

蛋白质系列

CAT#:81212A-30

CAT#:81212B-30

CAT#:81212C-30

常温运输和保存（上样液需-20℃保存）

此手册为高、中和低 pH 电泳套装共享

The logo for TIANDZ, consisting of the word "TIANDZ" in white, bold, uppercase letters on a red rectangular background.

一站式蛋白质非变性 PAGE 电泳套装

One-Stop Protein Native PAGE Pack

使用手册 V2.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区学院南路 12 号北师大留学生创业园 57 号楼 301 室

QQ:944823743, 449730601 (销售), 948393554 (技术), www.tiandz.com

电话: 010-80638853, 010-62200278 (销售), 15811350851 (技术), 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,它是根据蛋白质分子大小、形状、电荷密度三个主要参数分离蛋白质。由于蛋白质的 pI 各不相同,所以对不同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。还免去了实验人员接触粉末状的剧毒物品丙烯酰胺
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	30 次大纸盒包装
丙烯酰胺干粉	60 g
甲叉双丙烯酰胺干粉	3 g
TEMED	1.5 mL
过硫酸铵干粉	1 g
高中低缓冲液套装选一	ABC 之一(见下)
使用手册	1 份

高 pH 缓冲液套装(只有 81212A-30 有此成分)

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

中 pH 缓冲液套装(只有 81212B-30 有此成分)

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

低 pH 缓冲液套装(只有 81212C-30 有此成分)

低 pH 浓缩胶配胶液 (pH 6.7), 4×	100 mL
低 pH 分离胶配胶液 (pH 4.3), 4×	200 mL

	<table border="1" data-bbox="485 143 1358 230"> <tr> <td data-bbox="485 143 991 185">低 pH 电泳液 (pH 4.5)</td> <td data-bbox="991 143 1358 185">10 L (干粉)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="485 185 991 230">低 pH 上样液, 5×</td> <td data-bbox="991 185 1358 230">1 mL</td> </tr> </table> <p data-bbox="443 241 1399 322">注: 高、中和低 pH 缓冲液套装里面均含 100 mL 浓缩胶配胶液、200 mL 分离胶配胶液、10 L 电泳液 (干粉) 和 1 mL 上样液, 只是 pH 不同。</p>	低 pH 电泳液 (pH 4.5)	10 L (干粉)	低 pH 上样液, 5×	1 mL
低 pH 电泳液 (pH 4.5)	10 L (干粉)				
低 pH 上样液, 5×	1 mL				
运输及保存	常温运输和保存 (上样液需-20℃保存), 保存期为一年。				
自备试剂	去离子水				
使用方法	<p data-bbox="443 517 783 551">特别说明: 如何选择缓冲液</p> <p data-bbox="443 566 1399 1014">高 pH 浓缩胶, 高 pH 分离胶, 高 pH 电泳液和高 pH 上样液一定要配套使用。中 pH 和低 pH 系列也是如此, 绝不能高 pH 的成分跟其他 pH 的交叉使用。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, 缓冲液的最佳 pH 又跟目的蛋白质的 pI 值密切相关。如果 pH 远离 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, 所以在不知道目标蛋白的 pI 时, 可以先选用高 pH 缓冲系统。</p> <p data-bbox="443 1032 644 1066">一: 配制分离胶</p> <ol data-bbox="443 1084 1399 2051" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="443 1084 1399 1272">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。 <li data-bbox="443 1290 1399 1370">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。 <li data-bbox="443 1388 1399 1576">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。 <li data-bbox="443 1594 1399 1738">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。 <li data-bbox="443 1756 1399 1836">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)。 <li data-bbox="443 1854 1399 2051">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, 所以需要增加上述两成分的用量。 				

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。

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。

三：电泳

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 升的三种不同 pH 的电泳液干粉中的一种，低 PH 和高 PH 值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。高中低 pH 电泳缓冲液的 pH 分别是 8.3，7.0 和 4.5。

注意：中 pH 值的电泳液干粉只能配 1x 电泳液，否则不溶解。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 PH7.0，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 高于目标蛋白 pI，目标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 低于目标蛋白 pI，目标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：

	<p>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。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>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>
<p>关联产品</p>	<p>一站式 SDS-PAGE 电泳套装 (CAT#:80810-30)</p>