

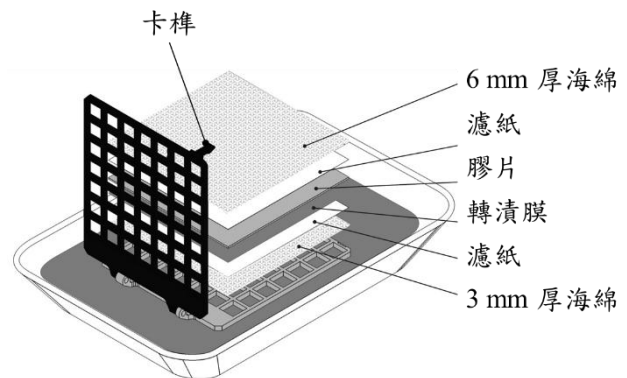
Hoefter TE22/TE22S Mighty Small Transfer Tank

濕式轉漬系統 簡易操作流程

1. 準備至少 **1.5 L transfer buffer**, 事先放置 4°C 冰箱中
2. 先以蒸餾水潤溼 Tank 與 cassettes
3. Option 1: 放置一顆磁攪拌子在 Tank 底, 轉漬時置放冰箱內磁攪拌器上, 以中低速旋轉之可調節降溫。
Option 2: 將 Tank 製於冰桶內, 用碎冰包裹 Tank 降溫, 轉漬過程中隨時補充碎冰。
Option 3: 將 Tank 外接冷卻系統 (限 TE22)

4. 準備轉漬 Cassette 組合:

01. **Transfer membrane**: 裁切與 gel 一樣大小的 transfer membrane, (PVDF membrane 須先浸泡於 15% methanol 中 15 秒, 然後再浸泡於去離子水中 2 分鐘) 浸泡於 **transfer buffer** 中 **2-5 分鐘**
02. 將 tray 內注入 transfer buffer 液面約 3cm 高, 將 cassette 打開, 黑色一側在上, **灰色一側浸入 buffer 中**
03. **Blotting paper**: 裁切與 gel 一樣大小的轉漬濾紙
04. 依下列順序 (**由下而上**) 層疊轉漬 stack (如下圖):
 - (1) 取一片 **3-mm 厚度的海綿**, 輕壓入 buffer 中使之吸飽液體, 氣泡完全跑出
 - (2) 放上一張 **blotting paper 約 0.9mm 厚**
 - (3) 放上已浸泡過 transfer buffer 的 **membrane**
 - (4) 放上 **Gel**, 以滾輪輕滾 stack 使氣泡跑出
 - (5) 放上一張 **blotting paper**
 - (6) 最後放上一片 **6-mm 厚度的海綿**



5. 然後小心闔上 cassette 並扣妥, 勿過於擠壓 stack, 如果過於緊, 換成 3-mm 厚度的海綿, 若過於鬆, 則加 blotting paper
6. Tank 內先注入**冰的 transfer buffer**, 將組好的轉漬 cassette 以卡榫一側向下的方向直立放置到 tank, 需將所有黑色面朝同一面, 並完全浸入 buffer, 液面高度不超過 Max 線
7. 上蓋的**黑色電極線與 cassette 黑色同一側**的方向蓋妥, 連接電源供應器, **紅色為(+)**極, **黑色為(-)**極, 電流設定固定在 **400 mA**, 電壓上限為 **100 V**, 轉漬時間 **1~1.5 小時**
8. 轉漬完成後, 以蒸餾水潤洗 Tank 與 cassettes, 放置風乾即可, 不可使用有機溶劑或清潔劑, 不可 autoclave.

Hofer TE22/TE22S Mighty Small Transfer Tank

濕式轉漬系統 簡易操作流程

轉漬電流電壓設定條件參考：

	protein	nucleic acids
Buffer	Towbin	1X TBE or 1X TAE
Current (A)	0.4	0.3
Voltage (V)	~100	50
Transfer time	~1 hour	~1 hour
Coolant temp.	10 °C	10 °C or less

Transfer buffer 製備配方：

Towbin buffer

(25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% v/v methanol, pH 8.3, 2 liters)

Tris (FW 121.1)	25 mM	6.0 g
Glycine (FW 75.07)	192 mM	28.8 g
SDS ^a (FW 288.4)	0.1% (3.5 mM)	2.0 g

溶解於 1.5 公升的蒸餾水中。根據需求加入甲醇。接著加入蒸餾水定容至 2 公升。請勿調整 pH 值，其值應介於 8.2 至 8.4 之間，不要手動調整 pH 值，若數值不對，通常建議重新配製以確保實驗精準度。使用前請先冷卻。

關於 SDS： 雖然加入低濃度的 SDS (0.1%) 有助於大分子蛋白質從凝膠中洗脫，但它可能會干擾蛋白質與膜的結合效率

關於甲醇： 甲醇在轉漬中的作用是幫助移除蛋白質上的 SDS，從而增強其與硝化纖維素膜 (Nitrocellulose) 的結合，但甲醇會導致凝膠收縮，可能會降低大分子的遷移速度

當後續實驗不能使用 Tris 時 (例如進行蛋白質測序/胜肽定序)，會選用 CAPS 作為替代緩衝液

CAPS buffer, 1X

(10 mM CAPS, pH 11.0, 2 liters)

CAPS (FW 221.3)	10 mM	4.44 g
[3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid]		

溶解於 1.5 公升的蒸餾水中，用 NaOH 調整到 pH 11.0。接著加入蒸餾水定容至 2 公升。

