

Proteintransfer (Handschuhe anziehen!)

Behandlung der fertigen Gele:

- Befülle 2 Schalen mit Transferpuffer (1 für die Gele, 1 für die Membranen)
- Nehme die Gelkassette aus der Apparatur und lege das Glasplatten-Sandwich so auf den Labortisch, dass die Beladungsreihenfolge der Geltaschen die richtige Orientierung hat
- Hebel mit dem grünem Spatel vorsichtig die Scheiben auf, so dass sich die obere Glasplatte löst
- Trenne das Sammelgel vom Trenngel und entferne die linke obere Ecke des Gels, um die Orientierung während der nachfolgenden Schritte zu bewahren
- Löse das Gel vorsichtig mit dem grünem Spatel und mit angefeuchteten Fingern (Laufpuffer) von der Platte und überführe es in die Schale mit dem Transferpuffer, inkubiere für ca. 15 min

In der Zwischenzeit:

- Schneide (falls noch nicht geschehen) die Nitrocellulose-Filter (Schutzpapier auf Ober- und Unterseite belassen, Filter nicht drücken, daran kratzen o.ä.!) passend zum Gel (i.d.R. im Format 6 x 9 cm)
- Löse die Membranen mit der Pinzette aus ihren 2 Schutzblättern (nicht mit den Fingern anfassen!!!!) und lege die Nitrocellulose-Filter auf die Flüssigkeits-Oberfläche des Transferpuffers, warte bis die Filter einheitlich grau geworden sind, dann erst tunke die Filter mit der Pinzette unter (nicht auf die Fläche drücken!), inkubiere für ca. 15 min
- Schneide am besten auf Vorrat (staubfrei lagern!) Filterpapier (Whatman) ebenfalls im passenden Format (6 x 9 cm) zu. Alternativ kann als obere und untere Lage des Blot-Sandwiches das dicke Blotpapier von Biorad im passenden Zuschnitt verwendet werden
- Lege pro Gel 2 Blätter des Biorad-Blotpapiers (oder 10 Blätter Whatman-Filterpapier) luftblasenfrei in den Transferpuffer und lasse sie vollsaugen
- Säubere die Blottapparatur mit A. dest
- Baue nun den Blotstapel auf der unteren Elektrode (Platin-Anode) des Semi-Dry-Blotapparates zusammen:
Luftblasenfrei (durchnässte Filter, Gele, Membranen abrollen!) schichten:

- Sandwich-Bau für 1 Gel:

1. Biorad-Filter (oder 5 x Whatman-Filterpapier)
2. Nitrocellulosemembran
3. Polyacrylamidgel (fehlende Ecke zeigt nach links oben)
4. Biorad-Filter (oder 5 x Whatman-Filterpapier)

- Sandwich-Bau für 2 Gele übereinander:

1. Biorad-Filter (oder 5 x Whatman-Filterpapier)
2. Nitrocellulosemembran
3. Polyacrylamidgel (fehlende Ecke zeigt nach links oben)
4. 3x Whatman-Filterpapier
5. Nitrocellulosemembran
6. Polyacrylamidgel (fehlende Ecke zeigt nach links oben)
7. Biorad-Filter (oder 5 x Whatman-Filterpapier)

Das fertige Sandwich sollte am Ende so aussehen:



1 x Biorad-Blotpapier oder 5 x Whatmanfilter
 Polyacrylamidgel
 Nitrocellulosemembran
 1 x Biorad-Blotpapier oder 5 x Whatmanfilter

- Wenn mehr als ein Gel geblottet werden soll, werden 2 oder 4 solcher Sandwiches auf der unteren Elektrode aufgebaut (4 nebeneinander ist zur Erzielung eines gleichmäßigen Blotergebnisses besser als je 2 übereinander!). Achte darauf, dass sich die Stapel seitlich nicht berühren!

- Wenn Nitrocellulose und Gel aufeinander liegen, bewege oder verschiebe das Sandwich nicht mehr!

- Wenn alle Sandwiches aufgebaut sind, rolle mit einem Glasstab/Pasteurpipette leicht und gleichmäßig über den Stapel, um eine gleichmäßige Pufferverteilung zu gewährleisten

- Entferne mit einem Kleenex vorsichtig überschüssigen Puffer von der unteren Elektrode

- Verteile nun flächig je 6 Tropfen Transferpuffer mit einer Einmal-Plastikpipette auf jedem Sandwich

- Setze die obere Elektrode (Edelstahl-Kathode) waagrecht auf und lasse sie einrasten. Setze den Deckel ebenfalls auf das Gerät

- Stelle die elektrische Verbindung zum Netzgerät her (Polung beachten!) und schalte das Netzgerät an

- Einstellungen (eine Spannung von 25 V sollte zu keinem Zeitpunkt überschritten werden!):

Anzahl/Orientierung der Gele	Blotzeit in min	konst. Stromstärke in mA
1 Gel (6 x 9 cm)	15	400
2 Gele, nebeneinander	30	400
4 Gele, 2 Stapel mit je 2 Gelen	30	400

- Nach Ende der Blotzeit schalte das Gerät ab, entferne die oberen Filter und Gele (verwerfen)

-Beschrifte nach dem Blotten die Membran an der linken oberen Ecke (Datum, ...)

- Überführe die Membran ins Ponceau-Bad (1 x Arbeitslösung) für ca. 10 min bei RT (Pinzette benutzen, Gesichtsseite nach oben)

Ponceau-Stammlösung ist 10 x konzentriert → 1:10 mit A. dest. verdünnen

- Hole die Blots einzeln nacheinander mit der Blotpinzette aus der Ponceau-Lösung, ziehe sie einmal kurz durch ein Bad mit A. deion. und lege den Blot sofort zwischen zwei Seiten frischen Filterpapiers

- Markiere mit einem weichen Bleistift die Protein-Standardsignale (Achtung, Blot nicht zerreißen, Blots nicht ohne Handschuhe anfassen!).

- Lagere die Blots gegeben falls bis zu ihrer Weiterverarbeitung zw. zwei Filterpapieren

2. Western-Blot (Handschuhe anziehen)

- Die Weiterbehandlung der Blots erfolgt in den passenden grauen Plastikbehältern auf dem Schüttler (Schalen mit Parafilm abdecken):

	Zeit/Temp.	Lösung	Gele (6 x 9 cm)
blockieren	1,5 h/ RT	Blockierlösung 3 % Milch-TTBS	25 ml
prim. Antikörper (1:1000)	über Nacht bei 4 °C	Inkubationslösung 0,1 % Milch-TTBS	10
3 x waschen	je 5 min/ RT	Waschlösung 0,1 % Milch-TTBS	je 25 ml
sek. Antikörper (HRP-coupled) (1:5882)	1 h/ RT	Inkubationslösung 0,1 % Milch-TTBS	10
3 x waschen	je 5 min/ RT	Waschlösung 0,1 % Milch-TTBS letzter Waschschrift: TTBS ohne Milch	je 25 ml

- Achte darauf, in welchem Tier der primäre Antikörper hergestellt ist (Kaninchen (rabbit), Maus (mouse), Schaf (sheep), Ziege (goat) etc.), weil der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper danach ausgesucht werden muss!

- Bringe die Blots nach dem letzten Waschschrift in die Dunkelkammer, und bereite diese für den ECL-Nachweis vor (Licht aus, nur der Computer darf an sein).

- Kombiniere in einem sauberen grauen Inkubationsbehälter je 2,5 ml der ECL-Reagenzien A und B

- Inkubiere jeden Blot 1 min unter leichter Bewegung mit 1 x Umdrehen

- Lege den Blot mit der Gesichtsseite nach oben auf eine Plastikfolie (z.B. untere Lage eines dreiseitig aufgeschnittenen klaren Müllbeutels) und decke die obere Lage durch Abrollen darüber (keine Luftblasen fangen!).

- Wische vorsichtig (leicht und gleichmäßig) überschüssiges Reagenz mit einem Kleenex aus dem Sandwich heraus und tupfe es auf, so das kein Reagenz an den Plastiklagen klebt (Sandwich in sich dabei nicht verschieben!)

- Detektiere die Signale mit dem FUSION-FX7 Advance™ - Multi-Imaging Instrument (Vilber Lourmat)

- Werte die Signale in Phoretix 1D aus (optische Dichte, Molekularmasse etc.)

- Nach dem Ende der ECL-Prozedur wasche die Blots gründlich in A. dest, färbe noch einmal Ponceau und trockne die Blots zwischen zwei Filterpapieren. Die Blots können dann auf einem sauberen DIN A4-Blatt gelegt werden, und in einer klaren Aktenhülle aufgehoben werden. Die Blots können so, wenn sie nicht mit bloßen Händen angefasst und staubfrei gelagert werden, aufgehoben und ggf. für spätere Nachweisreaktionen benutzt werden.

- Soll sich an die ECL-Prozedur eine weitere Nachweisreaktion anschließen, werden die Blots gründlich in A.dest. gewaschen und anschließend für 15 min bei 50 °C in Strip-Puffer inkubiert.

- Es kann sinnvoll sein, die Abschwemmung der Primär- und Sekundärantikörper durch einen ECL Test zu überprüfen (dazu Blots 2 x 5 min in TTBS-Lösung ohne Milch waschen, dann ECL-Prozedur in der Dunkelkammer ausführen).

- Zur Durchführung der zweiten Nachweisreaktion werden die Blots dann wieder in A. dest. gründlich gewaschen und in Blockpuffer (TTBS mit 3 % Milch) bei Raumtemperatur für 1-1¹/₂ h inkubiert.

Lösungen:

Transferpuffer (5 l) (48 mmol/l Tris, 39 mmol/l Glycin, 1,3 mmol/l SDS, 20 % Methanol, pH 9,2)		
Tris (free base)	29,1 g	<ul style="list-style-type: none"> • Tris und Glycin in 2 l A. dest lösen • SDS-Lösung und Methanol zugeben • auf 5 l mit A. dest auffüllen, bei 4 °C lagern pH-Wert liegt bei 9,2; muss nicht eingestellt werden!
Glycin	14,7 g	
10 % SDS-Lösung	18,75 ml	
Methanol	1000 ml	

10 x TTBS-Lösung (End-Konz. (1 x): 0,1 mol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,5)		
Tris	121,1 g	<ul style="list-style-type: none"> • Tris und NaCl in 600 ml A. dest lösen • pH mit konz. HCl auf pH 7,5 einstellen (ca. 60 ml) • Tween 20 zugeben, auf 1 l mit A. dest auffüllen • bei 4 °C lagern • vor Gebrauch 1 Teil TTBS (10x) mit 9 Teilen A. dest verdünnen
NaCl	87,7 g	
Tween 20	10 ml	

Blockierlösung 3 % (w/v) Milch-Gesamtvolumen 100 ml, reicht für 4 Blots		
Milchpulver	3 g	<ul style="list-style-type: none"> • 3 g Milch lösen in 100 ml 1x TTBS (10 ml 10x TTBS + 90 ml A.dest)

Waschlösung/Inkubationslösung 0,1 % (w/v) Milch-Gesamtvolumen 1000 ml, reicht für 4 Blots		
Milchpulver	1 g	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g Milch lösen in 1000 ml 1x TTBS (100 ml 10x TTBS + 900 ml A.dest)

Primär-Antikörper	Verdünnung	µl auf 10 ml TTBS-Lösung mit 0,1 % Milch	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	µl auf 10 ml TTBS-Lösung mit 0,1 % Milch
	1:6000	1,7		1:5882	1,7
	1:5000	2		1:5882	1,7
	1:4000	2,5		1:5882	1,7
	1:3000	3,3		1:5882	1,7
	1:2000	5		1:5882	1,7
	1:1000	10		1:5882	1,7
	1:500	20		1:5882	1,7

Pufferlösung zum Strippen von Blots: (End-Konz.: 48 mmol/l Tris, 2 % SDS, 1 % β-Mercaptoethanol, pH 6,7)		
Tris	2,9 g	<ul style="list-style-type: none"> • Tris in 300 ml A. dest lösen • pH mit konz. HCl auf pH 6,7 einstellen • SDS und β-Mercaptoethanol zugeben, auf 500 ml mit A. dest. auffüllen • bei 4 °C lagern
10 % SDS-Lösung	100 ml	
β-Mercaptoethanol	5 ml	

Ponceau-Lösung (1 x, Arbeitslösung)		
Trichloressigsäure (TCA)	3 g	<ul style="list-style-type: none"> • TCA, Ponceau und SSA in 100 ml A. dest lösen • bei RT lagern
Ponceau S	0,2 g	
Sulfosalicylsäure (SSA)	3 g	