 20 cm	CL73.1
	25	58 x 60 cm	CL74.1
1,5 mm	25	58 x 60 cm	CL75.1

Puffer

Bitte beachten: Transferpuffer müssen sehr sorgfältig aus hochwertigen Reagenzien hergestellt werden. Der pH-Wert und die Pufferqualität verändern sich in Abhängigkeit von der verwendeten Reinheit.

Protein-(Western-)-Blotting-Puffer:

Verwenden Sie keine Kathodenpuffer mit pH-Werten unter 8,3, da bei längerem Gebrauch die Elektroden Schaden nehmen können.

Für das Semi-Dry-Blotting empfehlen wir die Verwendung des ROTI®Blot Puffersystems - ein diskontinuierliches Puffersystem, optimiert für Semi-Dry-Blotter mit Anodenpuffer pH 7,8±0,1 und Kathodenpuffer pH 8,5±0,1: ROTI®Blot 1 (Best.-Nr. L509.1).

Geeignet sind weiterhin z.B. die folgenden Puffer:

Puffer nach Tobwin et al. (1997): 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3 (optional: 0,02 % SDS)

Puffer nach Bjerrum und Schaefer-Nielsen (1986): 48 mM Tris, 39 mM Glycin, pH 9,2. Optional: max. 20 % Methanol (empfohlen: 10 % Methanol bei Anodenpuffer zugeben, da Methanol die Bindung an die Membran unterstützt), optional: max. 0,1 % SDS (empfohlen: 0,02 % SDS bei Kathodenpuffer zugeben, da SDS die Proteinbewegung im Gel bzw. zur Membran hin unterstützt)

Triple buffer system:

Anodenpuffer 1: 3 mM Tris Base, 20 % Methanol, pH 10,4 (4 Bögen Blottingpapier)

Anodenpuffer 2: 25 mM Tris Base, 20 % Methanol pH 10,4 (2 Bögen Blottingpapier)

Kathodenpuffer: 25 mM Tris Base, 40 mM Capronsäure, 20 % Methanol pH 9,4

DNA-(Southern-)Blotting-Puffer:

1x (oder 0,5x) TAE or 1x (oder 0,5x) TBE

RNA-(Northern-)Blotting-Puffer:

20 mM Morpholino-propansulfonsäure (MOPS), 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0

(Ansatz von 10x Stocklösung mit DEPC-behandeltem Wasser, pH-Einstellung mit NaOH. 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.)

Reagenzien

Best.-Nr. *

ROTI®Blot 1 für Standardproteine	L509
Tris Base, Blotting-Grade	0188
Tris-HCl, p.a.	9090
Glycin, Blotting-Grade	0079
Methanol, Blotting-Grade	0082
SDS, Blotting-Grade	0183
ROTI®Stock 20 % SDS	1057
Capronsäure	8799
Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	6979
Natriumacetat Trihydrat, p.a.	6779
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, p.a.	8043
ROTIPHORESE® 50x TAE Puffer	CL86
ROTIPHORESE® 10x TAE Puffer	T845
ROTIPHORESE® 10x TBE Puffer	3061

* **Gebindegrößen und
Sicherheitshinweise siehe
aktueller Katalog oder im
Internet unter
www.carlroth.com**

TROUBLESHOOTING

Nukleinsäuren	
Unzureichender Transfer der Nukleinsäuren	<p>Das Gerät wurde falsch aufgebaut, die Nukleinsäuren sind in die falsche Richtung gewandert</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Gel/Membran Sandwich wurde in der falschen Reihenfolge aufgebaut. Überprüfen Sie die Polung.
DNA / RNA verbleibt im Gel	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ist das Gel zu heiß und Puffer zu hoch konzentriert, führt dies zu einer erhöhten Spannung, das Gel beginnt zu schmelzen. Stellen Sie den Puffer erneut mit 0,5 X TBE her, dies ist die Standard Konzentration für einen optimalen Transfer. ▪ Es kam während des Transfers zu Spannungsschwankungen. Es ist wichtig, dass die Spannung während des Transfers konstant gehalten wird. Wenn die Pufferkonzentration niedriger als 0,5 X ist, wird eine höhere Spannung benötigt, um die empfohlene Stromstärke aufrechterhalten zu können und umgekehrt. Ist die Spannung zu niedrig, ist es möglich, dass die Stromstärke unter den optimalen Wert fällt, was wiederum die Migration negativ beeinflusst. Erhöhen Sie die maximale Spannung an Ihrem Power Supply. ▪ Sie erzielen einen optimalen Transfer Ihres Plasmids, Vektors und PCR DNA wenn sie die Einstellungen aus dem Abschnitt „Lauf des Blots“ verwenden.
Schlecht geblotteter oder diffuser Transfer	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agarose und Transfermembran lagen nicht vollständig aufeinander auf. Rollen Sie vor dem Transfer eine Pipette über den Gelstapel um Luft und Pufferblasen zu entfernen. ▪ Ist das Gel ist zu dünn, führt dies zu ungleichmäßigen elektrischen Kontakt zwischen dem Gel/Membran Sandwich und den Elektroden. Wir empfehlen 6 mm dickes Gel und extra dickes Blotting Papier, um einen vollständigen elektrischen Kontakt zu gewährleisten. ▪ Das Gel könnte zu heiß geworden sein. Siehe „DNA / RNA verbleibt im Gel“ ▪ Sehr kleine DNA Fragmente können sich während der Elektrophorese und des Blottens trotz der Verwendung hochprozentiger Gele unscharf und diffus auftrennen. Die Verwendung hochprozentiger Gele führt nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung der Auftrennung. ▪ Die verwendete Transfer Membran könnte nur unzureichend DNA und RNA gebunden haben. Die Verwendung einer Kontrollmembran oder einer Membran eines anderen Herstellers wird empfohlen.
Unspezifische Detektion	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Labeling der DNA Sonden nicht ausreichend ▪ Die Sonden Hybridisierung ist nicht ausreichend, um die DNA detektieren zu können. Die DNA Sonden wurden nicht optimal gelabelt. Eine Überprüfung der Labeling-Kontrollen wird empfohlen, um sicherzugehen, dass die richtige Template DNA verwendet wird und die Reaktion korrekt stattfindet. ▪ Unvollständiger Transfer der Ziel DNA vom Gel zur Membran. Siehe „DNA / RNA verbleibt im Gel“. Überprüfen Sie das Agarose Gel nach dem Transfer auf erfolgreichen Transfer. ▪ Die spezifische Aktivität der Sonde könnte zu niedrig sein, um diese mit herkömmlichen Detektionsmethoden nachweisen zu können. Die spezifische Aktivität und der Gesamt cpm der (radioaktiven) Sonde sollten bestimmt werden. ▪ Die Hybridisierungsbedingungen könnten zu stringent sein. Verringern Sie die Stringenz und verbessern Sie die Bindung von Sonde und Template.
Hoher Hintergrund	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Erhöhen Sie die Stringenz der Hybridisierung, um nicht-spezifische Bindung an die Sonde zu verringern.

Protein	
Unzureichender Proteintransfer	Das Gerät wurde falsch aufgebaut, die Proteine sind in die falsche Richtung gewandert <ul style="list-style-type: none"> ▪ Gel/Membran Sandwich wurde in der falschen Reihenfolge aufgebaut. Überprüfen Sie die Polung.
	Der Nachweis der Proteine funktioniert nicht oder nicht spezifisch genug <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verwenden Sie geeignete Positiv- und Negativkontrollen ▪ Verwenden Sie während der Polyacrylamid Elektrophorese einen Protein Marker mit farbigen Referenzbanden ▪ Färben Sie das Gel mit Coomassie bzw. die Membran mit Ponceau S an.
	Die Transferzeit war zu kurz – Verlängern Sie die Transferzeit
	Stromeinstellungen zu niedrig <ul style="list-style-type: none"> ▪ Überprüfen Sie zu Beginn des Blottings die Stromstärke. Diese könnte bei zu bei bestimmten Voltzahlen zu niedrig sein. Erhöhen Sie die Stromstärke, wenn notwendig, aber überschreiten Sie keinesfalls die angegebenen Höchstwerte (1200 mA bzw. 550 mA). ▪ Es können Fehler bei der Pufferherstellung passiert sein. Stellen Sie neuen Puffer her und erhöhen Sie die Voltzahl.
	Unkorrektes Masse-zu-Ladung-Verhältnis für einen nativen Transfer <ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteine nah am isoelektrischen Punkt (pI). Verändern Sie den Puffer pH so, dass dieser mindestens 2 pH höher oder niedriger ist als der pI des nachzuweisenden Proteins.
	Defektes oder unpassendes Power Supply verwendet <ul style="list-style-type: none"> ▪ Überprüfen Sie die Sicherung des Power Supplys. Die maximale Stromstärke des Geräts sollte mindestens 2000 mA betragen.
	Beeinträchtigung des Transfers durch zu hohe Mengen Methanol <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verringern Sie die Methanol Konzentration soweit, dass der Protein Transfer aus dem Gel verbessert, die Bindung der Proteine an die Nitrocellulose Membran aber nicht beeinträchtigt wird. Sie können auch eine PVDF Membran verwenden und die Methanol Konzentration im Puffer weiter verringern.
Protein präzipitiert im Gel	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verwenden Sie SDS im Transfer Puffer (SDS kann die Transfereffizienz erhöhen, aber auch die Bindungsaffinität an Nitrocellulose verringern und Protein-Antikörper Interaktionen beeinflussen) ▪ Verwenden Sie keine Alkohole in dem Transfer Puffer
Wirbel oder fehlende Banden, verschwommener Transfer	Gel und Transfermembran lagen nicht vollständig aufeinander auf <ul style="list-style-type: none"> ▪ Luftblasen oder Restpuffer zwischen Membran und Gel ▪ Rollen Sie vorsichtig eine Pipette über Gel und Membran um Luftblasen zu entfernen ▪ Verwenden Sie mehr oder dickere Filterpapiere in ihrem Gel-Membran Sandwich
	Unvollständig benetzte Membran oder ausgetrocknete Membran <ul style="list-style-type: none"> ▪ Weiße Punkte auf der Nitrocellulose Membran sind oftmals trockene Stellen, an welche die Proteine nicht binden können. Vergewissern Sie sich, dass die Membran komplett mit Transfer Puffer benetzt ist. ▪ Sollte die Membran sich trotz Benetzung mit Transfer Puffer nicht vollsaugen, können sie destilliertes Wasser bis kurz vorm Siedepunkt erhitzen und die Membran damit benetzen bis diese komplett feucht ist. ▪ Benutzen Sie eine PVDF Membran müssen Sie diese in Methanol tauchen, erst danach wird diese mit Transfer Puffer benetzt.
	Probleme mit der Gelelektrophorese <ul style="list-style-type: none"> ▪ Schlechte Gel Polymerisation, insuffiziente Laufbedingungen, Puffer Kontaminationen und übermäßigen Auftrag von Protein können alle zu führen qualitativ schlechten Gelen und Transfer führen.

Unzureichendes Binden an die Membran - Nitrocellulose	Übermäßige Mengen Methanol beeinträchtigen den Transfer <ul style="list-style-type: none"> Die Methanolkonzentration sollte nicht höher als 20 % (v/v) sein.
	Die Proteine könnten durch die Nitrocellulose Membran gewandert sein. <ul style="list-style-type: none"> Verwenden Sie eine PVDF Membran oder Nitrocellulose mit geringerer Porengröße (0,2 µm). Verwenden Sie eine zusätzliche Schicht Nitrocellulose Membran, um gegebenenfalls Proteine, die durch die erste Membran gewandert sind, nachweisen zu können.
	Proteine, die kleiner sind als <15 kDa haben eine geringere Bindungsfähigkeit an 0,45 µm Nitrocellulose oder könnten von der Membran gewaschen werden. <ul style="list-style-type: none"> Verwenden Sie PVDF oder Nylon Membranen. Diese besitzen eine höhere Bindungskapazität. Verwenden Sie Tween-20 während der Wasch- und Antikörper-Inkubationsschritte. Reduzieren oder verzichten Sie völlig auf stringenteren Waschschritte.
	SDS im Transferpuffer verringert die Bindeeffizienz. <ul style="list-style-type: none"> Reduzieren oder verzichten Sie völlig auf SDS.
	Die Membran ist nicht vollständig angefeuchtet. <ul style="list-style-type: none"> Weißer Punkte auf der Nitrocellulose Membran sind oftmals trockene Stellen, an welche die Proteine nicht binden können. Sollte die Membran sich trotz Benetzung mit Transfer Puffer nicht anfeuchten, können sie destilliertes Wasser bis kurz vor den Siedepunkt erhitzen und die Membran damit benetzen bis sie komplett angefeuchtet ist.
Unzureichendes Binden an die Membran - PVDF	Die Membran ist nicht vollständig angefeuchtet <ul style="list-style-type: none"> Da PVDF hydrophob ist, muss die Membran zunächst komplett mit Methanol bedeckt werden, bevor sie in einem Puffer auf Wasserbasis äquilibriert werden kann.
	Proteine könnten während des Transfers durch die Membran hindurch wandern <ul style="list-style-type: none"> Verringern Sie die Stromspannung, wenn Sie unter intensiveren Bedingungen einen Transfer durchführen wollen Verwenden Sie eine zusätzliche PVDF Membran um Proteine, welche durch die erste Membran gewandert sind, auffangen und nachweisen zu können.
	Die Membran könnte ausgetrocknet sein. <ul style="list-style-type: none"> Vollständig angefeuchtete Membranen sind von durchscheinend-gräulicher Farbe. Weißer Flecken sind oftmals Stellen, an welcher die Membran getrocknet ist. Da Proteine nicht an diese Stellen binden können, sollten Sie die Membran erneut in Methanol tauchen und anschließend mit Transferpuffer benetzen.
	SDS im Transferpuffer verringert die Bindeeffizienz <ul style="list-style-type: none"> Reduzieren Sie die SDS-Konzentration oder verzichten Sie völlig auf SDS.
Der Strom ist zu hoch/stark	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfen Sie vor jedem Transfer die Spannung, da diese für die gegebene Volt Zahl zu hoch sein könnte. Fehler in der Pufferherstellung können ein weiterer Grund für zu hohe Leitfähigkeit und übermäßige Energieerzeugung sein. Die Stromstärke sollte 550 mA bzw. 1200 mA keinesfalls übersteigen.
Proteindetektion nicht optimal	<p>Zu hoher Hintergrund</p> <ul style="list-style-type: none"> Verringern Sie die Konzentration verwendeter Antikörper/Proteine Der Schritt, in dem unspezifische Antikörperbindenstellen blockiert werden, sollte optimiert werden (Verwenden Sie Milchpulver anstatt BSA, höhere Konzentrationen des Blockiermittels, verlängern Sie den Blockierschritt). <p>Zu wenig Signal</p> <ul style="list-style-type: none"> Erhöhen Sie die Konzentration verwendeter Antikörper/Proteine

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carloth.de • www.carloth.de

sse 06/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428.
Geschäftsführer: André Houdelet

