



RTD6131

Ver. 741255

碱性蛋白非变性PAGE凝胶制备及电泳试剂盒

Basic Protein Native PAGE Gel Preparation and Electrophoresis Kit

产品编号及规格:

RTD6131

50次

贮存、运输和效期:

按照标签温度贮存; 试剂盒常温运输; 有效期一年。

产品组成:

| 货号 | 名称 | 规格 | 贮存 |
|------------|--------------------|--------|---------------|
| AC2913-01 | 30%PAA(29:1) | 100 ml | 4℃ |
| RTD6131-02 | 4×碱性蛋白分离胶缓冲液 pH4.3 | 100 ml | 4℃ |
| RTD6131-03 | 4×碱性蛋白浓缩胶缓冲液 pH6.8 | 50 ml | 4℃ |
| RTD6131-04 | 100×分离胶促凝剂 | 2.5 ml | -20℃ |
| AP020P | 10% APS (干粉) | 5 ml | RT 配制后-20℃ |
| TA0761-01 | TEMED | 0.5ml | 4℃, 避光 |
| PL110-01 | 5×甲基绿上样缓冲液 | 1 ml | -20℃ |
| TG160P | 5×碱性蛋白电泳缓冲液 (干粉) | 1 L | RT |

产品简介:

本公司提供的试剂盒包含碱性蛋白凝胶制备及电泳所需的全部试剂, 客户只需自备制胶器具和蒸馏水即可配制碱性蛋白非变性(native)PAGE凝胶。根据凝胶厚度不同, 本试剂盒可配制30-50块常规大小(8×10cm)的非变性PAGE胶。

各种蛋白质分子由于所含的碱性氨基酸和酸性氨基酸的数目不同, 因而有各自的等电点。凡碱性氨基酸含量较多的蛋白质称为碱性蛋白质, 等电点偏碱性, 如组蛋白、精蛋白等。反之, 凡酸性氨基酸含量较多的蛋白质, 等电点就偏酸性。酸性蛋白通常在非变性凝胶电泳中采用的 pH 是 8.8 的缓冲系统, 蛋白会带负电荷, 蛋白会向阳极移动; 而碱性蛋白通常电泳是在微酸性环境下进行, 蛋白带正电荷, 这时候需要将阴极和阳极倒置才可以电泳。

特别说明:

1. 由于本系统采用酸性非连续凝胶系统, 分离胶pH为4.3, 因此要求待分离的蛋白等电点pI要高于4.3, 且越远离4.3 蛋白带的正电荷越多, 在凝胶电泳中才能正常向阴极泳动。
2. 由于蛋白在酸性系统中带正电荷, 电泳时必须反转电极才能正常电泳。
3. 本试剂盒不适用于总蛋白样品的电泳, 也不适用于总蛋白分离后的Western Blot检测; 推荐应用于纯化后蛋白的电泳。

使用说明:

一. 准备工作

10% APS配制-5 ml: 将0.5 g APS干粉溶于5 ml灭菌水中, 彻底溶解后分装, 1 ml/支, -20℃ 保存, 每次取一管使用。10% APS应尽量减少常温存放时间, 以防失效。10% APS在4℃有效期为一周, 若发现凝胶聚合时间延长, 应考虑更换使用-20℃保存的10% APS。

二. 制胶:

2.1 配制分离胶:

- 2.1.1 按照顺序将表一不同体积的分离胶成分混匀; 最后加入促凝剂和催化剂, 轻轻搅拌使其混匀。

表一 配制不同浓度凝胶所需各组分的体积 (1.0mm厚度胶板)

| | 浓缩胶 | | 分离胶 | | | | |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
| | 5% | 6% | 8% | 10% | 12% | 15% | |
| 超纯水 | 1.15 ml | 2.7 ml | 2.4 ml | 2.0 ml | 1.7 ml | 1.2 ml | |
| 30% PAA(29:1) | 0.33 ml | 1 ml | 1.3 ml | 1.7 ml | 2 ml | 2.5 ml | |
| 4×浓缩胶缓冲液 | 0.5 ml | - | - | - | - | - | |
| 4×分离胶缓冲液 | - | 1.25 ml | 1.25 ml | 1.25 ml | 1.25 ml | 1.25 ml | |
| 100×促凝剂 | - | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | |
| 10% APS | 20 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | |
| TEMED | 2 μl | 5 μl | 5 μl | 5 μl | 5 μl | 5 μl | |
| 总体积 | 2 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | |

2.1.2 在玻璃板中灌入适量分离胶溶液 (对于8×10cm凝胶, 凝胶液加至约距前玻璃板顶端1.5 cm或距梳齿约0.5 cm即可), 然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层1 cm的水层, 使凝胶表面保持平整。

2.1.3 常温静置20-40分钟, 待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面后, 说明凝胶已聚合。

注1: 凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时, 聚合较快; 冬天气温低时, 聚合时间会延长。可以根据环境温度的不同调节催化剂的加入量和凝固时间。

注2: 与经典制胶不同的是, 分离胶的凝固除了需要APS和TEMED外, 还需要加入促凝剂才能有效凝固分离胶。

- 2.2 配制浓缩胶:
- 2.2.1 去除覆盖在分离胶上的水层。
 - 2.2.2 按照顺序将表一中不同体积浓缩胶成分混匀,最后加入催化剂,混匀。
 - 2.2.3 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面,直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端。
 - 2.2.4 将梳子插入凝胶内,避免产生气泡。
 - 2.2.5 常温静置30-60分钟,等待浓缩胶聚合。

注:凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时,聚合较快;冬天气温低时,聚合时间会延长。可以根据环境温度的不同调节催化剂的加入量和凝固时间。

三 电泳:

3.1 5×碱性蛋白电泳缓冲液的配制:

将一包干粉全部倒入1 L烧杯中,加入约900 ml水彻底溶解,加入冰醋酸11 ml,用水定容至1 L(此溶液pH值约为4.4)。电泳前将缓冲液稀释5倍即配成1×碱性蛋白电泳缓冲液。

3.2 样品处理:融化-混合-上样

- 3.2.1 将5×甲基绿上样缓冲液常温融化后混匀。
- 3.2.2 将上样缓冲液与蛋白样品按照1:4的比例混匀。
- 3.2.3 快用离心收集到管底,上样电泳。

注:不要加热处理样品

3.3 电泳:

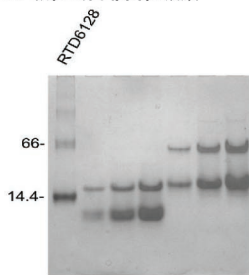
在电泳槽的内槽加入1×电泳缓冲液,轻轻拨出梳子,冲洗加样孔,随后在电泳槽外槽加入适量的1×电泳缓冲液。上样。把电泳电源的电源线互换,即红色的阳极电极查到阴极极孔,黑色的阴极电极插到阳极孔。

碱性蛋白电泳条件(单板)

| | |
|--------|-----------|
| 恒电压 | 150 V |
| 起始电流变化 | 30-40 mA |
| 终止电流变化 | 10-20 mA |
| 电泳时间 | 40-50 min |

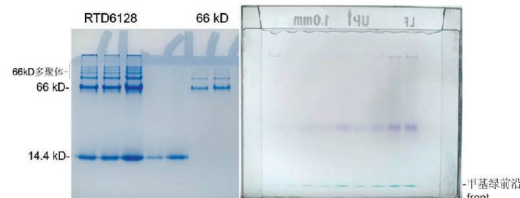
实验示例:

1. 10% 碱性蛋白非变性凝胶



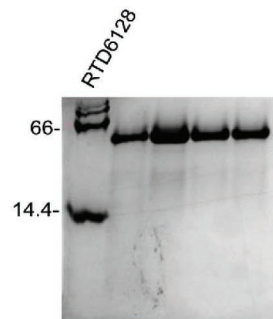
凝胶: 10% 碱性蛋白非变性凝胶
电泳条件: 恒压150V 45 min
电泳缓冲液: 1×碱性蛋白电泳缓冲液
染色: FastBlue蛋白快速染色染色30分钟

2. 12% 碱性蛋白非变性凝胶



凝胶: 12% 碱性蛋白非变性凝胶
电泳条件: 恒压150V 55 min
电泳缓冲液: 1×碱性蛋白电泳缓冲液
染色: FastBlue蛋白快速染色染色30分钟

3. 15% 碱性蛋白非变性凝胶



凝胶: 15% 碱性蛋白非变性凝胶
电泳条件: 恒压150V 55 min
电泳缓冲液: 1×碱性蛋白电泳缓冲液
染色: FastBlue蛋白快速染色染色30分钟