

快速转膜仪 SOP

1. 上电检查

- 仪器上电后，软件能够正常启动，进入到快速转膜仪软件登录页面，且页面不报故障，状态指示灯绿灯常亮。
- 使用 public 用户登录后，实验程序页面有三条预置程序，分别为：**延长、标准、快速**。

2. 管路接入检查

- 分别将转膜液、清洗液、废液管路插入对应的液路接口，**确保听到响声**，然后将三个管路分别插入对应的试剂桶中。
- 附带 3 个试剂桶，分别用于盛放 1X 转膜液、清洗液（纯水）、废液。

3. 试剂配制

- 将中科通仪 5X 浓缩转膜液稀释为 1X 后使用，具体稀释方法如下：**取 1L 浓缩液，加入 750mL 无水乙醇，再用纯水定容至 5L（15%醇含量）。**
- 每次实验结束会自动进行冷却，消耗清洗液（纯水）约 200mL/通道，清洗液试剂瓶中需提前备好足量纯水。
- 实验室自配 1X 转膜液方法：**25mM Tris, 192mM 甘氨酸, 15%醇**, 对应 3.03g/L Tris, 14.40g/L 甘氨酸, 150mL/L 无水乙醇。

注意：

- 1) 延长程序消耗液量约 650mL，标准程序和快速程序消耗液量约 400mL。
- 2) 如果凝胶电泳体系是 **MOPS 或 MES**，建议将转膜液试剂醇含量提高至 20%。
- 3) 试剂配制无需调节 pH 值。
- 4) 使用分析纯的无水乙醇。

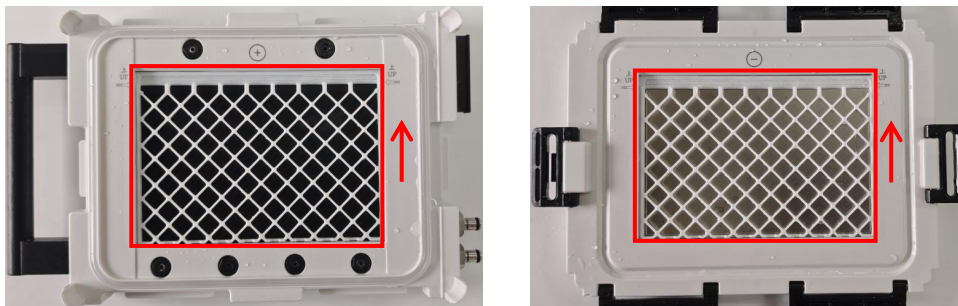
4. 胶、膜平衡

- Tris-Glycine 体系胶不需要平衡，放入 1X 转膜缓冲液中润湿即可取出放入三明治中。
- PVDF 膜需要先用醇激活至透明状，再放入 1X 转膜缓冲液中平衡 2min。
- NC 膜久置会干燥，需要在转膜缓冲液中浸泡到膜不泛白，不然会在转膜过程中产生气泡。

注意：如果凝胶电泳体系是 **MOPS 或 MES**，需要将胶（拆除胶板）放置在 1X 转膜缓冲液中平衡 2-3min（不要超过 3min），再放入三明治中。

5. 转膜盒检查

- 转膜盒开盖后，内部无异物，可用纯水将正负极冲洗一遍。
- 网格板如图，需将网格下凹位置靠近正/负极图标。



6. 转膜三明治

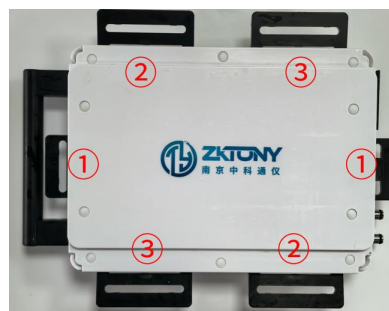
- 海绵放置时将海绵贴着网格板下凹边缘放置，左右不要贴边，居中放置，如图：



- 顺序：正极-海绵-膜-胶-海绵-负极。
- 制作三明治前，需将两片海绵放入海绵浸润盒充分浸润。
- 两块胶放置时，需要把胶顺时针旋转 90°，或逆时针旋转 90°，大分子不用对着放，可以顺着同一个方向或相反放都可以；单块胶放置时，大分子朝上朝下都可以，胶放置如图：



- 确保胶和膜之间没有细小残胶或者膜的碎屑，建议用少量新鲜干净的转膜缓冲液冲洗一下膜再将胶盖上。
- 确保胶和膜之间没有气泡，可用滚轮或刮板将气泡排出，或用少量转膜液将气泡冲走。



- 取一张充分浸透的专用海绵，与底部海绵对齐覆盖在胶上。
- 将负极模块 6 个卡扣全部打开，与正极模块保持平行，对齐正极模块的四角限位，轻轻放置于正极模块上。
- 双手拇指同时放置在“①”，其余手指紧贴下方卡扣，**两只手臂同时**发力按压“①”，其余手指顺势将卡扣扣紧，随后将“②”“③”扣紧，即完成转膜盒的锁定。

注意：

- 1) 用水冲洗电泳后的凝胶胶板，去除残留的电泳缓冲液。
- 2) 膜要大于胶，胶尽量放到膜的中间位置，胶的边缘距膜的边缘空出 2mm 左右空隙。
- 3) 海绵不建议重复使用，重复使用会影响重复性和稳定性。

7. 不同条件推荐转膜程序

转膜程序推荐								
1.0mm胶								
目的蛋白	6%	7.5%/8%	10%	12%/12.5%	15%	梯度4-12%	梯度8-15%	梯度4-20%
< 20kDa	-	-	快速	标准	标准	延长	延长	延长
20-70kDa	-	标准	标准	标准	延长			
70-250kDa	延长	延长	延长	延长	-			
1.5mm胶								
目的蛋白	6%	7.5%/8%	10%	12%/12.5%	15%	梯度4-12%	梯度8-15%	梯度4-20%
< 20kDa	-	-	标准	标准	延长	延长	延长	延长
20-70kDa	-	标准	延长	延长	延长			
70-250kDa	延长	延长	延长	延长	-			
1. 若同一张膜上需同时转印分子量差异较大的蛋白，优先采用针对大分子蛋白的推荐条件，以确保其转印效率，小分子蛋白通常在此条件下亦可有效转印；								
2. 表中“-”表示不推荐在该浓度转印相应大小的蛋白；								
3. 对于超大分子量蛋白（≥ 250 kDa），视情况需要针对性地优化转膜条件，涉及调整转膜时间、电压以及凝胶浓度、厚度等参数，具体请与技术支持沟通。								

8. 开始实验

- 将转膜盒插入对应通道，选择预置程序，对应通道状态显示“已就绪”，点击“开始”。
- 提醒用户准备好封闭液，待实验结束后快速取膜放入封闭液中。

9. 转膜结束后操作

- 打开转膜盒，将“三明治”整体移入纯水或缓冲液中浸透，揭开上层海绵，取出胶和膜，并将膜立即放入封闭液或洗膜液中浸润，防止干膜。
- PVDF 膜干膜后需先用醇激活至透明状，之后用 TBST 清洗 2-3min，再进行封闭。

注意：海绵不建议重复使用，重复使用会影响重复性和稳定性。

10. 仪器清洁

- **清洗：**清洗液桶中准备足量纯水（350mL/通道），将转膜液管路和清洗液管路均放入清洗液桶中，将空转膜盒插入运行过实验的通道，进入实验操作页面，点击对应通道的清洗按钮，点击开始，开始后等待清洗自动结束。
- **排空：**清洗结束后，请勿将转膜盒拔出，将转膜液管路及清洗液管路从清洗液中取出置于悬空状态，点击对应通道的清洗按钮，点击开始，开始后等待清洗自动结束。
- 取出转膜盒，开盖晾干，关闭仪器电源。

注意：应时刻保持转膜盒洁净，若有碎胶、试剂残留在电极板表面或转膜盒密封圈内部区域，请及时用纯水冲洗干净。