

# 超低分子量蛋白电泳方法

## 一. 制胶:

### I 配制分离胶

1. 按照表一将不同体积的双蒸水、40%PAA (19:1)、凝胶缓冲液和乙二醇加入到小烧杯中混合。
2. 加入 10%APS 和 TEMED, 立即混匀 5-10 秒, 以使溶液充分混匀。
3. 在凝胶模具中迅速灌入适量分离胶溶液, 然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1-3 cm 的水层, 使凝胶表面保持平整。
4. 静置 5-10 分钟, 待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面表示凝胶已聚合。

表一 (一块 0.75mm mini 胶用量)

	分离胶	浓缩胶
	18%T, 5%C /6.0 ml	5%T, 3.3%C/2 ml
40% PAA (19:1)	2.7 ml	/
40% PAA (29:1)	/	0.25 ml
4×多肽电泳凝胶缓冲液	1.5 ml	0.5 ml
乙二醇 (电泳级)	1.8 ml	/
ddH <sub>2</sub> O	/	1.25 ml
10%APS	50-65 μl	20 μl
TEMED	6 μl	2 μl

注: 如非必要, 不要使用 1.0mm 和 1.5mm 的凝胶, 尽量使用厚度 0.75mm 的凝胶, 这样会减少电泳后染色和脱色的时间。

### II 配制浓缩胶

去除覆盖在分离胶上的水层, 用滤纸将残留的水吸去。

1. 按照表一将不同体积的双蒸水、40%PAA (29:1) 和凝胶缓冲液加入到小烧杯中混合。
2. 加入 10%过硫酸铵和 TEMED, 立即混匀 5-10 秒, 以使溶液充分混匀。
3. 将梳子插入凝胶内, 避免产生气泡。
4. 静置 20-30 分钟装待凝胶聚合

## 二. 电泳:

1. 取一管分装好的 Marker 样品, 彻底融化, **95°C加热处理 5 分钟**, 充分混匀后备用。
2. 电泳前, 将 10×阳极缓冲液和10×阴极缓冲液用蒸馏水稀释成 1×缓冲液备用。外槽加入阳极缓冲溶液, 内槽加入阴极缓冲溶液, 轻柔拔出梳子, 将 Marker 或蛋白样品 (样品已经过 2×Tricine 上样缓冲液 加入点样孔, 根据表二条件进行电泳, 至蓝色指示前沿至分离胶 3/4 位置时即可停止电泳。整个电泳过程大约需要 2-3 个小时。**注: 如果电泳时间过短, 染色时, 指示前沿容易遮挡小于 5kd 的小肽。**

表二 多肽电泳条件

恒电压	150 V
起始电流	45-55 mA
结束电流	10-15 mA
电泳时间	2-3 小时

### 三. 染色

根据常规实验步骤，用配方 5 和 6（表三）进行染色和观察。

表三 小分子蛋白质 SDS-PAGE 电泳试剂配制

<p><b>1. 40%PAA (29:1) (配制浓缩胶)</b> 丙稀酰胺 38.67g 甲叉双丙稀酰胺 1.33g 用 ddH<sub>2</sub>O 溶解后定容至 100 ml, 过滤后使用。 贮存: 4°C避光保存</p>	<p><b>2. 40% PAA (19:1) (配制分离胶)</b> 丙稀酰胺 38 g 甲叉双丙稀酰胺 2 g 用 ddH<sub>2</sub>O 溶解后定容至 100 ml, 过滤后使用。 贮存: 4°C避光保存</p>	<p><b>3. 4×多肽电泳凝胶缓冲液 (配制凝胶用)</b> [3MTris; 0.3% SDS; pH8.45] Tris 碱 182g ddH<sub>2</sub>O 300ml 1.5 g SDS 或 15ml 10% SDS 用 HCl 调 pH 值至 8.45 用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 500ml 贮存: 4°C</p>
<p><b>4 10×阳极电泳缓冲液</b> [2M Tris pH8.9] Tris碱 121.1g ddH<sub>2</sub>O 400ml 用HCl调pH值至8.9 用ddH<sub>2</sub>O定容至500ml 贮存: 4°C 注: 使用前稀释成 1×缓冲液使用</p>	<p><b>5. 10×阴极电泳缓冲液</b> [1MTris;1MTricine ;1% SDS; pH 8.3] Tris 碱 121.14g Tricine 179.2g SDS10g 用 ddH<sub>2</sub>O 溶解, 定容至 1000ml(不用调 pH)。 贮存: 4°C 注: 使用前稀释成 1×缓冲液使用</p>	
<p><b>6. 5×Tricine 蛋白样品上样缓冲液 (10ml)</b> 2.5ml 1MTris-Cl pH6.8 6ml 甘油 2g SDS 0.76g DTT (或者 400μl β-巯基乙醇) 5mg 考马斯亮蓝 G-250 用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 定容至 10ml 混匀分装-20°C贮存备用</p>	<p><b>7. 染色液</b> 冰醋酸 100 ml 甲醇 450 ml 考马斯亮蓝 G-250 0.25 g 考马斯亮蓝 R-250 0.25 g 水 450 ml</p>	<p><b>8. 脱色液</b> 冰醋酸 100ml 水 900ml</p>