



## Transferpuffer für Tank- und Semi-Dry-Blotting

### 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<sup>®</sup>-Blot 1 – für Standard-Proteine

Roti<sup>®</sup>-Blot 2 – für hydrophobe Proteine

Beide Roti<sup>®</sup>-Blot Systeme bestehen aus zwei unterschiedlichen Puffern, dem Anodenpuffer A und dem Kathodenpuffer K. 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 9,2 (nach **Bjerrum** und Schaefer-Nielsen (1986)  
Dieser Puffer kann mit oder ohne 0,01-0,1 % SDS verwendet werden, häufig werden 0,375 % SDS eingesetzt. Kann auch für den Blot nativer Proteine verwendet werden (mit 0,0375 % SDS und 0-10 % Methanol).

Ansatz: Stocklösung 1 Liter 10 x Puffer:

75,65 g TRIS-HCl oder 58,15 g TRIS (Base)

29,3 g Glycin

in 600 ml bidestilliertem Wasser lösen und pH auf 9,2 einstellen

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

auffüllen auf 800 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

1 Liter Arbeitslösung wird jeweils frisch angesetzt aus

100 ml 10 x Stocklösung

+ 700-800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

+ 100-200 ml Methanol

## 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 8,3. Dieser Puffer kann mit oder ohne 0,01-0,1 % SDS verwendet werden.

Ansatz: Stocklösung 1 Liter 10 x Puffer:  
39,4 g TRIS-HCl oder 30,3 g TRIS (Base)  
144,1 g Glycin  
in 600 ml bidestilliertem Wasser lösen und pH auf 8,3 einstellen  
optional: Zugabe von 5-50 ml SDS-Lösung 20 %  
auffüllen auf 800 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

1 Liter Arbeitslösung wird jeweils frisch angesetzt aus  
100 ml 10 x Stocklösung  
+ 700-800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
+ 100-200 ml Methanol

### Tris-Glycin-Puffer nach Bjerrum

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 10-20 % Methanol, pH 9,2 (nach **Bjerrum** und Schaefer-Nielsen (1986))  
Dieser Puffer kann mit oder ohne 0,01-0,1 % SDS verwendet werden. Empfohlen für den Blot nativer Proteine (mit 0,04 % SDS und 0-10 % Methanol).

Ansatz: Stocklösung 1 Liter 10 x Puffer:  
75,65 g TRIS-HCl oder 58,15 g TRIS (Base)  
29,3 g Glycin  
in 600 ml bidestilliertem Wasser lösen und pH auf 9,2 einstellen  
optional: Zugabe von 5-50 ml SDS-Lösung 20 %  
auffüllen auf 800 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

1 Liter Arbeitslösung wird jeweils frisch angesetzt aus  
100 ml 10 x Stocklösung  
+ 700-800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
+ 100-200 ml Methanol

### Natriumcarbonat-Puffer nach Dunn

10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10-20 % Methanol, pH 9,9 (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 NaHCO<sub>3</sub>  
3,2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
in 600 ml bidestilliertem Wasser lösen und pH auf 9,9 einstellen  
optional: Zugabe von 5-50 ml SDS-Lösung 20 %  
auffüllen auf 800 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

1 Liter Arbeitslösung wird jeweils frisch angesetzt aus  
100 ml 10 x Stocklösung  
+ 700-800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
+ 100-200 ml Methanol

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

<b>Transferpuffer</b>	<b>Blot über Nacht</b>	<b>Blotzeit 1 Std.</b>	<b>Blotzeit 3 Std.</b>
<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

## Allgemeine Daten

Methanol verhindert das Schwellen des Gels während des Transfers und verbessert die Absorption der Proteine an der Membran. Bei nativen Gelen bzw. dem Transfer von nativen Proteinen sollte kein oder nur wenig Methanol verwendet werden.

SDS verbessert die Transfereffizienz vor allem großer Proteine, kann allerdings bei sehr kleinen Proteinen / Peptiden, vor allem bei Nitrocellulosemembranen, zum Durchtritt der Peptide durch die Membran und damit zum Verlust führen. Vor allem im Semi-Dry-Blot (SDB) kann SDS beim Transfer kleinerer Proteine weggelassen werden.

### Empfehlung (ca. Werte)

	denaturierend		nativ	
	Methanol	SDS	Methanol	SDS
kleine Proteine /Peptide (ca. <20 kDa)	20 %	Tank: 0,01 % SDB: 0 %	5-10 %	Tank: 0,01 % SDB: 0 %
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)	5 %	Tank: 0,1 % SDB: 0,05 %	0 %	Tank: 0,1 % SDB: 0,05 %

## Empfohlene Reagenzien

Reagenz	Best. Nr.
TRIS-HCl	9090
TRIS (Base)	AE15
Glycin	T873
Roti-Stock 20 % SDS	1057
Methanol	4627
Roti <sup>®</sup> -Blot 1	L509
Roti <sup>®</sup> -Blot 2	P039

### 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. 11/2009