セミドライブロッティング用

タンパク質転写キット
使用説明書

〔はじめに〕

電気泳動後のポリアクリルアミドゲルから、タンパク質をエレクトロトランスファーにより、PVDF膜やニトロセルロース膜等に転写する方法は生物学的同定・分析法として汎用されています。

セミドライブロッティング用タンパク質転写キットは、弊社マルチゲル®IIミニとの組み合わせにより、試薬の調製、操作が簡単で、短時間で最適な転写像が得られるように開発されたタンパク質転写用試薬、転写膜及びろ紙を含むキットです。

〔特　　徴〕

1）短時間で効率のよいタンパク質の転写ができます。
2）低いバックグランドで高感度の検出が可能です。
3）転写に必要なすべての試薬及び転写膜等がキット内に含まれています。
4）室温で安定に保存できます。

〔適　　応〕

スラブ型ポリアクリルアミドゲル電気泳動後（マルチゲル®IIミニ）のタンパク質のエレクトロブロッティング（セミドライ）に用います。

〔内　　容〕

25回用

構成品名	主成分	容量
陽極液	トリス	500mL
陰極液	トリス	1000mL
転写膜	PVDF膜	25枚
濾紙	定性用	100枚

〔使用方法〕

操作はすべて室温で行います。
陽極液：原液のまま使用します。
陰極液：原液のまま使用します。
転写膜：ポリアクリルアミドゲル1枚あたり1枚使用します。
ろ　紙：ポリアクリルアミドゲル1枚あたり4枚使用します。

〔転写操作方法〕

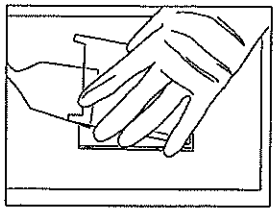
各操作はポリアクリルアミドミニゲル(ゲルサイズ90mm×90mm×約1.0mm厚)を基準としています。
セミドライエレクトロブロッターは、付属の取扱説明書に従って操作を行ってください。
操作は素手で行わず、必ず手袋を着用してください。

1．電気泳動
分析したいタンパク質を通常のサンプル処理後、マルチゲル®IIミニの操作方法に従い、SDS−PAGE電気泳動を行います。

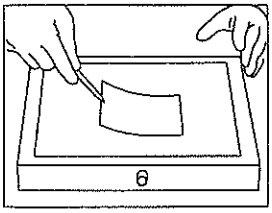
2．転写膜準備
転写膜をメタノールに浮かべ、3～5秒後に全体を浸漬(水没)させます。その後、転写膜をメタノールから取出し、直ちに精製水中に浸漬（水没）させ、5～15分間振とうしながら平衡化します(ウェッティング処理といいます)。この時、転写膜が完全に水没するようにしてください。転写膜が水面に浮き上がっていると、部分的に乾燥し転写ムラの原因となることがあります。

3．陽極側及び陰極側ろ紙の準備
ろ紙2枚を重ねて陽極液20mLに浸します。同様にろ紙2枚を重ねて陰極液20mLに浸します。

4．電気泳動後のゲルの陰極液での平衡化
電気泳動終了後、ガラスカセットからゲルを取出し、陰極液20mLを入れた容器中で10分間振とうしながら、ゲルを平衡化します。

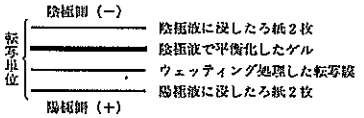


5．セミドライエレクトロブロッターへの陽極側ろ紙のセット
セミドライエレクトロブロッターの蓋（陰極側）を取り、陽極側カーボン電極上に、陽極液に浸したろ紙2枚を空気が入らないように乗せます。



6．転写膜及び平衡化後のゲルのセット
陽極液に浸したろ紙2枚の上に、ウェッティング処理した転写膜を空気が入らないように乗せます。
その上に、陰極液で平衡化したポリアクリルアミドゲルを転写膜上に空気が入らないように乗せます。

7．陰極側ろ紙のセット
重ね合わせたポリアクリルアミドゲルの上に陰極液で浸したろ紙2枚を空気が入らないように乗せます。これで転写単位*が完成しました。
＊転写単位：陽極側ろ紙2枚・転写膜1枚・ポリアクリルアミドゲル1枚・陰極側ろ紙2枚を重ね合わせたもの（下図）。



8．セミドライエレクトロブロッターのセット
セミドライエレクトロブロッターの陰極側カーボン電極を転写単位がずれないように、静かにかぶせます。次に、セミドライエレクトロブロッター付属の接続ケーブルの陽極側を安定電源の陽極ターミナルに、陰極側を陰極ターミナルに接続します。

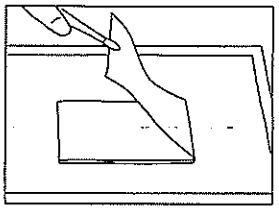
9．通電
セミドライエレクトロブロッターと安定電源が正しく接続されたことを確認し、安定電源の電源スイッチをONにします。
15V定電圧で30分間または100mA定電流で45分間通電します。
なお、15V定電圧の場合、初期電流値は150mA以上となります。ご使用になる安定電源の出力性能を予めご確認ください。
1台のセミドライエレクトロブロッターで転写する転写単位がセミドライエレクトロブロッター上で並列に複数単位となる場合は下表を参考に安定電源をお選びください。

転写単位数(組)	1	2	3	4
設定電圧値(V)	15			
初期電流値(mA)	～150	～300	～450	～600

同様に100mA定電流の場合は以下の通りです。

転写単位数(組)	1	2	3	4
設定電流値(mA)	100	200	300	400
初期電圧値(V)	～10			

10．転写膜の取出し
通電終了後、安定電源の電源スイッチをOFFにし、接続ケーブルを安定電源及びセミドライエレクトロブロッターから外します。次に、セミドライエレクトロブロッターの陰極側カーボン電極を取外します。この際転写単位の一部または全部が陰極側カーボン電極に付着することもありますのでご注意ください。
ピンセット等で、ろ紙を剥がし、転写膜を取出します。
注）非特異的反応を防ぐため、転写膜は素手で触らないようにします。



11．染色
転写済の膜は、色素染色、抗体染色（化学発光を含む）等目的に応じて、それぞれの操作マニュアルに従い染色操作を行います。

〔使用上の注意〕

1）操作は素手で行わず、必ず手袋を着用してください。特に転写膜はタンパク質等を吸着しますので、非特異的反応を防ぐために、取扱い時は手袋やマスクを装着してください。
2）本品中に含まれる薬品により粘膜、皮膚等が刺激されることがあります。もし、目、皮膚や衣服についたときは速やかに洗い流してください。また、異症を起こした場合は医師の手当てを受けてください。
3）通電中は感電の恐れがありますので、接続ケーブルやセミドライエレクトロブロッターには触れないようしてください。
4）試薬は室温保存となっていますが、35℃以上の高温となる場所、直射日光の当る場所での保存は避けてください。また、開封使用後は必ず密栓してください。

〔包　　装〕

スラブ型ポリアクリルアミドミニゲル（ゲルサイズ90mm×90mm×約1.0mm厚）25枚用

〔貯　　法〕

室温

〔有効期間〕

製造後2年間

コスモ・バイオ株式会社
〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル

For research use only

For Semidry Electroblotter
Protein Transfer Kit

[Cautions]

1) No operations are performed with bare hands. Wear gloves and a mask when handling to avoid contamination. Transfer membranes easily trap proteins.
2) The reagents included may damage your mucosa or skin. If any contact happens immediately wash your eyes, skin or clothing. Also seek for a medical advice when inflamed.
3) While running, do not touch the connecting cables or semidry electroblotter for you might get an electric shock.
4) The reagents should be stored at room temperature. Do not store at any place above 35 °C. Store in dark. Also be sure to cap after opening.

Introduction

Protein electrotransferring from PAG or SDS-PAG to PVDF membrane or nitrocellulose membrane is a widely used method for biological identification and analysis.

The Protein Transfer Kit "Daiichi" includes protein transfer reagents (developed to provide you with the easy preparation of reagents/operations and the best transfer image in a short period of time in combination with our Multigel® II mini), transfer membranes, and filter papers.

Features

1) Quick and High efficiency
2) High Sensitivity and low background
3) All necessary reagents and transfer membranes are included
4) Stored stably at room temperature

Application

The Protein Transfer Kit is designed for protein electroblotting (semidry) used for slab polyacrylamide gel electrophoresis (Multigel® II mini)

Contents 25 tests per kit

Component	Description	Quantity
Anode Buffer	Tris	500 mL
Cathode Buffer	Tris	1000 mL
Transfer Membrane	PVDF membrane	25 sheets
Filter Paper	For qualitative use	100 sheets

Before Using

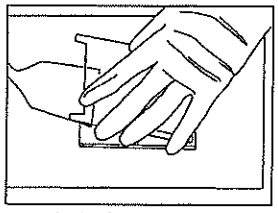
NOTE: Wear gloves before use.
NOTE: All the operations are carried out at room temperature.

anode buffer: use as supplied
cathode buffer: use as supplied
transfer membrane: use one per polyacrylamide gel
filter paper: use two for anode and two for cathode per polyacrylamide gel

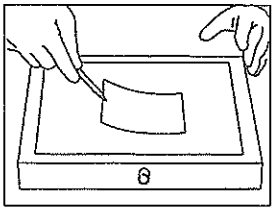
Set UP and Operation

This instruction is designed for polyacrylamide gels (the gel size is 90×90×1.0 mm) used with Semidry Electroblotter.
When using semidry electroblotters, follow the provided instructions.

1. **Electrophoresis**
   Run electrophoresis following the Multigel® II mini instruction.
2. **Pre-treatment of Transfer Membrane**
   Place the transfer membrane in methanol for 3-5 seconds and submerge it. Then take the transfer membrane out, soak in deionized water immediately, and shake for 5-15 minutes to equilibrate (so called "Wetting").
   NOTE: The transfer membrane must be submerged completely. If the transfer membrane floats in water, this will cause partial drying and spotty transferring.
3. **Pre-Treatment of Filter Papers**
   Pile two filter papers and submerge them in 20 mL anode buffer. Also submerge two filter papers in 20 mL cathode buffer in the same manner.
4. **Equilibration of Gel in Cathode Buffer after Electrophoresis**
   After electrophoresis, take the gel out of the glass cassette and shake it for 10 minutes in 20 mL cathode buffer to equilibrate.



5. **Placing Filter Papers on the Anode**
   Remove the semidry electroblotter cover (cathode) and place two filter papers submerged in anode buffer on top of the carbon electrode (anode) taking care not to trap any bubbles.



6. **Placing the Transfer Membrane and the Equilibrated Gel**
   Place the "Wetting" treated transfer membrane on top of the two filter papers avoiding bubbles. The polyacrylamide gel equilibrated in cathode buffer is placed on top of transfer membrane taking care not to trap any bubbles.
7. **Placing the Filter Paper**
   Place the two filter papers submerged in cathode buffer on top of the polyacrylamide gel without trapping any air bubbles. Now the transfer layers* are completed.
   * transfer layers: the layers of two filter papers, one transfer membrane, one polyacrylamide gel and two filter papers from the bottom (see figure below)

Transfer layers

Cathode (−)
- Two filter papers submerged in cathode buffer
- Gel equilibrated in cathode buffer
- "Wetting" treated transfer membrane
- Two filter papers submerged in anode buffer

Anode (+)

8. **Placing the Semidry Electroblotter**
   Gently place the semidry electroblotter cathode without disturbing the transfer layers. Then plug the connecting cables of the semidry electroblotter anode into the anode terminal of the power supply and cathode cables into cathode terminal.
9. **Running**
   Ensure the semidry electroblotter and the power supply are properly connected and turn on the power supply. Run at 15 V constant for 30 min or 100 mA for 45 min.
   NOTE: When electroblotting is run at 15 V constant, initial current will be around 150 mA. Check the output capacity of the power supply before use.
   NOTE: Refer to the table below to choose suitable current for multiple sets of transfer layers at one semidry electroblotter.

15 V constant voltage, refer to the table below

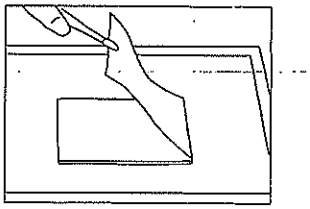
Transfer Layers (set)	1	2	3	4
Set-Up Voltage (V)	15			
Initial Current (mA)	around 150	around 300	around 450	around 600

100 mA constant current, refer to the table below

Transfer Layers (set)	1	2	3	4
Set-Up Current (mA)	100	200	300	400
Initial Voltage (V)	around 10			

NOTE: Each set of transfer layers must be placed on the cathode side by side.

10. **Taking out the Transfer Membrane**
    After running the semidry electroblotter, turn off the power and disconnect the connecting cables from the power supply and the semidry electroblotter. Carefully remove the semidry electroblotter cathode. Remove filter papers with a pair of tweezers and take out the transfer membrane.
    NOTE: Part or all of the transfer layers may be sometimes being attached to the cathode side when electroblotter opened.
    CAUTION: Do not touch the transfer membrane with bare hands to avoid contamination.



11. **Staining**
    Stain the transfer membrane following the instruction manuals according to your purposes (dye staining, antibody staining including chemiluminescence).

Package

25 sheets transfer membrane designed for slab polyacrylamide gel (gel size 90×90×1.0 mm)

Storage

Store at room temperature.

Shelf Life

Valid for two years after manufacturing.

COSMO BIO CO., LTD.
URL : http://www.cosmobio.co.jp/