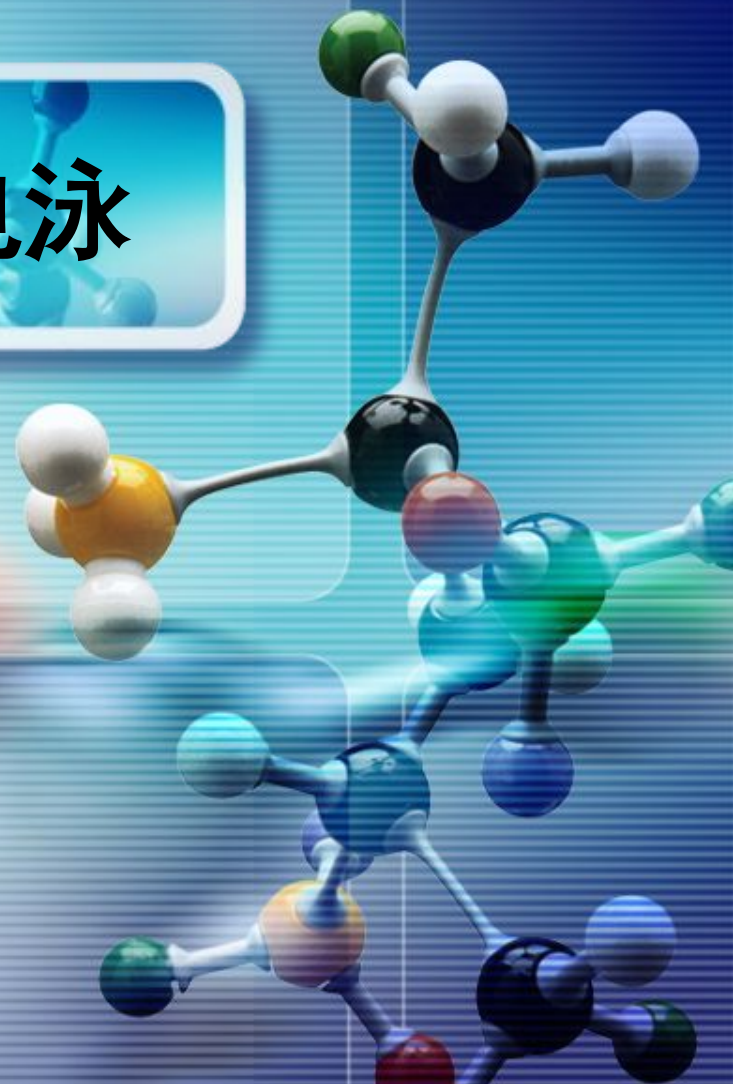


LOGO

蛋白质的SDS-PAGE电泳



一.实验目的



- 学习聚丙烯酰胺凝胶电泳的基本原理
- 掌握垂直板电泳的操作方法。
- 了解其它电泳的方法和原理

二.实验原理



聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺(Acr)和交联剂N,N-甲叉双丙烯酰胺(Bis)在加速剂N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)和催化剂过硫酸铵(AP)或核黄素的作用下聚合交联成**三维网状结构**的凝胶, 以此凝胶为支持物的电泳。

催化聚合方法分类

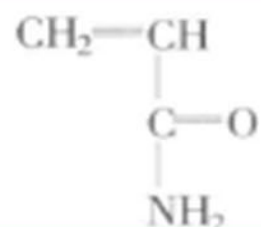


■ 化学聚合法

以过硫酸铵（AP）为催化剂，以四乙基乙二胺（TEMED）为加速剂，聚合过程中，TEMED催化过硫酸铵产生**自由基**，引发丙烯酰胺单体聚合，同时甲叉双丙烯酰胺与丙烯酰胺链间产生甲叉键交联，形成三维网状结构。

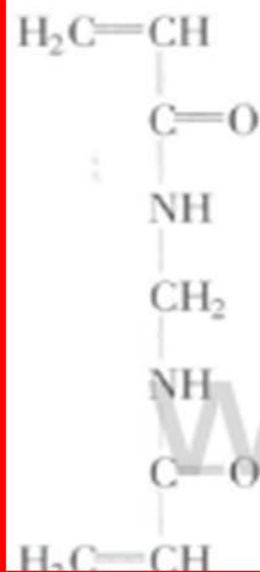
■ 光聚合法

以核黄素为催化剂，光照使核黄素产生**自由基**诱发聚合反应。

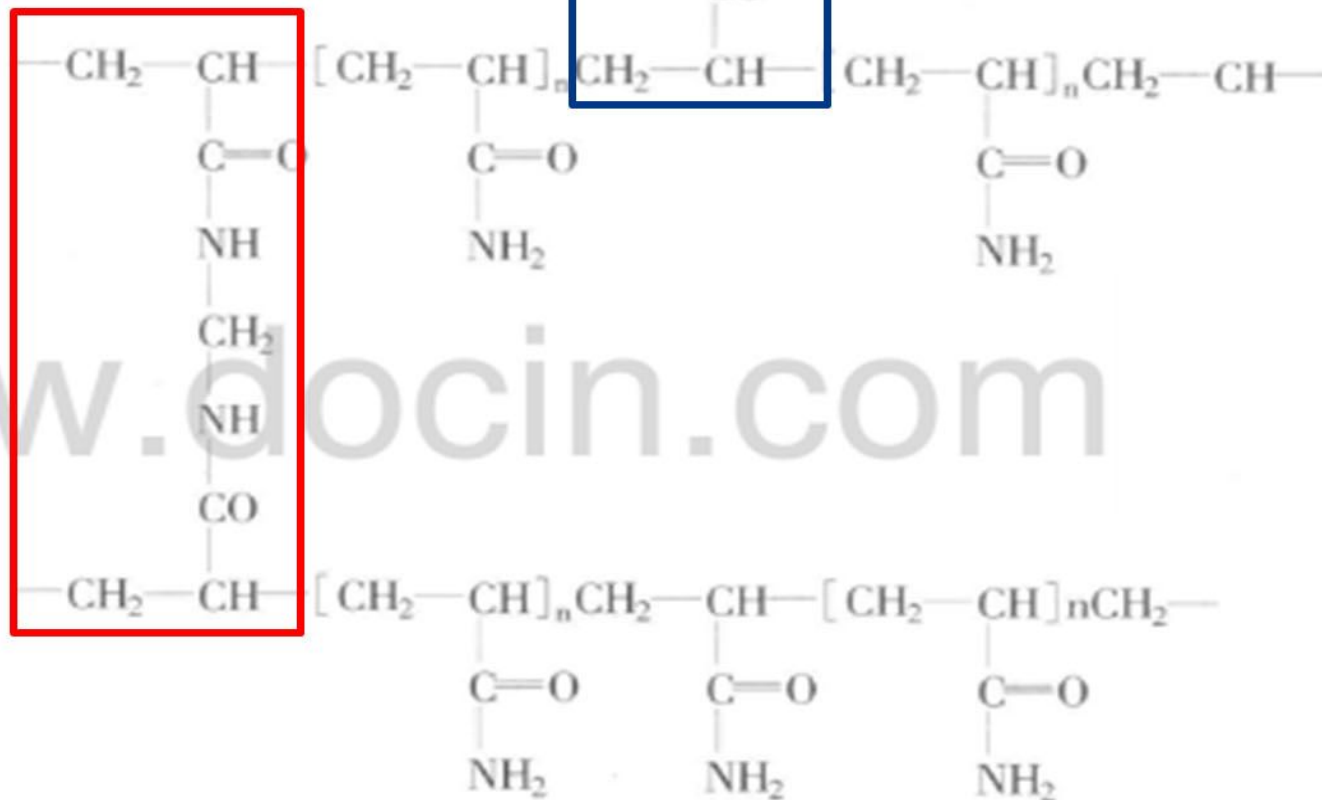
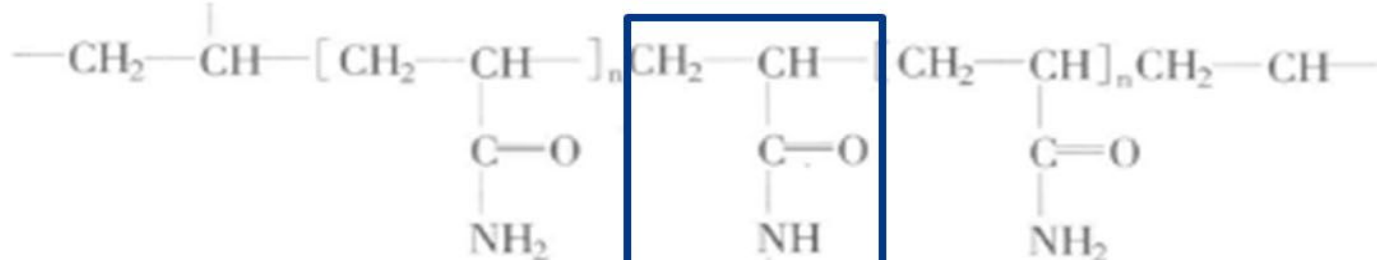


丙烯酰胺

+



甲叉双丙烯酰胺



聚丙烯酰胺凝胶

PAGE分类



SDS-PAGE电泳属于
哪种类型电泳

根据凝胶系统的均匀性，可分为连续性和不连续性电泳。
连续性聚丙烯酰胺凝胶电泳：

电泳系统中的凝胶网孔，缓冲液和PH均相同，电泳时沿电势梯度均匀分布，简单易行。

不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳：

系统中采用了两种或两种以上的缓冲液，PH和凝胶孔径，电泳过程中形成的电势梯度不均匀，可将较稀得样品浓缩成密集的区域，提高分辨率

PAGE分类



SDS-PAGE电泳属于
哪种类型电泳

- 根据凝胶系统和电泳缓冲液对蛋白质构象的影响，可分为**变性电泳**和**非变性电泳**。

- **变性电泳**

在缓冲系统中加入了**SDS**或者**尿素**等蛋白质变性剂，电泳前后，蛋白质处于变性状态

- **非变性电泳**

在缓冲系统中未加入蛋白质变性剂，蛋白质保持天然构象

SDS-PAGE电泳



■ SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶电泳时，它的迁移率取决于它所带**净电荷**以及**分子的大小**和**形状**等因素。如果在聚丙烯酰胺凝胶系统中加入阴离子去污剂十二烷基磺酸钠(SDS)，则蛋白质分子的电泳迁移率主要取决于它的分子量，而与所带电荷和形状无关。因此可以利用SDS-PAGE测定蛋白质分子量。

- 当蛋白质的分子量在15KD—200KD之间时，电泳迁移率与分子量的对数呈线性关系。

SDS-PAGE胶组成和功能

凝胶由分离胶和浓缩胶组成：

上层为**浓缩胶**，凝胶孔径较大，没有分子筛效应，其pH为6.8，由于**快慢离子**所形成的高电压梯度，使得变性蛋白质分子在泳动中被压缩为很薄的一层，大大提高了分辨率。

下层为**分离胶**，凝胶孔径较小，有分子筛效应，pH为8.8，变性蛋白质分子所带负电荷基本一致，泳动速度主要决定于分子量。

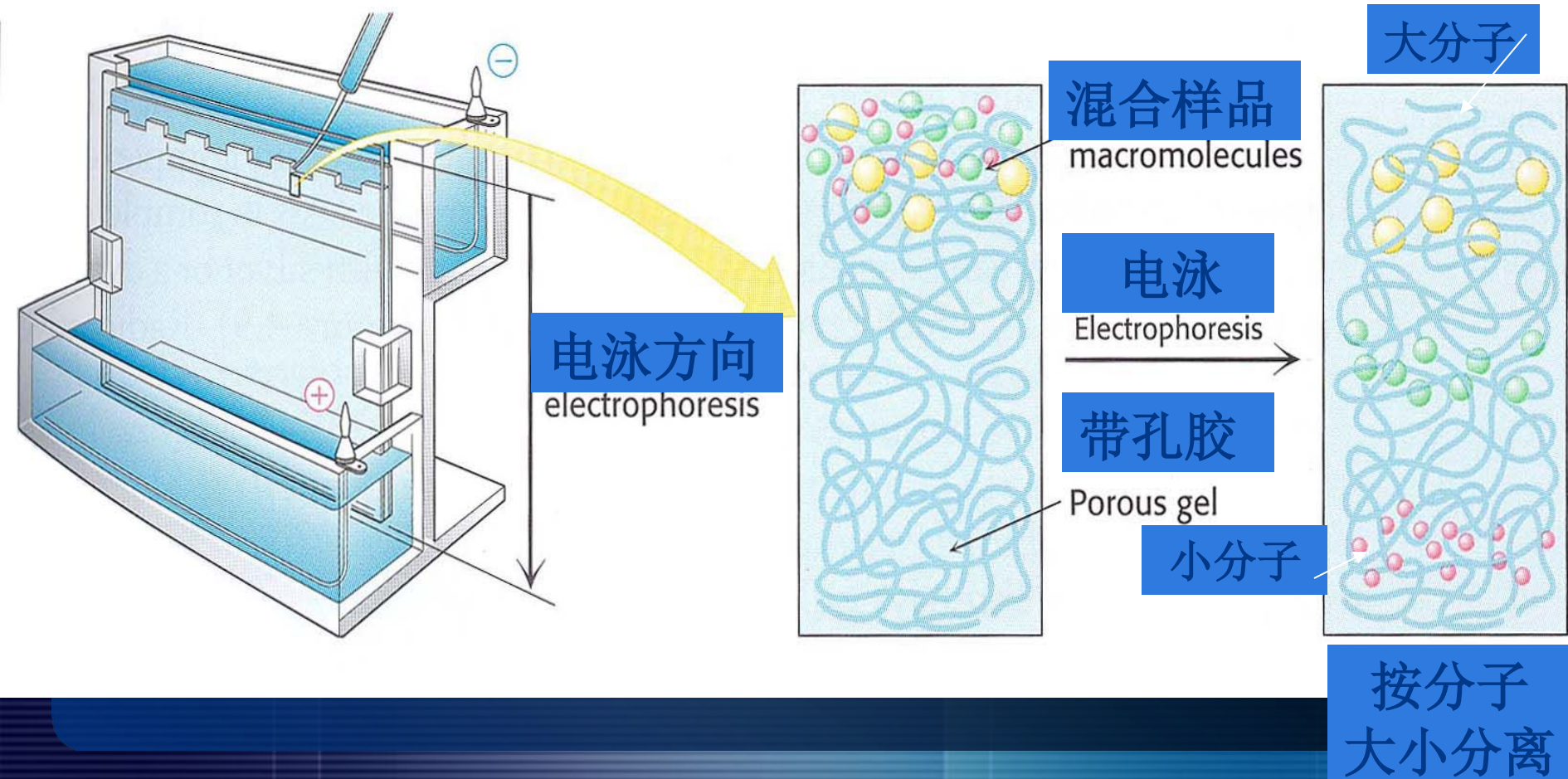


分子量范围与凝胶浓度的关系

丙烯酰胺浓度 (%)	线性分离范围 (kD)
15	12~43
10	16~68
7.5	36~94
5.0	57~212



电泳过程中分子迁移的规律，小分子走在前头，大分子滞后



三.实验试剂和器材

■ 1.材料:

IPTG诱导前后蛋白样品, 蛋白Marker

■ 2.试剂:

(1) 30%丙烯酰胺

(2) 10%SDS

(3)分离胶缓冲液:1.5mol/L Tris-HCl pH 8.8

(4)浓缩胶缓冲液: 1.0mol/L Tris-HCl pH6.8



试剂:

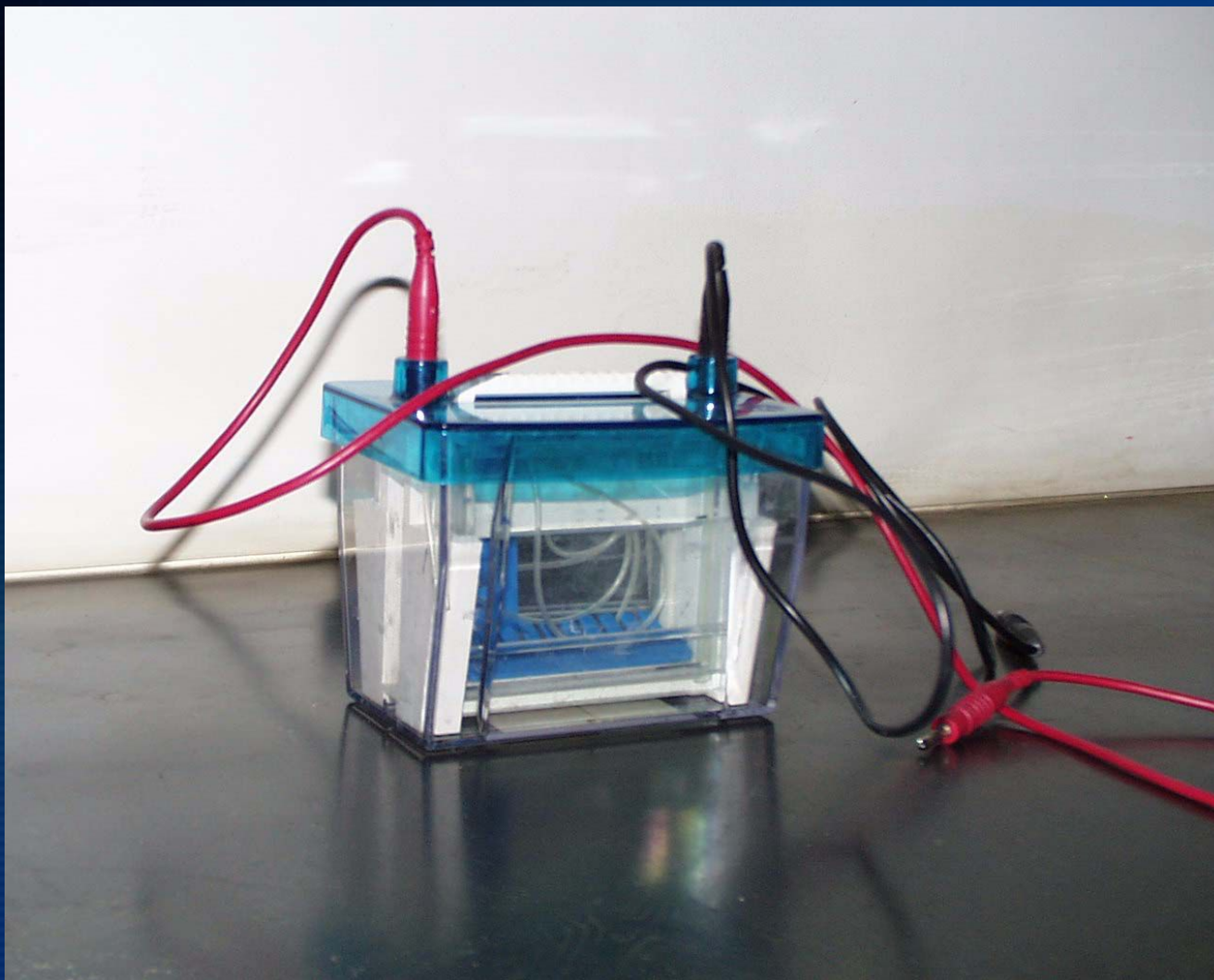
- (5) 10%过硫酸铵 (APS) 溶液
- (6) 四甲基乙二胺 (TEMED)
- (7) SDS上样缓冲液: Tris-HCl、 SDS、 溴酚蓝、 甘油、 2-巯基乙醇
- (8) 电极缓冲液 (Tris-甘氨酸缓冲液)
- (9) 染色液: 甲醇、 水 、 冰乙酸 、 考马斯亮蓝R250
- (10) 脱色液: 甲醇、 水 、 冰乙酸

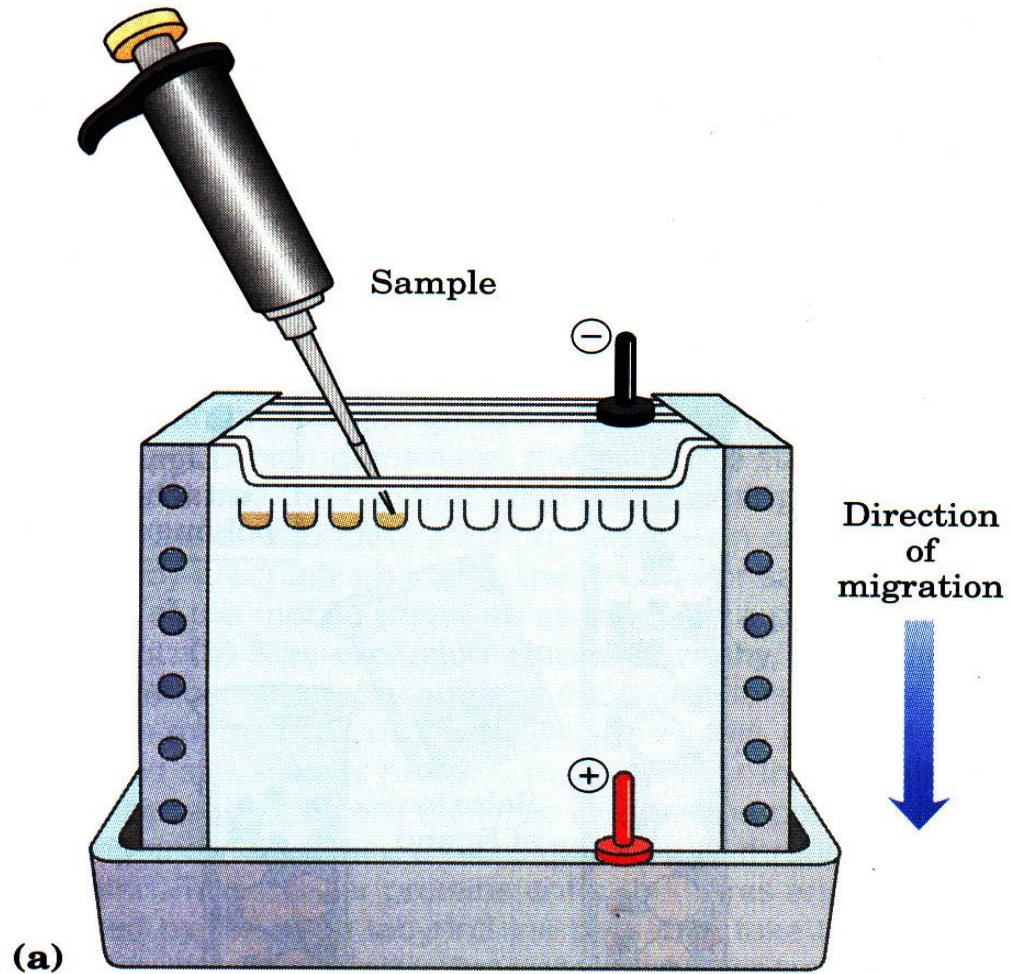


3. 实验器材:

- 垂直板电泳装置
- 稳压稳流电泳仪
- 脱色摇床
- 移液枪
- 大培养皿







各部分凝胶配制



	分离胶 (10% 10ml)	浓缩胶 (5% 10ml)
ddH ₂ O	4.05ml	6.8ml
30%Acr	3.3ml	1.7ml
Buffer	1.5mol/L pH=8.8 Tris-HCl 2.5ml	1.0mol/L pH=6.8 Tris-HCl 1.25ml
10%SDS	100μl	100μl
10%Ap	50μl	100μl
TEMED	10μl	10μl

实验步骤

分离胶的制备



浓缩胶的制备

待分离样品的准备

加样



电泳



染色



脱色

四.实验步骤



- 1. 安装制胶模具。
- 2. 调制分离胶（10%），加入10%APS和TEMED，混匀，立即灌注至模具高度的70%。
- 3. 加一层纯水，约30min后聚合。
- 4. 倒出水并用滤纸把剩余的水分吸干。
- 5. 调制浓缩胶（5%），加入10%APS和TEMED混匀，立即灌注插入梳子。静置40min。

❖ 制备分离胶

倒出水或正丁醇，
并用滤纸吸干

封水或饱和
正丁醇
溶液

加入分离
胶溶液
pH 8.8

封水的目的是使分离胶上表面平直，并排除气泡。
凝胶聚合好的标志是胶与水层之间形成清晰的界面。

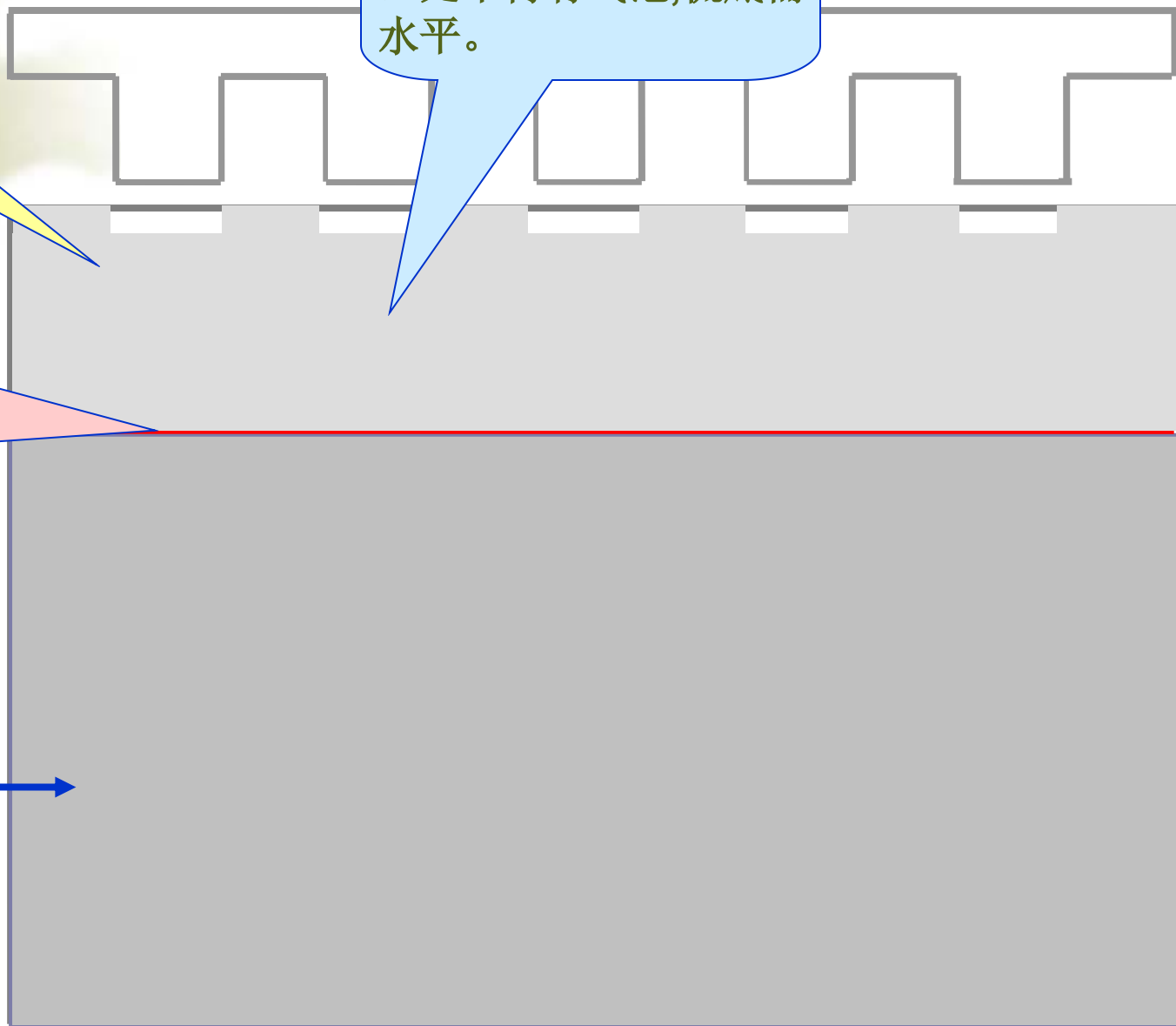
❖ 制备浓缩胶

样梳需一次平稳插入,梳口处不得有气泡,梳底需水平。

插入样品梳

加入浓缩
胶溶液
pH6.8

分离胶
pH 8.8





- 6. 样品准备：加入SDS上样缓冲液，沸水浴5-10 min。
- 7. 加样电泳（每孔加样15 μ l）。开始电压80V，染料进入分离胶时，电压提到110V，继续电泳，让溴酚蓝到达分离胶底部时关闭电源。
- 8. 卸下玻板，剥离凝胶放在器皿内，切去一角作为方位标记。

❖ 上样及电泳

通电

加入样品

浓缩胶

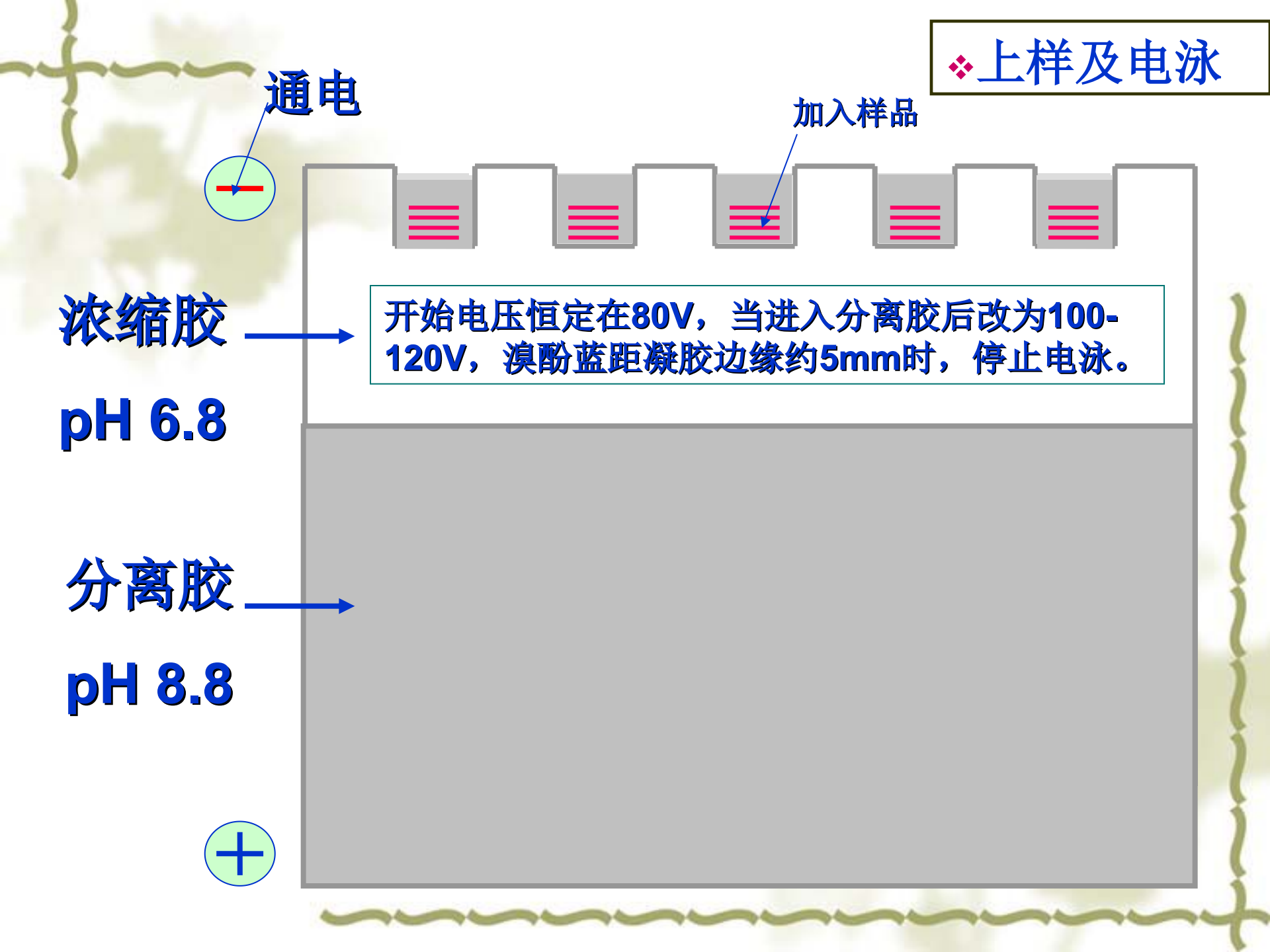
pH 6.8

分离胶

pH 8.8

开始电压恒定在80V，当进入分离胶后改为100-120V，溴酚蓝距凝胶边缘约5mm时，停止电泳。

+

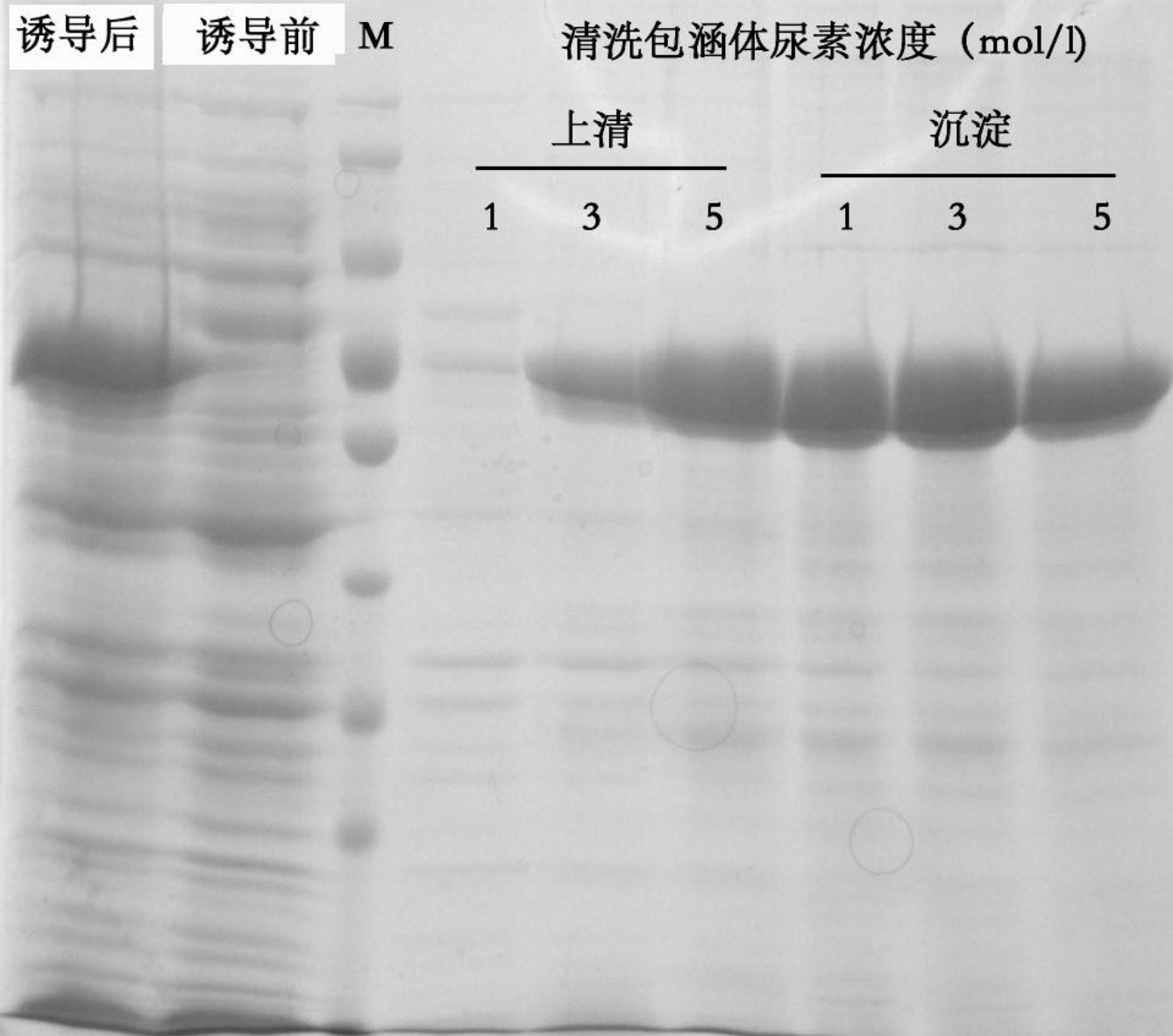




- 9. 染色：用至少五倍体积染色液浸泡凝胶，于平缓摇摆平台上室温1h左右。
- 10. 脱色：用蒸馏水漂洗数次，再用脱色液脱色，至蛋白质条带清晰。

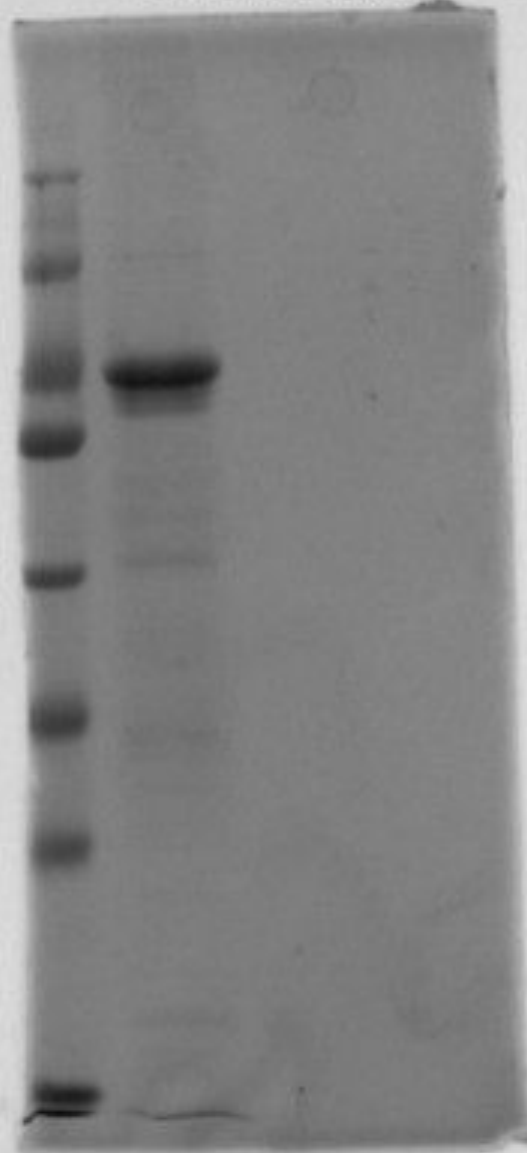
2013-1-31 PET28a-c-myc原核蛋白（包涵体）纯化

诱导后	诱导前	M	清洗包涵体尿素浓度 (mol/l)					
			上清			沉淀		
			1	3	5	1	3	5



2013-2-20

M 纯化后的c-myc原核蛋白



思考题:



- 1. 分析SDS-PAGE电泳中，上样缓冲液主要成分及作用？
- 2. 样品为何在浓缩胶中被压缩成狭窄的一条带？