



Gebrauchsanweisung

ROTI®PVDF und ROTI®Fluoro PVDF

Transfermembran

T830, 8989 und 2803 / 2831

ROTI®PVDF, ROTI®PVDF 0.2 und ROTI®Fluoro PVDF sind hydrophobe, mikroporöse Polivinyliden-Membranen, frei von Adjuvantien und Detergenzien. Mit diesen Membranen lassen sich effiziente Transfers von Proteinen über einen weiten Molekulargewichtsbereich durchführen.

Im Vergleich zu Nitrocellulose-Membranen sind ROTI®PVDF, ROTI®PVDF 0.2 und ROTI®Fluoro PVDF wesentlich leichter zu handhaben. PVDF-Membranen zeigen deutlich bessere Ergebnisse in der Immundetektion und sind wesentlich resistenter gegenüber Lösungsmitteln.

Die Porengröße beträgt bei der ROTI®PVDF Membran 0,45 µm, bei der ROTI®PVDF 0.2 und ROTI®Fluoro PVDF Membran 0,2 µm. Die mechanisch rigiden Membranen lassen sich leicht auf die gewünschte Gelgröße zuschneiden und sind auch im trockenen Zustand flexibel und reißfest.

Zur Beachtung: Die beiden Seiten der Membranen weisen produktionsbedingt leichte optische Unterschiede auf, die für die Bloteffizienz allerdings ohne Belang sind. Die Bindungseigenschaften sind auf beiden Seiten der Membranen gleich.

Applikationen:

Western Blot und Far-WesternBlot, Dot-Blot, Lipopolysaccharid- und Aminosäureanalyse, Bindungsassays, Immunoblot, N-terminale Peptidsequenzierung, Analyse kleiner Peptide

Nachweissysteme:

ROTI®PVDF (T830): Radioaktivität, Chemolumineszenz, Farbe
ROTI®PVDF 0.2 (8989): Radioaktivität, Chemolumineszenz, Farbe
ROTI®Fluoro PVDF (2803/2831): Fluoreszenz, Radioaktivität, Farbe (bedingt)

Transferprotokolle

Semi-Dry Blotting

- ✓ Äquilibrieren Sie das Gel ca. 15 min in Kathodenpuffer (ROTI®Blot K oder Transferpuffer).
ROTI®Blot A+K sind im Set unter der Bezeichnung ROTI®Blot1 (L509.1) erhältlich.
- ✓ Schneiden Sie 8 Blotpapiere (A125.1) und die PVDF-Membran auf die Größe des Gels zurecht.
- ✓ Tränken Sie vier der Blotpapiere in Kathodenpuffer (ROTI®Blot K oder Transferpuffer).
- ✓ Tränken Sie die restlichen vier Blotpapiere in Anodenpuffer (ROTI®Blot A oder Transferpuffer).
- ✓ Tauchen Sie die PVDF-Membran kurz in 100 % Methanol (ca. 15 sec), um die Membran für die wässrigen Lösungen zugänglich zu machen. Achten Sie darauf, dass die Membran vollständig befeuchtet ist und keine trockenen Stellen mehr aufweist.
Bitte beachten: FluoroPVDF-Membranen dürfen 100 %igem Methanol nicht länger als 20 Sekunden ausgesetzt sein. Bei längerer Inkubation kann diese speziell beschichtete Membran Schaden nehmen und eine hohe Eigenfluoreszenz entwickeln.
- ✓ Inkubieren Sie die Membran anschließend 1-2 min in H₂O_{bidest.}
- ✓ Äquilibrieren Sie die Membran nun 3-5 min in Anodenpuffer (ROTI®Blot A oder Transferpuffer).
- ✓ Legen Sie die drei mit Anodenpuffer getränkten Blotpapiere auf die Anode.
Stellen Sie sicher, dass alle Blotpapiere bündig aufeinander liegen.
- ✓ Legen Sie die äquilibrierte ROTI®PVDF/FluoroPVDF-Membran bündig auf den Stapel mit Blotpapieren.
- ✓ Das Gel wird luftblasenfrei auf die Membran aufgelegt.
- ✓ Auf das Gel legen Sie die vier mit Kathodenpuffer getränkten Blotpapiere.

- ✓ Stellen Sie sicher, dass alle Blotpapiere, Membran und Gel bündig aufeinander liegen.
- ✓ Rollen Sie einen Glasstab (z.B. Pipette) mit leichtem Druck über den Stapel um Luftblasen aus dem Sandwich zu entfernen.
- ✓ Setzen Sie die Kathode auf den Stapel.
- ✓ Schließen Sie die Kontakte an das Spannungsgerät an.
- ✓ Der Blotvorgang sollte i.A. bei 0,8 mA pro cm² Gel durchgeführt werden. Beispielsweise sollte für ein 8 x 10 cm großes Gel eine Stromstärke von 64 mA gewählt werden bei einer Blotting-Zeit von ca. 1-2 h. Die tatsächliche Zeit, die zum Blotten benötigt wird hängt von der Größe der Proteine und dem verwendeten Transfergerät ab. Große Proteine und lange Nukleinsäuren benötigen eine Transferzeit von mindestens 2 h, kleine Proteine deutlich weniger.
- ✓ Beachten Sie bitte die Angaben des Transfergeräte-Herstellers.

Tank Blotting

- ✓ Kühlen (und entgasen) Sie die benötigte Menge Puffer (s.u.)
- ✓ Füllen Sie die Laufkammer zur Hälfte mit Puffer.
- ✓ Äquilibrieren Sie das Gel 15-30 Minuten in gekühltem Transferpuffer um SDS und Salze zu entfernen. Dies verhindert, dass das Gel während des Transfers die Größe verändert.
- ✓ Schneiden Sie zwei Blotpapiere (A125.1) und ein Stück PVDF-Membran auf die Größe des Gels zu.
- ✓ Tränken Sie die Blotpapiere in Transferpuffer.
- ✓ Tauchen Sie die PVDF-Membran kurz in 100 % Methanol (ca. 15 sec).
Bitte beachten: FluoroPVDF-Membranen dürfen 100 %igem Methanol nicht länger als 20 Sekunden ausgesetzt sein. Bei längerer Inkubation kann diese speziell beschichtete Membran Schaden nehmen und eine hohe Eigenfluoreszenz entwickeln.
- ✓ Inkubieren Sie die Membran anschließend 1-2 min in H₂O_{bidest.}
- ✓ Äquilibrieren Sie die Membran nun 3-5 min in Transferpuffer.
- ✓ Tränken Sie die Blotting-Matten in Transferpuffer.
- ✓ Füllen Sie eine Schale, die etwas größer als die Blottingkassette ist, mit Transferpuffer.
- ✓ Bauen Sie die Transfereinheit wie im Folgenden beschrieben auf. Um Luftblasen zu vermeiden sollten sich alle Teile der Transfereinheit unterhalb der Pufferlinie befinden. Achten Sie beim Aufbau darauf, dass die Blotpapiere, die Membran und das Gel bündig aufeinanderliegen. Vermeiden Sie ein Verschieben des Gels auf der Membran, da ein minimaler Transfer schon beim Kontakt mit der Membran auftreten kann. Um Luftblasen aus dem Sandwich zu entfernen rollen Sie bitte mit einem Glasstab über die Oberfläche.
- ✓ Reihenfolge des Aufbaus (in der Schale):
 - Kathodenseite der Kompressionskassette.**
 - 1 Matte
 - 1 Blotpapier
 - Gel**
 - Membran (ROTI®PVDF/Fluoro PVDF)**
 - 1 Blotpapier
 - 1 Matte
 - Anodenseite der Kompressionskassette.**
- ✓ Drücken Sie leicht auf das Sandwich und fixieren Sie die Blottingkassette.
- ✓ Legen Sie die Kassette in das Transfermodul ein. Achten Sie auf die korrekte Orientierung der Blottingkassette.
- ✓ Füllen Sie die Kammer mit Transferpuffer bis die oberen Platinelektroden und die Blottingkassette vollständig mit Puffer bedeckt sind.
- ✓ Führen Sie den Transfer nach Angaben des Geräte-Herstellers durch.
- ✓ Kontrollieren Sie während des Transfers immer wieder die Temperatur.

Blotting-Puffer

Die am häufigsten verwendeten Puffer sind:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0-10 % Methanol. pH 8,3. (nach Tobwin *et al.*, 1997).

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0-10 % Methanol. pH 9,2 (nach Bjerrum und Schaefer-Nielsen, 1986).

10 mM NaHCO₃, 3 mM NaCO₃, 0-10 % Methanol. pH 9,9 (nach Dunn, 1986).

Kontrollieren Sie den pH-Wert aber **stellen Sie ihn nicht ein** durch Zugabe von HCl oder NaOH. Die Zugabe von Säure oder Lauge zum Puffer erhöht die Leitfähigkeit und führt zu einer erhöhten Hitzeentwicklung und zur verstärkten Bildung von Ionen an den Elektroden, was in braun-verbrannt“ erscheinenden Blottingpapieren und sogar in Schäden an den Elektrodenplatten resultiert.

Bitte beachten:

Beim Transfer von Proteinen auf PVDF Membranen ist kein Alkohol im Transferpuffer nötig. Methanol wird allerdings eingesetzt, um das Schwellen des Gels während des Transfers zu verhindern, ein Effekt, der vor allem bei Gradientengelen auftritt und die Bandenqualität verschlechtert. Wir empfehlen, für PVDF Membranen nicht mehr als 10 % Methanol zu verwenden, da hohe Konzentrationen die Proteinwanderungsgeschwindigkeit aus dem Gel verringern, indem die Gelporengröße reduziert wird.

PVDF-Membrane benötigen SDS, um eine optimale Absorptionsfähigkeit zu gewährleisten. Den genannten Puffern sollte SDS in einer Endkonzentration von 0,01-0,1 % zugesetzt werden, häufig werden 0,04 % verwendet.

Die elektrophoretischen Transferbedingungen sind abhängig vom gewählten Puffer und Blotter. Beachten Sie bitte die Angaben des Geräteherstellers.

Für weitere Daten zu Transferpuffern und zum Proteintransfer im Allgemeinen empfehlen wir unsere Technische Informationsbroschüre „Transferpuffer für Tank- und Semi-DryBlotting“

Rasche Immundetektion

Das folgende Protokoll beschreibt eine rasche Immundetektionsmethode, die speziell für die PVDF-Membran (Art. Nr. T830.1) entwickelt wurde. Durch den Nachweis an trockener Membran entfällt der Blockierungsschritt und ein Teil der Waschschritte, so dass die Analyse in **2,5 Stunden** beendet ist. Geeignet für chromogenen und chemolumineszenten Nachweis.

Vorbereitung: Trocknen der Membran nach dem Blot bei 37 °C (ca. 1h) oder bei Raumtemperatur (RT) (ca. 2 h). Die Membran muss **vollständig trocken** sein.

- Inkubation in primärem Antikörper (verdünnt in Blockierungslösung, z.B. 1x ROTI®Block, Art. Nr. A151.1) unter leichtem Schütteln, 1 h, RT. Man beachte: Die Antikörperlösungen müssen die Membran bedecken.
- 3 x Waschen in PBS* für je 5 min, RT
- Inkubation in sekundärem Antikörper (verdünnt in Blockierungslösung) unter leichtem Schütteln, 30 min, RT.
- 3 x Waschen in PBS* für je 5 min, RT
- Nachweis der Immunkomplexe mittels chromogener (NBT, Art. Nr. 4421.1, BCIP Art. Nr. 6368.1) oder chemolumineszenter Detektion (ROTI®Lumin, Art. Nr. P078.1).

Das Protokoll wird nicht empfohlen für die Detektion sehr geringer Proteinmengen.

*Phosphate Buffered Saline: ROTI®Stock 10 x PBS (Art. Nr. 1058.1); 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4)

Färbemethoden

ACHTUNG: Vor dem Färben muss die Membran, falls sie zuvor getrocknet wurde, wieder einige Sekunden in 100 % Methanol getaucht werden.

Ponceau S

Die Färbung mit Ponceau S ist reversibel und kann daher vor der Immundetektion durchgeführt werden.

A) Färbung von NC-Membranen: 0,2-2 % Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure (Best.-Nr. 8789.1) + 3 % Sulfosalicylsäure (Best.-Nr. 4119.1), Inkubation 1-5 min bei Raumtemperatur. Kontrastverstärkung durch Inkubation in Wasser mit einigen Tropfen Essigsäure.

B) Färbung von PVDF-Membranen: 0,1-1 % Ponceau S in 10 % Essigsäure (Best.-Nr. 6755.1), Inkubation 1-5 min bei Raumtemperatur. Auf PVDF-Membranen werden die Banden erst nach dem Trocknen deutlich sichtbar. Das Trocknen wird vor dem WesternBlot allerdings nicht empfohlen.

Entfärben zur nachfolgenden WesternBlot-Analyse in PBS (Best.-Nr. 1058.1) oder TBS (Best.-Nr. 1060) 10-20 min bei Raumtemperatur.

Coomassie Brilliantblau

Bitte beachten: Die Färbung mit ROTI®Blue bzw. Brilliantblau G ist nicht reversibel. Zur reversiblen Färbung verwenden Sie bitte ROTIPHORESE® Blau R (Brilliantblau R) oder Ponceau S.

- ✓ Inkubieren Sie die Membran 2 min in einer Lösung aus 0,1 % Coomassie Brilliantblau, 50 % Methanol und 7 % Essigsäure. Wir empfehlen die Verwendung von ROTI®Blue für eine irreversible bzw. ROTIPHORESE® Blau R für eine reversible Färbung der Membran.
- ✓ Entfärben Sie die Membran soweit nötig in 50 % Methanol und 7 % Essigsäure (ca. 10 min).
- ✓ Zur vollständigen Entfärbung inkubieren Sie die Membran in 90 % Methanol und 10 % Essigsäure (ca. 10 min).

Amidoschwarz

Die Färbung ist **nicht reversibel**. Zur reversiblen Färbung verwenden Sie bitte Ponceau S.

- ✓ Inkubieren Sie die Membran 10 min in einer Lösung aus 0,1 % Amidoschwarz, 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure.
- ✓ Entfärben Sie die Membran ca. 5-10 min. in 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure.

Zusätzlich empfohlene Produkte:

Weitere Gebindegrößen und Produkte in unserem Katalog oder online unter www.carlroth.de

ROTI®Blot 1 10 x Transferpuffer für Semi-Dry Blotting		L509.1
Tris, Blotting Grade		0188.1
Glycin, Blotting Grade		0079.1
Methanol, Blotting Grade		0082.1
SDS, Blotting Grade		0183.1
ROTI®Stock 10 x PBS, 1 Liter		1058.1
ROTI®Stock 10 x PBST, 1 Liter		1059.1
ROTI®Stock 10 x TBS, 1 Liter		1060.1
ROTI®Stock 10 x TBST, 1 Liter		1061.1
ROTIPHORESE®Blau R, 2 x Konzentrat		3074.1
ROTIPHORESE®Blue, 5 x Konz.		A152.1
Brilliant Blau R 250		3862.1
Brilliant Blau G 250		9598.1
Ponceau S (C.I. 27195)		5938.1
Amidoschwarz 10 B (C.I. 20470)		9590.1
ROTILABO®Blottingpapier		
0,18 mm	10 x 13 cm, 100 Stck	CL68.1
	20 x 20 cm, 100 Stck	CL69.1
	46 x 57 cm, 100 Stck	CL70.1
	58 x 60 cm, 100 Stck	CL71.1
0,36 mm	10 x 13 cm, 100 Stck	CL64.1
	20 x 20 cm, 100 Stck	CL65.1
	46 x 57 cm, 100 Stck	CL66.1
	58 x 60 cm, 100 Stck	CL67.1
0,75 mm	10 x 13 cm, 100 Stck	0942.1
	20 x 20 cm, 100 Stck	0943.1
	58 x 60 cm, 100 Stck	0945.1
1,0 mm	15 x 15 cm, 25 Stck	CL72.1
	20 x 20 cm, 25 Stck	CL73.1
	58 x 60 cm, 25 Stck	CL74.1
1,5 mm	58 x 60 cm, 25 Stck	CL75.1

ROTI®PVDF	Rolle (26,5 cm x 3,75 m)	T830.1
ROTI®PVDF 0.2	Rolle (30 cm x 3 m)	8989.1
ROTI®Fluoro PVDF	Rolle (26,0 cm x 3,30 m)	2803.1
	2 Bögen (20 cm x 13 cm)	2831.1

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@carlroth.de • www.carlroth.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