



**Mini TBC 型转移槽**

**Mini TBC 型转移芯**

# 使用手册



---

北京凯元信瑞仪器有限公司

地址：北京市宣武门外大街 28 号富卓大厦 B 座 605 电话：8610-63015080 传真：63015596 Website: [www.kysino.cn](http://www.kysino.cn)



# 开箱说明

- 一、 凯元公司（CAVOY）的 Mini TBC 型电泳转移系统采用外观整洁的优质瓦楞纸纸箱包装，内衬优质环保型包装材料；在外部显著部位贴有明确的产品标签。用户收到该产品后，请仔细检查外包装有无明显破损或损坏，如发现产品外包装存在任何问题，请及时联系我们北京凯元信瑞仪器有限公司，电话：010-63015080 / 63019969；传真：010-63015596。或者当地的代理商。
  
- 二、 装箱清单：
  - 1, Mini P-4 型电泳缓冲液槽及带有专用线缆的上盖各一。  
(注：Mini TBC 型转移芯产品中不包含此项)
  - 2, Mini TBC 型转移电泳芯一个。
  - 3, 凝胶三明治夹两个。
  - 4, 转移衬垫四个。
  - 5, 使用手册一本。
  
- 三、 使用前请仔细阅读本手册，认真了解电泳系统各部件的性能特点及使用方法。严格按照使用手册进行操作可以最好地优化实验条件，进而得到最佳的结果；同时还可以避免对电泳系统造成人为的损坏，延长产品的使用寿命。
  
- 四、 北京凯元公司推荐您在使用 Mini TBC 转移电泳系统之前，使用中性实验室用洗涤剂清洗电泳槽及所有部件，然后再以蒸馏水彻底冲洗干净。

# 目录

	页码
<b>第一章 总论</b> .....	<b>1</b>
1.1 简介 .....	1
1.2 技术规格 .....	2
1.3 安全须知 .....	3
<b>第二章 电泳槽组装及转移电泳准备</b> .....	<b>4</b>
2.1 Mini TBC 转移槽与配件 .....	4
2.2 转印准备 .....	5
2.3 酸性转移 .....	7
<b>第三章 电泳转移条件</b> .....	<b>7</b>
3.1 转移缓冲液和运行条件的常规指南 .....	7
3.2 电泳转移条件的注意事项 .....	8
3.3 缓冲液配方 .....	9
<b>第四章 优化转移电泳条件的步骤</b> .....	<b>10</b>
4.1 优化蛋白转移 .....	10
4.2 优化 DNA 和 RNA 转移 .....	11
<b>第五章 转印膜的选择</b> .....	<b>11</b>
5.1 蛋白印记膜 .....	11
5.2 DNA 和 RNA 印记膜 .....	12
<b>第六章 故障排除</b> .....	<b>13</b>
6.1 电泳转移 .....	13
6.2 免疫特征检测 .....	15
6.3 总蛋白检测 .....	17
<b>第七章 产品信息与配件</b> .....	<b>19</b>
<b>第八章 参考书目</b> .....	<b>20</b>

## 第一章 总论

### 1.1 简介

转印的第一次实际操作是 Southern 在 1975 年把 DNA 从琼脂糖凝胶中转移到硝酸纤维素膜上。其后转印被应用到了在琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶中的 RNA 和蛋白质上。为避免毛细管转移的无效，1979 年 Towbin 等人第一次将电流用于转移聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质。电泳转移的使用同样被应用于 DNA 和 RNA 的转印。众多已发表的文章涉及蛋白质电泳转移技术的话题。综述性的总结电泳转印方法学的文章也已大量出现。更广泛更全面的参考资料与应用文献请参阅相关技术资料。

Mini TBC 转移电泳槽是北京凯元信瑞公司小型电泳系统的一部分，该系统还包含了可运行 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 凝胶的 Mini P-4 型垂直板电泳槽。电泳模块的可更换性是这套电泳系统的显著特点。当用户完成第一步电泳后，将模块取出换入另一模块，即可进行下一步电泳。

Mini TBC 型转移芯可同时容纳两个带有 Mini P-4 电泳槽产生的凝胶的转移电泳夹套。Mini TBC 电泳转移槽可以被用于聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶中的蛋白质和核酸样品的转印。它同时可用于在水平电泳槽中运行的等电聚焦凝胶或潜水电泳槽中的 DNA 和 RNA 凝胶。

Mini TBC 转移槽的核心是它的转移芯。此芯在 4cm 的平行电极之间可容纳两个凝胶三明治夹。转印的驱动力来自加在两电极之间的电压。短短 4cm 的电极距离允许较高驱动力的生成，从而产生有效的蛋白转移。电泳转移芯的第二个特点是提供了冷却冰盒—冷却装置。冷却冰盒是 Mini TBC 转移槽和转移芯的标准配置，经冷冻后他可以吸收在快速转移电泳中产生的焦耳热。使用内置的冷却装置可免除使用昂贵的外部冷却循环水浴设备，同时免去管路连接的麻烦。Mini TBC 的其他特点包括：凝胶夹套上简单易用的闭锁装置、颜色标记的凝胶夹套和电泳芯便于在转移电泳时的准确定向、特殊设计的插入和拔出装置使操作更加有效等。所有这些特点都是为了确保使 Mini TBC 成为一款简便易用、具有完美转印效果的转移电泳系统。

## 1.2 技术规格

电泳芯:	聚碳酸酯 (Polycarbonate)
凝胶三明治夹套:	聚碳酸酯 (Polycarbonate)
电泳电极:	铂金丝 (Platinum wire) 0.25mm 直径
缓冲液槽与上盖:	聚碳酸酯 (Polycarbonate)
冷却装置:	聚乙烯 (Polyethylene) + 高效蓄冷剂
电泳槽大小:	16 cm (L) x 12 cm (W) x 18 cm (H)
凝胶夹大小:	10 cm x 11 cm
最大凝胶面积:	7.5 cm x 10 cm
缓冲液容量:	
无冷却装置:	850 ml
有冷却装置:	650 ml
清洗:	使用中性洗涤剂和温水清洗电极、凝胶夹套和缓冲液槽。 清洗电泳电极时须特别小心, 避免拉伸或折断铂金丝。不要使用研磨剂或强去垢剂清洗设备。使用热水漂洗纤维衬垫, 然后用蒸馏水、去离子水冲洗干净。
化学试剂兼容性:	Mini TBC电泳槽的所有组件均不可以接触氯代烃类 (如氯仿)、芳香烃类 (如甲苯, 苯) 和丙酮。使用有机试剂造成的损坏均不在保修范围之内。

### 1.3 安全须知

Mini TBC 电泳槽的电源由外接的直流电压电源提供。此电源的输出必须与外部地线隔离，从而保证直流电压的输出全部通过电泳槽，不与地线形成回路。所有凯元（CAVOY）系列电泳电源均满足这一安全标准。不论使用任何电源，下列指标为 Mini TBC 电泳槽所允许的最大操作参数：

- 150 V（直流）            最大输入电压
- 40 W                      最大输入功率
- 50°C                      最高使用温度

通过电泳槽的电流全部经过上盖接入，从而为用户提供安全互锁。当上盖被打开时接入电泳槽的电流即被切断，请务必在关断电源后打开或移走上盖。不要尝试在没有上盖的情况下使用电泳槽。

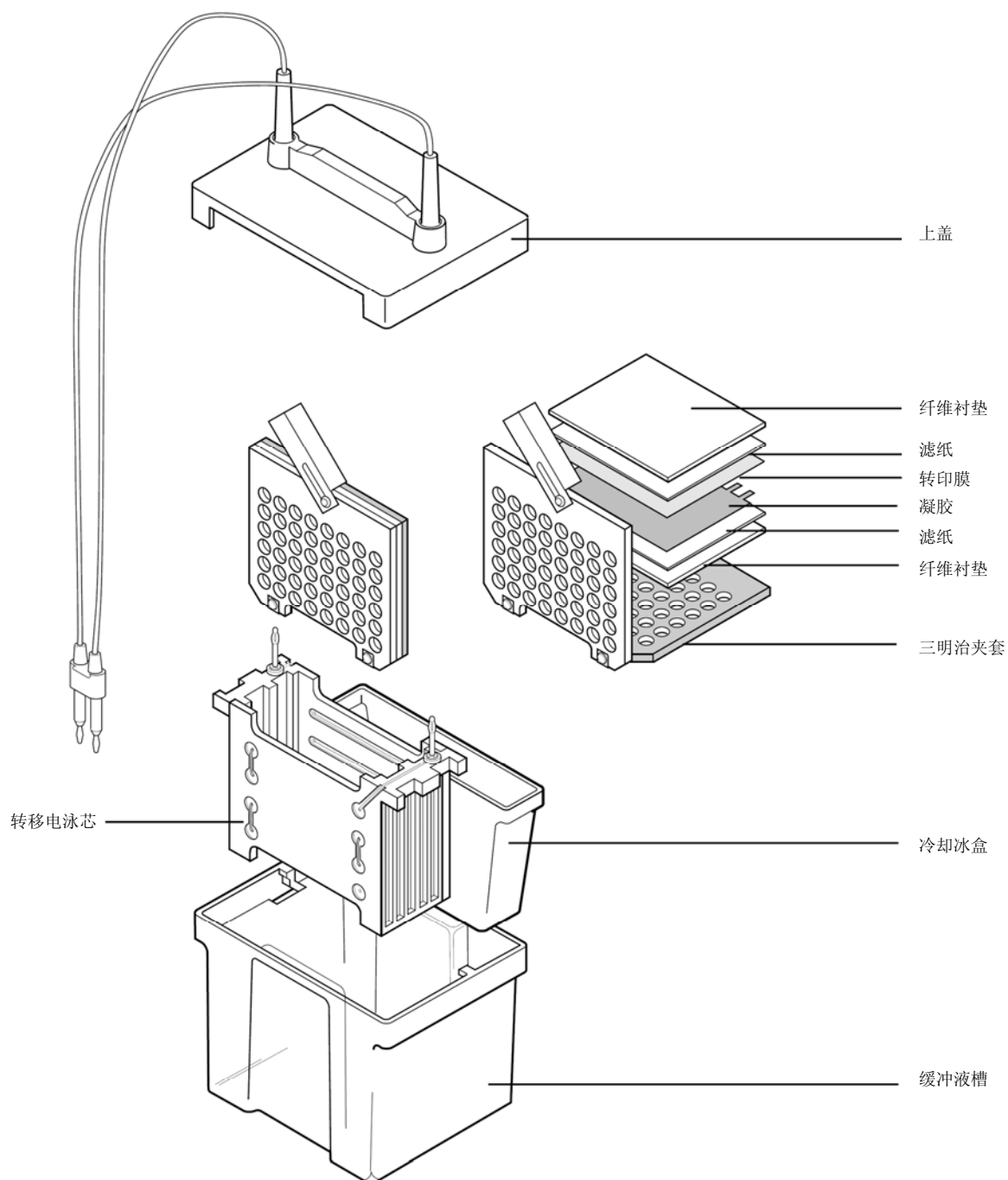
**注意：**凯元（CAVOY）系列产品从设计到生产均满足认定的安全标准，严格按照使用说明的操作将是安全的。该设备不可以任何方式、方法进行修改或改进。同时，对产品的改造会造成

- 使质保失效
- 破坏安全标准
- 造成潜在安全隐患

北京凯元信瑞仪器有限公司对于任何使用该产品由人为故意或未经许可对产品的修改所造成的损害和损失不承担责任。

## 第二章 电泳槽组装及转移电泳准备

### 2.1 Mini TBC 电泳槽及各部件装配

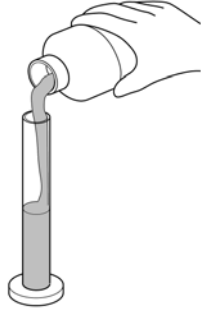




## 2.2 转印准备

将冷却冰盒放入-20°C冰箱中冷冻备用，使用后再放回冰箱中冷冻储存。

1. 准备转移缓冲液（参见第 3.3 节中有关缓冲液的配方，将缓冲液冷却至 4°C 会有利于热量的扩散）



2. 按照凝胶的大小剪切滤纸和膜，注意在操作膜时一定要戴手套以避免污染。平衡凝胶，在转移缓冲液中浸泡膜、滤纸和转移衬垫（15 分钟-1 小时，取决于凝胶厚度）
3. 制备凝胶三明治夹

将三明治夹套的黑色向下放置在干净的桌面上。

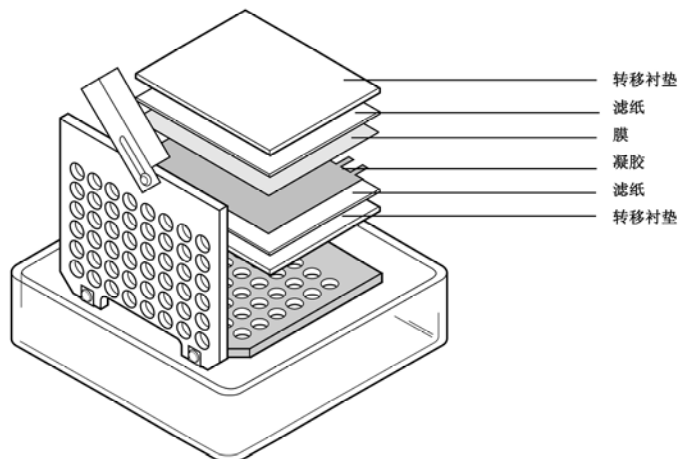
放置一个预湿润的转移衬垫在夹套的黑色部分上。

在转移衬垫上放置浸湿过的滤纸。

把平衡后的凝胶放在滤纸上。（排出凝胶与滤纸之间的气泡）

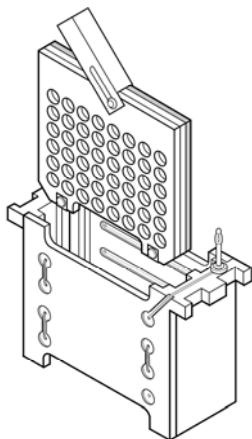
将浸泡过的膜放在凝胶上。（排出膜与凝胶之间的气泡）

放置滤纸在膜上并排出任何气泡，然后加上转移衬垫。

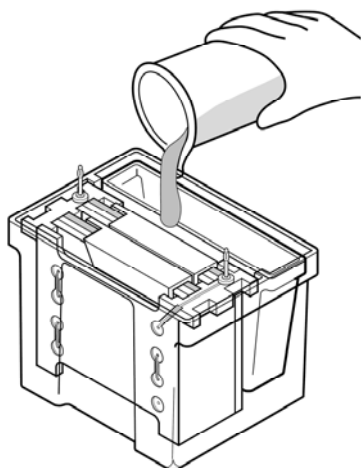


注意：将气泡完全排出是得到好的转移效果的关键。可使用玻璃棒轻轻滚动将气泡赶出。

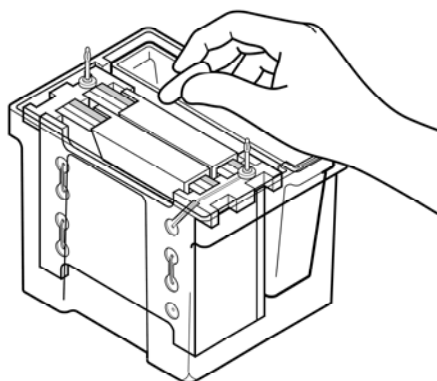
4. 夹紧夹套，小心不要移动凝胶和滤纸三明治，用白色滑块锁住夹套。
5. 将夹套插入转移电泳芯中，重复上述步骤制备另一个凝胶三明治夹。



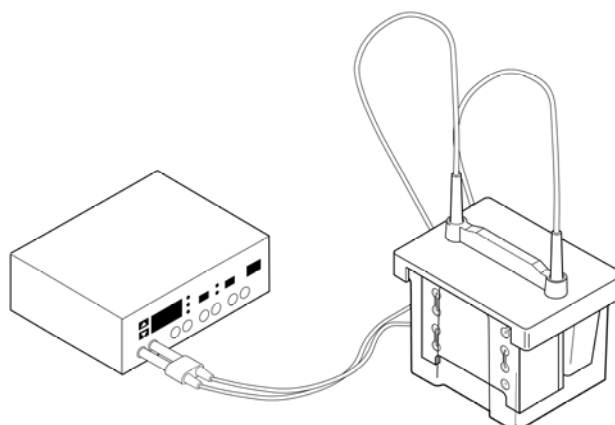
6. 放入缓冲液槽中加入冷冻的冷却冰盒，用缓冲液充满。



7. 放入搅拌子帮助维持缓冲液的温度和离子强度均匀，设定尽可能快的速度使离子分布均衡。



8. 盖上安全盖，将电源线缆插入电泳电源开始电泳。不同缓冲液的电压设定和电泳时间参见第3章的相关内容。



9. 电泳结束后，分解三明治夹，将膜取出继续下一步操作。以实验室用中性洗涤剂清洗电泳槽、夹套、衬垫等，再离子水冲洗干净。

### 2.3 酸性转移

如果转移是在酸性条件下进行，请交换凝胶与膜的位置，将膜放在凝胶的负极一端。在酸性条件下，蛋白质将向相反方向转移——向负电极方向泳动。不要反转电极本身，否则将损坏电泳槽。

## 第三章 电泳转移条件

### 3.1 转移缓冲液和运行条件的常规指南

表3.1提供了不同缓冲液环境下的电源条件，同时提供了不同转移时间时的电源条件。多种条件显示，电压越高电泳运行时间越短。电泳过程中需使用冷却冰盒。

**表 3.1 缓冲液与运行条件指南**

缓冲液	标准场强 转移过夜	高场强 电极间距离4cm 转移时间1小时
<b>SDS-PAGE Gels</b>	<b>Buffer A or B or C</b>	<b>Buffer A or B or C</b>
<b>A:</b> 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, with or without 20% MEOH and .025%–0.1% SDS.	30 V 90 mA	100 V 350 mA
<b>B:</b> 48 mM Tris, pH 9.2, 39 mM glycine, with or without 20% MEOH and .025%–0.1% SDS.		
<b>C:</b> 10 mM NaHCO <sub>3</sub> , 3 mM NaCO <sub>3</sub> , pH 9.9, with or without 20% MEOH and .025%–0.1% SDS.		

<b>DNA and RNA</b>		
<b>TAE:</b> 20 mM Tris, pH 7.8, 10 mM sodium acetate, 0.5 mM EDTA	30 V 100 mA	80 V 500 mA
<b>TBE:</b> 50 mM Tris, pH 8.3, 50 mM sodium borate, 1.0 mM EDTA		
<b>Native Gels</b>		
25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine. No methanol.	30 V 90 mA	100 V 350 mA
<b>Isoelectric Focusing, Native Gels, Basic Proteins, Acid Urea Gels</b>		
0.7% acetic acid	30 V 100 mA	100 V 350 mA

### 3.2 电泳转移条件的注意事项

下列变化将改变电阻，进而引起电流改变：

- 缓冲液制备中的变更。如：增加了 SDS 或者在调整缓冲液 pH 时加大了酸或碱的量从而改变了离子强度。
- 凝胶 pH 值、离子强度、丙烯酰胺的百分比，特别是当凝胶没有被很好的平衡时。
- 凝胶数量；凝胶数量增加会使得电流轻微加大。
- 缓冲液体积；缓冲液体积增加时电流相应加大。
- 铂金电极质量；电极质量加大则电流也增大。
- 电泳转移温度；温度增加电流也增加。
- 电泳转移时间；随着电泳的运行，缓冲液的缓冲能力被减弱，电流加大。

#### 凝胶的预平衡

所有凝胶在进行转移电泳之前必须用转移缓冲液进行预平衡。预平衡可以有利于去除电泳缓冲液中盐的污染和中和盐（产生于在转移前使核酸变性的盐）。如果盐没有被去除，他将增加转移缓冲液的电导并在电泳中产生大量的热。同时，低浓度凝胶(<12%)在含甲醇的溶液中会收缩，平衡会使凝胶在电泳转移之前调整到它本身的最终大小。

#### 转移电泳中搅拌子的使用

在所有转印应用中，搅拌子必须被放入 Mini TBC 电泳槽中，以使得转移缓冲液在实验过程中被搅拌。这有助于维持转移缓冲液在转移电泳时的电导率和温度的均一性。不能很好的控制转移缓冲液的温度，会对大分子的转移造成不好的影响，并形成一個潜在的安全隐患。

#### 转移缓冲液 pH 值

除非特别指出不要调整转移缓冲液的 pH。调整缓冲液 pH 会造成缓冲液电导率增加，初始电流输出高于预期值以及电阻减小可以证明这一点。推荐使用 Power B 电泳电源在每次转移电泳前检测一下初始电流值。

## 转移缓冲液推荐

请使用高质量试剂级别的甲醇。污染过的甲醇可造成转移缓冲液电导率的增加，进而使大分子的转移失败。不要重复使用或稀释转移缓冲液至推荐浓度以下。不建议重复使用转移缓冲液是由于该缓冲液在电泳过程中无法维持稳定的 pH；稀释缓冲液至推荐浓度以下会降低它的缓冲容量。

## 最大电压

在转移过夜时不要超过表 3.1 中列出的电压设定值，缓冲液的电导率须与表中所列电流相近。电流上限应该在电泳电源中被设定。一旦低电压的过夜转移对你的应用无效，则需进行高电压电转，但转移时间必须减少。否则会引发安全隐患。

### 3.3 缓冲液配方

所有配方均为 1 升缓冲液准备。Mini TBC 转移电泳槽大约需要 500ml 缓冲液。

不要以增加酸碱来调整缓冲液 pH 值。甲醇需要分析纯的，低纯度甲醇中的金属污染物会污染电极。

**注意：**一些 pH 电极对于 Tris 不敏感，如果发现缓冲液 pH 是 off，请检查该 pH 电极是否适用于 Tris 缓冲液。如果 pH 电极正确但缓冲液 pH 值低于 8，须重配缓冲液。

#### 25 mM Tris, 192 mM 甘氨酸, 20% v/v 甲醇, pH 8.3

混合 3.03 g Tris, 14.4 g 甘氨酸, 和 200 ml 甲醇; 加入蒸馏去离子水(dd H<sub>2</sub>O) 至 1 升

#### 25 mM Tris, 192 mM 甘氨酸, pH 8.3

混合 3.03 g Tris, 14.4 g 甘氨酸; 加入蒸馏去离子水(dd H<sub>2</sub>O) 至 1 升

#### 48 mM Tris, 39 mM 甘氨酸, 20% v/v 甲醇, pH 9.2

混合 5.82 g Tris, 2.93 g 甘氨酸溶于 ddH<sub>2</sub>O 中, 加入 200 ml 甲醇, 以 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 升

#### 48 mM Tris, 39 mM 甘氨酸, pH 9.2

混合 5.82 g Tris and 2.93 g 甘氨酸

加入 ddH<sub>2</sub>O 至 1 升

#### 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM NaCO<sub>3</sub>, 20% 甲醇, pH 9.9

混合 0.84 g NaHCO<sub>3</sub> 和 0.318 g NaCO<sub>3</sub> 溶于 ddH<sub>2</sub>O 中, 加入 200 ml 甲醇

以 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 升

#### 1.0x TBE (Tris-硼酸 EDTA), pH 8.3

90 mM Tris-硼酸 1 mM EDTA

#### 5x 储存溶液

54 g Tris 碱

27.5 硼酸

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

加入 200 ml 5x 储液 至 800 ml ddH<sub>2</sub>O 制备 1.0x 缓冲溶液

#### 1x TAE (Tris-醋酸 EDTA)

40 mM Tris-醋酸 1 mM EDTA

50x 储存溶液

242 g Tris 碱

57.1 ml 冰醋酸

100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

1x 缓冲溶液: 加入 20 ml 50x 储液 到 980 ml ddH<sub>2</sub>O

## 第四章 优化转移电泳条件的步骤

### 4.1 优化蛋白转移电泳

一般来说，定量洗脱高分子量的蛋白质是困难的。下列对策单独或合并使用有助于提高转移效率。

#### 不同的凝胶组成

梯度凝胶比单一浓度的凝胶更有利于洗脱分子量范围宽的蛋白质。

降低聚合物单体的总浓度可以形成更多孔的凝胶。

无论丙烯酰胺的浓度是多少，交联剂甲叉-双丙烯酰胺的浓度（%C）为 5.26%的凝胶具有最小的孔径，%C 的增加或减少会使凝胶孔径加大从而降低分辨率。

$$\%C = \frac{\text{甲叉-双丙烯酰胺(g)}}{\text{甲叉-双丙烯酰胺(g)} + \text{丙烯酰胺(g)}} \times 100\%$$

#### 增加转移时间

初始控制条件决定了全部转移完成所需要的时间。转移时间可以从 30 分钟到过夜，随控制条件而不同。须注意，过夜转移的电压应设定于 30V，以减少热的产生。

#### 增加电场强度

初始条件需考虑在保证足够的转移效率（V/cm）的同时，兼顾转移温度的影响。温度增加在改变蛋白质变性状态的同时，也改变缓冲液的电阻，引发电场力的变化；从而影响转移效率。

#### 降低缓冲能力

稀释缓冲液会使得给定电压下的电流降低，在使用更高的电压时不会产生过多的热。

#### 不同的缓冲液类型和 pH

改变缓冲液类型和 pH 值可以最大化荷-质比。在 SDS 转移缓冲液中的乙醇似乎可以从蛋白分子上剥离 SDS。在 Tris、甘氨酸、甲醇、pH8.3 缓冲液中的碱性蛋白可以假定处于等电中性状态，使得蛋白无法转移。例如溶菌酶既显示出此种行为。pH 值为 9.5 到 10 的缓冲液会使像溶菌酶和组蛋白这样的碱性蛋白质呈现较好的转移效果。

不同类型的缓冲液即使有相似的电场强度（V/cm）也会有不同的转移效率。一般来讲 Tris 缓冲液比醋酸和磷酸缓冲液具有更好的转移效果。

#### 增加去垢剂

文献报道在 Tris/甘氨酸/甲醇缓冲液中增加 0.1%SDS 浓度可以提高转移效率。然而，SDS 在增加相应电流、电场强度和产热的同时，由于低于 10°C 的温度会造成 SDS 沉淀，所以初始缓冲液温度应稍高。SDS 同样会影响一些蛋白的抗原性。加入 SDS 是为了帮助从凝胶中洗脱蛋白，但也会降低这些蛋白与硝酸纤维素膜的结合效率。

#### 在转移缓冲液中去除醇类

转移缓冲液中的醇类物质只是用来促进 SDS 蛋白与硝酸纤维素膜的结合。去除醇类可以增加转移效率但与膜的结合会降低。转移效率的增加是因为醇会使凝胶的孔径收缩而使大分子蛋白滞留在胶内。使用 PVDF 膜可以消除 SDS 蛋白对醇类物质的需要，并可为大分子蛋白和难于转移的蛋白建立合理的分析策略。PVDF 膜需先用 100%甲醇浸湿然后用于无甲醇缓冲液中。

## 有限的蛋白酶处理

有文献报道使用蛋白酶在转移过程中有限消化蛋白可以增强转移效率而不降低蛋白质的免疫学活性。

## 变换膜的类型

如前所述，使用 PVDF 膜可以使转移电泳在无甲醇的条件下进行。

## 变换凝胶类型

如果可能，使用非变性梯度凝胶来分离不同分子量的蛋白质。如果不是必须按照分子量来分离蛋白样品，可以考虑使用等电聚焦凝胶或 native 凝胶。

## 增强凝胶与膜的接触

由于凝胶与膜的不良接触造成的蛋白分子与膜的有效结合的失败，经常会被混淆为无效洗脱。这种不良接触通常是由凝胶与膜之间过多的液体造成。使用试管或玻璃棒作为“滚轮”的实验技巧可以保证良好的接触。正确选择滤纸间隔物有助于确保压紧；凝胶和膜转移电泳前在转移缓冲液中平衡 30 分钟至 1 小时，将帮助防止转移过程中的收缩，同时去除凝胶中的尿素和 SDS 等反应物。

## 4.2 优化 DNA 和 RNA 转移电泳

核酸洗脱的问题可以用变化凝胶的百分比来解决。稍许困难的是定量转移基因组条带中的大量 DNA。下列策略可以被考虑用于这样的转移。

### 变换凝胶成份

降低聚丙烯酰胺凝胶的总单体百分比 (%) 或交联剂百分比 (%)。  
降低琼脂糖凝胶的百分比 (%), 这将对大分子量 DNA 的转移有利。

### 变换 DNA 变性剂

乙二醛变性比氢氧化钠更有利于 DNA 的洗脱。煮沸聚丙烯酰胺凝胶使 DNA 变性同样可以给出完美的结果。碱变性通常会引起聚丙烯酰胺凝胶变软并粘在膜上。

## 第五章 转印膜的选择

### 5.1 蛋白印记膜

#### 硝酸纤维素膜

硝酸纤维素膜被广泛用于蛋白的结合与检测。它的总蛋白检测可以简单地用蛋白染料（如：氨基黑、考马斯兰、丽春红S、固绿FCF等）或更加灵敏的胶体金染料染色，并可以进行放射性免疫分析（RIA）、荧光免疫分析（FIA）和酶联免疫分析（EIA）。硝酸纤维素膜具有80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的较高结合容量，不需预处理，非特异性蛋白结合位点容易被封闭，避免了背景问题的出现。低分子量蛋白（分子量 $<20\text{KD}$ ）容易在转移后的冲洗中丢失，造成检测灵敏度降低。更小孔径的硝酸纤维素膜（0.2 $\mu\text{m}$ ）可以消除这一现象。被SDS变性的大分子量蛋白（ $>100\text{KD}$ ）由于转移缓冲液中甲醇的存在将会难于被转移。甲醇可以增强SDS蛋白与硝酸纤维素的结合，但同时也会收缩凝胶的孔径。从SDS蛋白转移中去除甲醇会造成结合的明显减少。在转移缓冲液中增加SDS（至0.1%）会使蛋白的转移效率增加，但结合量减少。SDS同样会使缓冲液的电导增强，在转移中产生较多的热。

## PVDF膜

PVDF（聚偏二乙烯二氟）膜是理想的氨基末端测序、氨基酸分析和印迹蛋白免疫测定的支撑。PVDF能在极端条件下，如暴露在酸、碱环境，或在有机溶剂中，保留蛋白质。在测序操作中，强大的保持力以增强的初始结合以及高重复性的收益，提高了得到珍惜的低丰度蛋白信息的可能性。另外，在含有SDS的转移缓冲液中，PVDF膜展现了更佳的结合效率。PVDF膜必须在使用前以100%甲醇浸湿，然后用于不含甲醇的缓冲溶液。

## 5.2 DNA和RNA印记膜

### Zeta-Probe®尼龙膜

由于需要高浓度的盐（ $\geq 10 \times \text{SSC}$ ）作为结合的必要条件，硝酸纤维素膜不适于做核酸电泳转移的介质。即使在高盐条件下，分子量 $\leq 500\text{bp}$ 的核酸也不予结合。当电流通过高盐溶液时引发低电阻，势必造成低电压条件下有潜在破坏性的电流（或电功率）较高。由于每厘米电压降（ $\text{V/cm}$ ）是洗脱力，导致无效转移会存在于所需的结合条件下。Zeta-Probe膜允许所有大小的单链DNA和RNA在现有的低离子强度的缓冲液中进行有效结合。针对硝酸纤维素膜，Zeta-Probe膜是核酸分析理想选择——在转移后的冲洗过程中结合稳定，重现色效率高达10倍。

表5.1 蛋白印迹膜指南

有多种印迹膜可用于免疫印迹，根据实验需求每一种膜都具有特殊优势。当选择合适的转移条件时，膜的物理性质和性能特点须被评估。

Membrane	孔径大小	结合容量 ( $\mu\text{g/cm}^2$ )	备注
硝酸纤维素	0.45 $\mu\text{m}$ 0.2 $\mu\text{m}$	80–100	通用型蛋白印记膜
Supported Nitrocellulose	0.45 $\mu\text{m}$ 0.2 $\mu\text{m}$	80–100	纯硝酸纤维素灌注在惰性的合成支撑物上以增加强度方便操作及重现色
PVDF	0.2 $\mu\text{m}$	170–200	搞机械强度以及化学稳定性，用于蛋白测序和印迹转移。可提高在SDS中的结合率。在缓冲液中平衡前须用甲醇浸湿
尼龙	0.2 $\mu\text{m}$	170	推荐用于核酸

注：核酸不可以用电泳印迹转移到硝酸纤维素膜上，须使用Zeta-Probe膜



## 第六章 故障排除

### 6.1 电泳转移

#### 转移效果差（由凝胶染色检测）--蛋白

1. 转移时间太短
  - 增加转移时间
2. 功率太低
  - 转移开始时一定检测电流。特定的电压设定会使电流过低。如果缓冲液配制不当，电导率会过低，造成没有足够的力提供给电泳槽。
  - 重新配置缓冲液或提高电压。
  - 尝试高强度转移
3. 转移设备装配不正确，蛋白移动向错误方向
  - 凝胶与膜的三明治组合顺序错误，或者三明治夹在缓冲液槽中的插入方向相反。检查与电源连接的极性。
4. 荷-质比不正确
  - 尝试更酸或更碱的转移缓冲液以增加蛋白的迁移率。接近蛋白等电点的缓冲液pH值会使转移失败。一般建议缓冲液的pH值应低于或高于感兴趣蛋白的等电点2个pH来增加转移效率。
5. 蛋白在凝胶中沉淀
  - 尝试在缓冲液中加入SDS。SDS可以使转移效率提高，但同时也会使蛋白的结合率降低，并影响某些蛋白与抗体的反应。
6. 电源电路不起作用，或使用不适当的电源
  - 检查保险丝，确定电源的电压电流输出与所用转移设备相匹配。
7. 缓冲液中的甲醇限制了洗脱
  - 甲醇的减少造成凝胶中的蛋白质的转移效率增加，同时会降低蛋白与硝酸纤维素膜和PVDF膜的结合效率。
8. 凝胶百分比太高
  - 降低%T（总单体）或%C（交联剂）。5%C（Bis作交联剂）会产生最小的凝胶孔径，降低此浓度会增加凝胶孔径，从而增加转移效率。

#### 转移效果差—核酸

1. 凝胶百分比太高
  - 在聚丙烯酰胺凝胶中减少总单体百分比浓度（%T）或交联剂百分比浓度（%C）。在琼脂糖凝胶中减少琼脂糖百分比浓度（%）。
  - 转移电泳之前用0.25M稀盐酸切割DNA或稀NaOH用于RNA。
2. 转移时间太短或功率条件太低
  - 增加转移时间或者尝试使用高强度转移。

3. DNA或RNA不能被电泳转移到硝酸纤维素膜上，因为与该膜结合所需盐浓度太高
  - 使用Zeta-Probe膜替换硝酸纤维素膜

#### 条带扭曲或丢失：扩散转移

1. 膜与凝胶接触不良，在印迹与凝胶之间存在气泡或多余的缓冲液
  - 使用试管或移液管在膜表面向不同方向小心滚动，直至膜与凝胶之间的气泡和多余的缓冲液被完全排出，即做到膜与凝胶的完全接触。
  - 在凝胶/膜的三明治中使用厚一些的滤纸。
  - 更换纤维衬垫。长时间的挤压会使衬垫变薄，不能有效地压紧膜和凝胶。
2. 功率条件太高
  - 转移开始时一定检测电流。特定的电压设定会使电流过高。如果缓冲液配制不当，电导率会过高，造成过多的力提供给电泳槽。
3. 膜没有被完全浸湿或者已经干燥
  - 硝酸纤维素膜上的白色斑点显示蛋白质不能结合的干燥区域。如果将膜沉浸在缓冲液中不能立即浸湿，可以加热蒸馏水至沸点以下，将膜全部浸泡，再以缓冲液平衡至可以使用。
  - 因为PVDF的疏水特性，PVDF膜在以水性转移缓冲液平衡之前必须先用甲醇完全浸湿。请遵循产品指南操作。
4. 凝胶电泳可能存在错误
  - 电泳的不正常可能由于凝胶聚合不好、不合适的电泳条件、被污染的缓冲液、样品过载等因素引起。

#### 凝胶夹图案被转移到印迹膜上

1. 使用了被污染的或者太薄的转移纤维衬垫
  - 更换衬垫或彻底清洗被污染的衬垫。
2. 凝胶上有过多的大量蛋白，或者缓冲液中使用了太多SDS。蛋白质可以穿透印记膜，不与其结合，并且游离在转移电泳槽中。
  - 减少凝胶中的蛋白量，以及缓冲液中的SDS。增加第二张膜与多余的蛋白结合。
3. 转移缓冲液被污染了
  - 重新配置溶液

#### 与膜的结合失败—硝酸纤维素膜

1. 硝酸纤维素膜需要20%的甲醇在缓冲液中来优化与蛋白质的结合
  - 确认缓冲液中含有合适量的甲醇
2. 蛋白质可能透过了硝酸纤维素膜
  - 使用PVDF或尼龙（高结合容量）膜，或者减小硝酸纤维素膜的孔径（0.2 $\mu$ m）。降低电压或者改为标准转移（如果使用了高强度转移）。
3. 混合的酯纤维素与蛋白质结合差
  - 使用纯硝酸纤维素膜

4. <15,000 daltons的蛋白质表现出与0.45 $\mu$ m硝酸纤维素膜的结合力降低，或者在分析过程中被冲洗掉
  - 为增强结合的稳定性，蛋白质可以用戊二醛交联到硝酸纤维素膜上。
  - 使用具有更高结合容量的PVDF或尼龙膜。
  - 在冲洗和抗体孵育步骤中使用Tween-20作去垢剂，减少或去除强清洗条件。
5. 转移缓冲液中的SDS会降低蛋白的结合效率
  - 减少或去除缓冲液中的SDS。
6. 印记膜可能没有被完全浸湿
  - 硝酸纤维素膜上的白色斑点显示蛋白质不能结合的干燥区域。如果将膜沉浸在缓冲液中不能立即浸湿，可以加热蒸馏水至沸点以下，将膜全部浸泡，再以缓冲液平衡至可以使用。

#### 与膜的结合失败—PVDF膜

1. 膜没有被完全浸湿
  - 因为PVDF的疏水特性，PVDF膜在以水性转移缓冲液平衡之前必须先用甲醇完全浸湿。请遵循产品指南操作。
2. 操作过程中膜已经干燥
  - 完全浸湿的膜具有灰色、半透明的外观。当白色斑点形成在膜表面，表示它将会干燥。由于蛋白质不会与干燥的点结合，请重新用甲醇湿润膜，并重新以转移缓冲液平衡。

### 6.2 免疫特征检测

#### 总体背景高

1. 闭锁条件不合适
  - 封闭物必须与膜匹配。例如PVDF和尼龙膜需要更大量的封闭，一般使用脱脂干牛奶。
  - 按需要增加封闭浓度和时间。
  - 封闭物必须为纯的蛋白质。封闭物可能会被能与探针非特异结合的物质污染。
2. 采用了效果不够的冲洗方案
  - 增加冲洗的次数、持续时间或力度。包括在冲洗中渐次使用更强的去垢剂，去垢剂强度：SDS大于NP-40大于Tween-20。
3. 印记膜被留在底物中时间太长
  - 当信噪比达到可接受水平时，将印记膜从底物溶液中取出，不要显像过度，应立即把印记膜浸泡在双蒸水中终止反应。
4. 前一步骤中存在污染，如电泳或转移时
  - 丢弃凝胶和缓冲液。
  - 更换或彻底清洗纤维衬垫。凝胶上有过多的大量蛋白，或者缓冲液中使用了太多SDS。蛋白质可以穿透印记膜，而不与其结合，并且游离在转移电泳槽中。减少凝胶中蛋白的量或缓冲液中SDS含量。增加第二张膜与多余的蛋白结合。

5. 一抗或二抗的浓度太高
  - 增加抗体的稀释度。做斑点-印记试验优化工作浓度。
6. 孵育盘被污染
  - 清洗托盘或使用一次性托盘。

#### 结合蛋白与探针没有特异反应

1. 一抗或二抗被非特异性或交叉反应IgG污染
  - 使用纯化的IgG作一抗和亲和纯化的印记级二抗。
2. 单克隆抗体可能非特异性的与SDS变性蛋白反应
  - 比较其他单克隆抗体或多克隆抗体
  - 用非变性蛋白作印记
3. 由离子组合引起无意义相互作用，例如：抗生素蛋白、糖蛋白等可能会与膜上的较酸性的蛋白结合
  - 增加孵育缓冲液的离子强度。增加冲洗的次数、持续时间和力度。包括在冲洗中渐次使用更强的去垢剂，去垢剂强度：SDS大于NP-40大于Tween-20。在抗体稀释液中包含Tween-20来减少非特异结合。

#### 没反应或信号弱

1. 样品量不够
  - 增加蛋白的上样量。上样之前样品可能需要浓缩。或使用更灵敏的检测方法。
2. 结合到膜上的抗原不够
  - 转移后将凝胶染色或使用预染或万花筒标准品评估转移效率。参见之前的章节改进转移方法。
3. 一抗或二抗失活或者未饱和
  - 试剂储存条件须满足要求。避免反复冻融、细菌污染和热失活。
  - 去垢剂会影响某些抗体活性，除闭锁后的冲洗之外，在体系中去除去垢剂。
  - 如果抗体效价太低，用斑点-印记实验优化其浓度。
  - 增加抗体孵育时间。
4. 酶复合物失活或者未饱和
  - 测定试剂活性（见下面）
  - 试剂储存条件须满足要求。避免反复冻融、细菌污染和热失活。
  - 叠氮化钠是有效的辣根过氧化物酶抑制剂。使用工汞硫代水杨酸钠（Thimerosal）作抑菌剂。
  - 水不纯也可引起酶失活，全部使用蒸馏去离子水。
  - 如果酶复合物浓度太低，使用斑点-印记实验优化其浓度。
5. 显色试剂失活
  - 测试试剂活性（见下面），如果需要，重新配置。

## 测试检测试剂活性

### 1. 显色溶液活性测试

- 混合1.0ml显色溶液和10 $\mu$ l第二抗体复合物，显色反应立刻进行。如果几分钟内颜色没有显现出来，则说明显色试剂失活，需配置新溶液重做显色实验。

### 2. 辅酶溶液活性测试

- 取1.0ml上述测试过的显色溶液，与1.0ml 1:3000稀释的辅酶溶液混合。15分钟内应该有淡蓝色亮光出现。如果25分钟内亮光还没出现，说明辅酶溶液有问题。使用新鲜配置的辅酶溶液重复实验步骤。

### 3. 一抗溶液活性测试

- 使用ELISA、放射免疫检测、双向免疫扩散或沉淀法测定抗原抗体反应。如果可能，可使用几种不同稀释度的一抗溶液重复实验步骤。

## 6.3 总蛋白检测

### 胶体金总蛋白染色—高背景

#### 1. 闭锁不足或遗漏闭锁步骤

- 使用含0.3%Tween-20的TBS做封闭，使用三次每次20分钟的冲洗。

#### 2. 所用的膜不适于此种染色

- 带正电的尼龙膜不能被用于胶体金染色，代之以生物素-印记总蛋白检测。

#### 3. 在上一步骤中膜被污染，例如：电泳或转移时

- 丢弃凝胶和缓冲液。
- 更换或彻底清洗纤维衬垫。

#### 4. 凝胶上有过量的蛋白，或者缓冲液中使用了太多的SDS。蛋白质可以穿透印记膜，不与其结合，并且游离在转移电泳槽中。

- 减少凝胶中的蛋白量，以及缓冲液中的SDS。增加第二张膜与多余的蛋白结合。

#### 5. 胶体金染色溶液被污染

- 染色试剂可以重复使用。确认使用独立的、干净的塑料容器将使用过的试剂储存在冰箱里。丢弃任何瓶底部有粘稠物的试剂。如果溶液不具有深酒红色而是亮蓝色，说明溶液已经被缓冲液中的盐污染。缓冲盐会与金色溶胶反应，引起膜上试剂的非特性沉淀。丢弃这些试剂。

### 胶体金总蛋白染色—低灵敏度

#### 1. 增加低检测信号的孵育时间

- 可进行过夜孵育，背景信号同时也会增强。

#### 2. 转移没有完成

- 参见转移失败一章看如何提高转移效率。

#### 3. 由染色时间过长和丢失深酒红色证实染色实效

- 丢弃试剂

4. 存在缓冲盐污染，溶液浅蓝色代替深酒红色

- 丢弃试剂

5. 样品的量太低（相对检测试剂）

- 使用金增强试剂盒来检测每条带10pg的蛋白质

### 生物素-印记总蛋白检测—高背景

1. 闭锁条件不足

- 将封闭物与膜进行匹配。尼龙膜需要增加MPO在几种溶液中。参考生物素-印记手册中的特殊细节。

2. 膜被留在显色试剂中时间太长

- 当信号出现背景还未出现时，从显色溶液中取出膜，立即转移到蒸馏水中终止显色反应。

3. 凝胶上有过量的蛋白，或者缓冲液中使用了太多的SDS。蛋白质可以穿透印记膜，不与其结合，并且游离在转移电泳槽中。

- 减少凝胶中的蛋白量，以及缓冲液中的SDS。增加第二张膜与多余的蛋白结合。

### 生物素-印记总蛋白检测—无反应或弱显色

1. 转移不完全

- 参见转移失败一章看如何提高转移效率。

2. 相对检测试剂来说凝胶中的样品量太低

- 增加凝胶中的蛋白样品量

3. NHS-生物素溶液失活

- NHS-生物素在水溶液中水解。在打开之前试剂瓶一定平衡至室温，以防止水蒸气在瓶中凝结；使用消毒注射器防止污染。

- 使用前将NHS-生物素试剂加入硼酸-Tween溶液中。

4. 缓冲盐中的胺与生物素试剂竞争

- 在硼酸-Tween溶液中彻底冲洗膜，去除电泳和转移的残留缓冲盐。

5. Avidin-HRP复合物失活

- 遵循活性检测程序测定试剂是否失活。

6. 显色溶液失活

- 遵循活性检测程序测定试剂是否失活。

### 阴离子染色—高背景

1. 脱色不足

- 增加脱色溶液冲洗的次数和持续时间

2. 染色溶液浓度太高

- 重新配置缓冲液

3. 尼龙膜不兼容阴离子染色
  - 使用生物素-印记蛋白检测试剂盒

#### 阴离子染色—低灵敏度

1. 阴离子染料染色不能检测低于每条带100ng的蛋白质
  - 使用更灵敏的染色，例如：胶体金总蛋白检测或生物素-印记检测试剂盒
  - 增加样品量，达到阴离子染料染色的水平。

## 第七章 产品信息与配件

货号	产品描述
MP-3030	Mini-TBC 小型转移电泳槽，包括： Mini P-4 小型电泳槽上盖和下槽，Mini-TBC 小型转移电泳芯，三明治夹 x2，冰盒，使用手册
MP-3035	Mini-TBC 小型转移芯，包括： Mini-TBC 小型转移电泳芯，三明治夹 x2，冰盒，使用手册
	配件：
MP-3110	小型转移衬垫，4 片/包
MP-3120	小型转移三明治夹
MP-3130	冰盒，2 个/包
	推荐电源：
PP-1150	Power B 基础型电泳电源，300V / 400mA / 75W

## 第八章 参考书目

1. Southern, E. M., *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975).
2. Alwine, J. C., Kemp, D. J., Parker, B. A., Reiser, J., Renart J., Stark, G. R. and Wahl, G. W., *Methods Enzymol.*, **68**, 220 (1979).
3. Thomas, P. S., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 5201 (1980).
4. Seed, B., *Nuc. Acids Res.*, **10**, 1799 (1982).
5. Renart, J., Reiser, J. and Stark, G. R., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **76**, 3116 (1979).
6. Bowen, P., Steinberg, J., Laemmli, U. K. and Weintraub, H., *Nuc. Acids Res.*, **8**, 1 (1980).
7. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **76**, 4350 (1970).
8. Bittner, M., Kupferer, P. and Morris, C. R., *Anal. Biochem.*, **102**, 459 (1980).
9. Stellwag, E. J. and Dahlberg, A. E., *Nuc. Acids Res.*, **8**, 299 (1980).
10. Kutateladze, T. V., Axelrod, B. D., Gorbulev, V. G., Belzhelarshaya, S. N. and Vartikyan, R. M., *Anal. Biochem.*, **100**, 129 (1979).
11. Peudelhuber, T. L., Ball, D. J., Davis, A. H. and Garrard, W. J., *Nuc. Acids Res.*, **10**, 1311 (1982).
12. Danner, D. B., *Anal. Biochem.*, **125**, 139 (1982).
13. Bio-Rad Technical Bulletin 1110 "Zeta-Probe Blotting Membranes" (1982).
14. Holland, L. J. and Wangh, L. H., *Nuc. Acids Res.*, **10**, 3283 (1983).
15. Syminton, J., Green, M. and Brackmann, K., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**, 177 (1981).
16. Reiser, J. and Wardale, J., *Eur. J. Biochem.*, **114**, 569 (1981).
17. Burnette, W. N., *Anal. Biochem.*, **112**, 195 (1981).
18. Legocki, R. P. and Verma, D. P. S., *Anal. Biochem.*, **111**, 385 (1981).
19. Lin, W. and Kasamatsu, H., *Anal. Biochem.*, **128**, 302 (1983).
20. Anderson, N. L., Nance, S. L., Pearson, T. W. and Anderson, N. G., *Electrophoresis*, **3**, 135 (1982).
21. McLellan, T. and Pamshaw, J. A. M., *Biochem. Genetics*, **19**, 647 (1981).
22. Gibson, W., *Anal. Biochem.*, **118**, 1 (1981).
23. 《分子克隆实验指南》（第三版）Joseph Sambrook, David W. Russell著, 黄培堂等译
24. 《精编分子生物学实验指南》（第四版）（美）Ausubel, F. M.等主编, 马学军等校译







**北京凯元信瑞仪器有限公司**

地址：北京市宣武区宣武门外大街 28 号富卓大厦 B 座 605  
电话：010-63015080 或 63019969 传真：010-63015596

邮政编码：100052  
网址：<http://www.kysino.cn>