

SDS-PAGE 过程

1 试剂和耗材

Protein Marker (购自 Thermo 公司)

IPTG、Acr、Bis、Tris (购自 Sigma 公司)

SDS (购自 Amresco 公司)

TEMED (购自 BIO-RAD 公司)

0.22 μm 无菌滤器和透析袋 (购自 Millipore 公司)

其它试剂均为国产分析纯

2 主要实验仪器

Allegra 21R 台式高速冷冻离心机 (美国 BECKMAN 公司)

台式高速离心机 (德国 SORVAL 公司)

Mini Protean II 垂直平板电泳系统 (美国 BIO-RAD 公司)

320-S pH 计 (美国 MettLer ToLedo 公司)

雪花状制冰机 (日本 SANYO 公司)

3. 试剂配制

30%丙烯酰胺(29:1): 称取 Acrylamide 29 g、Bisacrylamide 1 g, 加入约 60 ml 的去离子水, 充分搅拌溶解。加去离子水将溶液定容至 100 mL, 用 0.45 μm 滤膜滤杂质, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.5mol/L Tris-HCl(pH8.8) : 称取 Tris-base 45.43 g, 加入约 200 mL 去离子水, 搅拌溶解; 用浓盐酸调 pH 至 8.8, 最后用去离子水定容至 250 mL, 室温下保存。

0.5mol/L Tris-HCl(pH6.8) : 称取 Tris-base 15.14 g, 加入约 200 mL 去离子水, 搅拌溶解; 用浓盐酸调 pH 至 6.8, 最后用去离子水定容至 250 mL, 室温下保存。

10 %过硫酸胺(AP) : 称取过硫酸胺 0.1 g 溶于 1.0 mL 灭菌的去离子水中, 充分混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 保存时间不能超过 1 周

5×Tris-Glycine 电泳缓冲液：称取 Tris-base 15.1 g、Glycine 94 g、SDS 5 g 置于 1 L 烧杯中，加入约 800 mL 的去离子水，搅拌溶解；加去离子水将溶液定容至 1 L 后，室温保存。

考马斯亮蓝染色液：称取 1 g 考马斯亮蓝 R-250，置于 1 L 烧杯中；量取 250 mL 异丙醇加入上述烧杯中，搅拌溶解；加入 100 mL 的冰醋酸，搅拌均匀；加入 650 mL 去离子水，搅拌均匀；用滤纸除去颗粒物质后，室温保存备用。

脱色液：取冰醋酸 100 mL、乙醇 50 mL，加去离子水定溶至 1L，搅拌均匀，室温保存备用。

4 实验过程

4.1 根据目的蛋白的大小，选择合适的分离胶

SDS-PAGE 分离胶浓度	最佳分离范围
6%胶	50–150kD
8%胶	30–90kD
10%胶	20–80kD
12%胶	12–60kD
15%胶	10–40kD

4.2 凝胶配制

4.2.1 组装胶架

将洁净、无水的玻片对齐，形成空腔，插入塑料框的凹槽中，注意箭头向上，并确保下端平齐。放于制胶架上夹紧，下端紧贴密封条。

4.2.2 分离胶的配置

12%分离胶配方如下表：

成分	配制不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分的体积（毫升）				
12%胶体积	5	10	15	20	30
蒸馏水	1.0	2.0	3.0	4.0	6.0
30%Acr-Bis (29:1)	2.0	4.0	6.0	8.0	12.0
1.5M Tris, pH8.8	1.9	3.8	5.7	7.6	11.4
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.012

4.2.3 灌胶

混匀后用移液枪将凝胶溶液沿玻棒小心注入到长、短玻璃板间的狭缝内(胶高度距样品模板梳齿下缘约 1cm)。

4.2.4 液封

在凝胶表面沿短玻板边缘轻轻加一层无水乙醇以隔绝空气，使胶面平整。静置约 30min 观察胶面变化，当看到水与凝固的胶面有折射率不同的界限时，表明胶已完全凝固，倒掉上层水，并用滤纸吸干残留的水液。

关键点：无水乙醇封胶之后，将无水乙醇掉到后液面必须水平平整。

4.2.5 浓缩胶的配制

浓缩胶的配方如下

成分	配制不同体积 SDS-PAGE 浓缩胶所需各成分的体积（毫升）					
5%胶体积	2	3	4	6	8	10
蒸馏水	1.4	2.1	2.7	4.1	5.5	6.8
30%Acr-Bis (29:1)	0.33	0.5	0.67	1.0	1.3	1.7
1M Tris, pH6.8	0.25	0.38	0.5	0.75	1.0	1.25
10%SDS	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
10%过硫酸铵	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.002	0.003	0.004	0.006	0.008	0.01

关键点：浓缩胶在配置过程中夏天温度较高，TEMED 的要减少三分之一的量。

4.2.6 插入制胶梳

混匀后用移液枪将凝胶溶液注入到长、短玻璃板间的狭缝内(分离胶上方)，轻轻加入样品模板梳，小心避免气泡的出现。约 30 分钟，聚合完全。

5 电泳

5.1 安装电泳槽

将制备好的凝胶板取下，小心拔下梳子。两块 12%的凝胶板分别插到 U 形橡胶框的两边凹形槽中，可往上提起使凝胶板紧贴橡胶。将装好玻璃板的胶模框平放在仰放的贮槽框上，其下缘与贮槽框下缘对齐，放入电泳槽内。倒入 1X Tris-Gly 电泳缓冲液。

关键点：短玻璃板放置内侧。

5.2 样品处理

样品直接取 80μl 的样品，依次加上 20μl 5x buffer (加了 B-巯基乙醇)，混匀。煮沸 10 分钟。12000rpm 离心 10min，备用。

5.3 加样

用移液枪取处理过的样品溶液 $5\ \mu\text{l}$ ，小心地依次加入到各凝胶凹形样品槽内，marker 加入到其中一个槽内，为区别两块板，marker 可加在不同的孔槽中。

关键点：鉴定图片样品点样时一定要去上清，样品粘稠不能进行上样，否则图片会模糊条带不清晰。

5.4 电泳

将电泳槽放置电泳仪上，接通电源，正负极对好（以盖子盖严为准，盖子有两个小洞，这与电泳槽是对应的）。电压调至约 80v 保持恒压。待溴酚蓝在浓缩胶和分离胶界面压成一条直线后，调整电压至 120v，溴酚蓝标记移动到凝胶底部时，关电源，把电泳缓冲液倒回瓶中。

5.5 剥离胶

把电泳槽取出，两块板拿下来，用刮片从长短玻片中间翘起，轻轻取下凝胶，放置于含有 20ml 染色液的器皿中。

5.6 染色

将器皿至于微波炉中，中火加热 10min，取出置于摇床上，轻摇约 0.5 小时，完成后染液回收并用水洗掉染液。

5.7 脱色

取出染色过的胶放于加有脱色液的染缸里，脱色液漫过胶即可将器皿至于微波炉中，中火加热 10min，置于摇床上，轻摇过夜，次日将胶放置于清水中，直至背景清楚为止

关键点：脱色过程中不能将蛋白条带脱太淡。

5.8 拍照

将脱色后的胶置于透明文件夹中，把胶上面的气泡赶出（用前也可用酒精棉球擦干净文件夹），放到扫描仪上，拍照。