

天
净
沙
系
列

CAT#:81212A-30

CAT#:81212B-30

CAT#:81212C-30

常温运输和保存，有低温成分

TIANDZ

一站式蛋白质非变性PAGE电泳套装

One-Stop Protein Native PAGE Pack

共享使用手册 V2.2

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native PAGE)是目前电泳法分离活性蛋白的主要方法之一,跟 SDS-PAGE 根据分子量大小分离蛋白质不同,它主要根据蛋白质的 pI 分离蛋白质。由于蛋白质的 pI 各不相同,所以对不同靶蛋白质需要选用具有不同 pH 的电泳体系。单独配制不同 pH 的 Native PAGE 电泳胶十分繁琐,为此本公司开发了本产品。它有下列特点:

1. 即开即用,用户不需单独准备各种成分,十分方便。
2. 非变性,电泳过程中蛋白质保持天然的构象和亚基之间的相互作用,得到的蛋白质一般都具有生物活性(而 SDS-PAGE 得到的蛋白没有活性)。
3. 可以用于分析蛋白质和 DNA 或 RNA 的相互作用、蛋白修饰、蛋白构型改变、回收有活性蛋白质等试验。
4. 电泳后可直接用于考染、银染、Western 杂交等实验。
5. 提供具有 3 种不同 pH 的缓冲液套装,便于客户选择最适合的缓冲液体系。

规格及成分

成份	编号	大纸盒包装
丙烯酰胺干粉	100864	60 g(250mL 棕色塑料瓶)
甲叉双丙烯酰胺干粉	100877	3 g
TEMED	100880	1.5 mL (棕色管)
过硫酸铵干粉	100879	1 g (本色盖)
高中低缓冲液套装选一		ABC 之一(见下)
使用手册	81212sc	1 份

高 pH 缓冲液套装(编号 100828,只有 81212A-30 有此成分)

高 pH 浓缩胶配胶液 (pH 6.7), 4×	100828a	100 mL
高 pH 分离胶配胶液 (pH 8.9), 4×	100828b	200 mL
高 pH 电泳液 (pH 8.3)	100828c	10 L (干粉)
高 pH 上样液, 5×	100828d	1 mL

中 pH 缓冲液套装(编号 100829,只有 81212B-30 有此成分)

中 pH 浓缩胶配胶液 (pH 5.5), 4×	100829a	100 mL
中 pH 分离胶配胶液 (pH 7.5), 4×	100829b	200 mL
中 pH 电泳液 (pH 7.0) 干粉 A	100829c	55.2g
中 pH 电泳液 (pH 7.0) 干粉 B	100829d	10g
中 pH 上样液, 5×	100829e	1 mL

低 pH 缓冲液套装(编号 100830,只有 81212C-30 有此成分)

低 pH 浓缩胶配胶液 (pH 6.7), 4×	100830a	100 mL
低 pH 分离胶配胶液 (pH 4.3), 4×	100830b	200 mL
低 pH 电泳液 (pH 4.5)	100830c	10 L (干粉)
低 pH 上样液, 5×	100830d	1 mL

运输及保存

常温运输和保存,上样液需低温运输、-20℃ 保存,保存期为一年。

自备试剂

去离子水、天然 PAGE 蛋白质标准或蛋白质等电泳标准品

使用方法

特别说明：如何选择缓冲液

高、中低 pH 缓冲液套装一定要配套使用。选择适当 pH 的缓冲液（包括上样液，电泳液，配胶液等）对蛋白质非变性 PAGE 非常重要，此又跟靶蛋白质的 pI 值密切相关。如果缓冲液的 pH 远离靶蛋白的 pI，则蛋白质分子带电多（电荷密度大），电泳速度快，分辨率高。但过酸过碱又容易使蛋白质结构变性，失去活性，所以最佳 pH 条件就是在电泳分辨率和维持活性之间寻找平衡，需要针对每种蛋白质进行摸索或通过滴定曲线来确定，没有通用的电泳缓冲体系。由于有近半数的蛋白质 pI 在 4-6.5，所以在不知道靶蛋白的 pI 时，可以先选用高 pH 缓冲系统。

一：配制分离胶

1. 确定浓度。对分子量在 100Kd 以上的蛋白质，可选用 3-5%的胶；对分子量在 20-150KD 之间的蛋白质，可选用 5-10%的胶；对分子量在 10-80KD 之间的蛋白质，可选用 10-15%的胶。对未知样品，建议使用 7.5%的胶。
2. 配制 10%的 APS（过硫酸铵）：按每 0.1 克过硫酸铵干粉加 1 mL 去离子水的比例配制 10%的 APS 溶液，该溶液可以在 4℃ 存放一周。
3. 配制 30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺（19:1）溶液：在本产品提供的装有 60 克丙烯酰胺干粉的塑料瓶中加入 146 mL 自备的去离子水和 3g 甲叉双丙烯酰胺，充分摇晃直到溶解（约需 10-20 分钟）即得 200 mL 30%丙烯酰胺（19:1）溶液。此溶液最好在一个月之内用完，必须 4℃ 避光保存。
4. 配 10 mL 分离胶(如果配制其他体积,请按比例调节各成分用量)：在一个 25 mL 的三角瓶中，先加入 4.2 mL 去离子水、3.3 mL 30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺（19: 1）溶液和 2.5 mL 4×分离胶配胶液。
5. 摇晃混匀后抽真空 10-15 分钟以去除溶液中的氧气（氧气能抑制丙烯酰胺聚合反应，不去除的话将影响丙烯酰胺聚合反应）。
6. 加入 50uL 新配制的 10%APS 和 10uL TEMED（这是配制 10 mL 胶的用量，配制更大体积的胶则按比例增加），迅速摇匀后倒胶。**注意：如果购买的是低 pH 缓冲系统，由于在低 pH 缓冲液中 PAGE 聚合速度降低，所以需要加倍上述两成分的用量。**

7. 在胶面距离顶部 1-1.5 cm 的时候停止灌胶。然后覆盖一层 1-5 mm 厚的水，使胶顶部液面平整。由于比重不同，水和丙烯酰胺溶液不会混合。

8. 室温聚合 30-60 分钟后，用 1×分离胶配胶液洗涤凝固的胶的顶部，待用。

二：配制浓缩胶（浓缩胶可以提高分辨率，适合于成分复杂的样品，一般使用浓度为 4%。使用浓缩胶时蛋白质泳动速度主要跟其尺寸和形状相关。因浓缩胶 pH 跟分离胶 pH 不同，蛋白质可能会发生聚合和沉淀。对成分单一的样品，可以不用浓缩胶，此时蛋白的泳动速度主要跟其电荷密度，尺寸和形状相关。）

1. 配 10 mL 浓缩胶(如果配制其他体积,请按比例调节各成分用量)：在一个 25 mL 的三角瓶中，先加入 6.2 mL 去离子水、1.3 mL 30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺（19: 1）溶液和 2.5mL 4×浓缩配胶液。

	<ol style="list-style-type: none"> 2. 摇晃混匀后抽真空 10-15 分钟以去除溶液中的氧气（氧气能抑制丙烯酰胺聚合反应，不去除将影响丙烯酰胺聚合反应）。 3. 按上表用量加入 50uL 10%APS 和 15uL TEMED（这是配制 10 mL 胶的用量，配制更大体积的胶则用量需按比例增加），迅速摇匀后在已经凝固的分离胶上倒胶。 4. 在液面达到顶部时停止灌胶，插入梳子。 5. 室温聚合 30-60 分钟，拔出梳子，用 1×电泳液冲洗加样孔。 <p>三：电泳</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 将凝胶板固定在电泳装置上，往上槽和下槽加入足够 1×电泳液。注：本产品提供 10 升电泳液，对低和高 pH 电泳液，用前需将所有干粉溶解在 1 L 水中得 10×电泳液，可以室温放置，用时再稀释成 1×电泳液。一般不需要再调节 pH，但保险起见，可以用 pH 试纸测试一下 1×电泳液。低和高 pH 电泳缓冲液的 pH 分别是 4.5 和 8.3。对中 pH 电泳液，其干粉只能配 1×电泳液，否则不溶解。配制时称取中 pH 电泳液（pH 7.0）干粉 A, 5.52g, 中 pH 电泳液（pH 7.0）干粉 B 1g 混匀，加去离子水至彻底溶解，调 pH 到 7.0，定容至 1L。客户根据可实际需要量按比例增减。 2. 连接电极。如果浓缩胶和分离胶的 pH 高于靶蛋白 pI，靶蛋白将带负电荷并向阳极移动，可以按标准的 SDS-PAGE 方法接通电极（上阴极下阳极）；如果浓缩胶和分离胶 pH 低于靶蛋白 pI，靶蛋白将带正电荷并向阴极移动，此时应该下阴极上阳极。 3. 300V 预电泳直到电流不再降低（约需要 30 分钟）以去除残留过硫酸铵。 4. 换电泳液。 5. 在液体蛋白质样品中加入 5×上样液（16 uL 液体样品加 4uL 上样液）后上样。0.75 mm 厚的胶可以上 10 uL，1.5 mm 厚的胶可以上 20 uL。在未用加样孔中也要加 1×上样液以防有样品的空道的样品扩散。注意：如果用考染检测，每个孔的蛋白最好在 50-100 ug 总蛋白，如果银染则只需要 1ug 即可。样品如果是蛋白质沉淀，可用 1×上样液直接溶解蛋白质沉淀后再上样。蛋白质溶液或沉淀中不能含有能够改变上样液 pH 的残留成分（如蛋白质沉淀剂 TCA），用前最好用 pH 试纸测试一下，不在上样液的 pH 范围时就用酸或碱调到正常范围。大量样品可用透析法调 pH。 6. 上样自备的天然 PAGE 蛋白质标准或等电电泳的标准品（如果有的话）。 7. 用 15 mA（对 0.75 mm 厚的胶）或 30 mA（对 1.5mm 厚的胶）的电流电泳直到染料移动到分离胶底部。微型胶一般需要 1-2 小时。注意：电泳过程最好在冷室或有冷却系统，以免电泳产热使蛋白质变性。 8. 终止电泳，取出凝胶进行后续的实验处理（如染色或酶活性检测）。
<p>关联产品</p>	<p>一站式 SDS-PAGE 电泳套装（CAT#:80810-30）</p>