

# 蛋白质 Bis-Tris 聚丙烯酰胺凝胶电泳系统标准操作规程

方案来源:

Thermo scientific

- \*有修改, 具体原理及方法来源详参本方案末尾所附参考文献
- \*常见的阳离子由 Bis-Tris 缓冲液形成。凝胶制备 pH 6.4 以增强凝胶稳定性。
- \*MES 缓冲液用于小蛋白, MOPS 缓冲液用于中等大小的蛋白质。

实验器材和试剂 (试剂及各种缓冲液配制方法详见附录一):

- ✓ 垂直电泳系统 (电源、电泳槽等一系列配套设施), 制胶用玻璃板 (厚板 0.75/1/1.5 mm spacer plate 和薄板 short plate) 及塑料框架, 微量移液器和配套吸头 (5mL、1mL、200  $\mu$ L、10  $\mu$ L), 离心管 (1.5mL、15mL、50mL), 烧杯, 容量瓶 (100mL), 量筒 (100mL、500mL、1000mL), 广口试剂瓶 (500mL、1000mL), 棕色瓶 (250mL、500mL), 棕色离心管 (分装 TEMED), 滤纸, 无尘擦拭纸, 保鲜膜/密封袋, 玻璃棒, pH 计, 分析天平, 涡旋混匀仪等。

\*制胶及电泳设备多个厂家均有生产销售, 建议选用同一制造商的配套设备, 如 Bio-rad Mini-PROTEAN<sup>®</sup> system、Tanon<sup>®</sup> VE-180 system 等, 并按照制造商提供的操作手册组装使用。试剂瓶应选择带刻度, 且较为准确的产品。

- ✓ 32% 丙烯酰胺/亚甲基双丙烯酰胺混合液 (Acr-Bis)
- ✓ 3.5 $\times$ Bis-Tris 胶缓冲液
- ✓ 10% 过硫酸铵 (APS), 四甲基乙二胺 (TEMED)
- ✓ 电泳缓冲液 (20 $\times$  MES Running Buffer, 20 $\times$  MOPS Running Buffer)
- ✓ 上样缓冲液 (4 $\times$ LDS Loading Buffer)
- ✓ 超纯水 (ddH<sub>2</sub>O)。

\*除非有特殊说明, 本方案中采用质量体积比 (m/v) 表示百分浓度。

聚丙烯酰胺凝胶的配制（各浓度分离胶及浓缩胶配方详见附录 2）：

✓ **凝胶模具准备**

- ◇ 根据实验需求选择不同厚度电泳玻璃片。
- ◇ 用洗涤剂清洗玻板，晾干。
- ◇ 用 75%酒精擦拭玻璃片，再用蒸馏水冲洗，晾干。
- ◇ 用前用无尘擦拭纸擦净玻璃。
- ◇ 将玻璃板按照相应使用说明固定在灌胶器上。

✓ **分离胶灌制**

- ◇ 在 50mL 离心管中依次加入超纯水，32% Acr-Bis，3.5×Bis-Tris 胶缓冲液，轻柔混匀。
- ◇ 再加入新鲜配制的 10%APS，TEMED，混匀。
- ◇ 可使用 5mL 移液器沿着玻璃板壁将分离胶溶液缓缓注入模具，凝胶液加至约距短玻璃板顶端 1.5 cm（6x8cm 1.5mm 厚玻璃板通常灌注 3.75mL）。
- ◇ 在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1cm 的蒸馏水（灌满玻板），使液面平整，隔绝空气。
- ◇ 静止 20-40min，待分离胶和水层之间出现一条清晰的分界线后，表明凝胶已聚合完毕，此时可倒掉上层蒸馏水，并倾斜玻璃板用滤纸把残留的水吸尽。

✓ **浓缩胶灌制**

- ◇ 在 50mL 离心管中依次加入超纯水，32% Acr-Bis，3.5×Bis-Tris 胶缓冲液，轻柔混匀。
- ◇ 再加入新鲜配制的 10%APS，TEMED，摇匀。
- ◇ 将溶液沿玻璃板壁缓缓注入模具，达到玻璃板顶端时停止，轻轻把梳子垂直插入浓缩胶，静置 10~20min。
- ◇ 待胶凝固后，半小时后立即使用，或置于自封袋中密封保存于 4℃（袋中可加入少许蒸馏水保持水分）。
- ◇ 使用时连带玻璃板一起将放入电泳槽，加入电泳缓冲液后再小心拔出梳子，准备上样电泳。

\*配制 mini 胶时通常选用 15mL、50mL 离心管作为容器，旋转摇匀或以移液器吹打混匀；大量配制时建议选用容量合适的烧杯，以玻璃棒搅拌混匀；不论选用何种方式，制胶全程都应避免产生气泡。

## 蛋白电泳

### ➤ 样品准备

- ✓ 提前打开水浴锅或金属浴，温度一般设置为 70~100℃；
- ✓ 将适量蛋白样品转移至 1.5mL 离心管中，注意排序编号并记录；
- ✓ 按比例加入上样缓冲液；
- ✓ 把样品置于水浴锅中加热 5 分钟；
- ✓ 取出样品冷却至室温，瞬时离心 10~30s；
- ✓ 按编号排序，准备上样。

\*根据需求加入还原或非还原的上样缓冲液，若使用本方案推荐的 4×LDS loading buffer，则按样品：缓冲液=1：3（v/v）添加。

### ➤ 电泳

- ✓ 将凝胶上样孔朝上固定在蛋白电泳槽内，分别在内外槽加入电泳缓冲液（外槽至少没过电极或铂丝，内槽加满/没过上样孔）；
- ✓ 轻轻地垂直用力拔出凝胶中的梳子，上样前可先用移液器吸取电泳缓冲液后吹吸上样孔，除去加样孔的残胶；
- ✓ 用微量移液器上样并记录样品顺序；
- ✓ 将电压调至 120V，观察到前端的溴酚蓝指示带到达底部时停止，或根据目的蛋白条带大小不同延长或缩短电泳时间。

\*如有条件，可使用专用的凝胶上样吸头将样品完整的加入孔中。上样量不要过度。如果样品溢入相邻的加样孔中，会影响实验结果。在样品孔中注入样品时，注意不要接触到孔的底部，否则会产生扭曲的条带；吸头也不宜过高，避免样品在缓冲液中弥散。上样操作时间也不易过长，先点入的样品在缓冲液中浸泡太久易弥散。

## 附录 1 聚丙烯酰胺凝胶电泳相关溶液的配制

## ➤ 32%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (30: 2) 配方

| 组分                                 | 用量        | 1X 终浓度或百分比 |
|------------------------------------|-----------|------------|
| 丙烯酰胺 (生工生物 A601032; MW: 71.08)     |           | 30%        |
|                                    | 30g       |            |
| 甲叉双丙烯酰胺 (生工生物 A100172; MW: 154.17) |           | 2%         |
|                                    | 2g        |            |
| ddH <sub>2</sub> O                 | 定容至 100ml |            |

## ➤ 配制方法 (100ml)

- ✓ 称取 Acr 30g、甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 2g 于 100ml 烧杯中
- ✓ 加超纯水 50ml, 搅拌至溶解完全
- ✓ 倒入 100ml 量筒, 用超纯水定容至 100ml
- ✓ 滤纸过滤后置棕色瓶中, 避光 4℃ 储藏备用, 可用 1-2 月。

## ➤ 3.5×Bis-Tris 胶缓冲液配方

| 组分                                  | 用量        | 1X 终浓度或百分比 |
|-------------------------------------|-----------|------------|
| Bis-Tris (生工生物 A100715; MW: 209.24) | 26.16g    | 35mM       |
| ddH <sub>2</sub> O                  | 定容至 100ml |            |

## ➤ 配制方法 (100ml)

- ✓ 称取 Bis-Tris 26.16g, 加入 100ml 烧杯中
- ✓ 加入 50ml 去离子水, 搅拌至完全溶解
- ✓ 用浓盐酸调至 pH6.5-6.8 (需 4.5-5ml 浓盐酸)
- ✓ 倒入 100ml 量筒中, 用去离子水定容至 100ml, 过滤, 4℃ 贮存。

➤ 20×MES 电泳缓冲液（适用于低于 20KD 的蛋白）配方

| 组分   | 用量         | 1X 终浓度或百分比 |
|--|------------|------------|
| MES-H <sub>2</sub> O（生工生物 A100169；MW：213.25）       | 213g       | 50mM       |
| Tris（生工生物 A100826；MW：121.14）                       | 121.14g    | 50mM       |
| EDTA-2Na-2H <sub>2</sub> O（生工生物 A100105；MW：372.24） | 7.44g      | 1mM        |
| SDS（生工生物 A100127；MW：288.38）                        | 20g        | 0.1%       |
| ddH <sub>2</sub> O                                 | 定容至 1000ml |            |

pH7.3

➤ 配制方法(1000ml)

- ✓ 称取 MES-H<sub>2</sub>O 213g, Tris 121.14g, EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O 7.44g, SDS 20g, 加入 1000ml 烧杯中
- ✓ 加入 600ml 去离子水, 搅拌至完全溶解
- ✓ 倒入 1000ml 量筒中, 用去离子水定容至 1000ml, 不需调节 pH, 4℃ 贮存。

➤ 20×MOPS 电泳缓冲液（适用于大于 20KD 的蛋白）配方

| 组分   | 用量         | 1X 终浓度或百分比 |
|--|------------|------------|
| MOPS（生工生物 A100670；MW：209.26）                       | 209.26g    | 50mM       |
| Tris（生工生物 A100826；MW：121.14）                       | 121.14g    | 50mM       |
| EDTA-2Na-2H <sub>2</sub> O（生工生物 A100105；MW：372.24） | 7.44g      | 1mM        |
| SDS（生工生物 A100127；MW：288.38）                        | 20g        | 0.1%       |
| ddH <sub>2</sub> O                                 | 定容至 1000ml |            |

pH7.7

➤ 配制方法(1000ml)

- ✓ 称取 MOPS 209.26g, Tris 121.14g, EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O 7.44g, SDS 20g, 加入 1000ml 烧杯中
- ✓ 加入 600ml 去离子水, 搅拌至完全溶解
- ✓ 倒入 1000ml 量筒中, 用去离子水定容至 1000ml, 不需调节 pH, 4℃ 贮存。

附录 2 各浓度分离胶及浓缩胶配方表 (1.5mm 厚凝胶)

|                      | 8%     |        |        |         |         | 12%   |       |        |
|----------------------|--------|--------|--------|---------|---------|-------|-------|--------|
| <b>分离胶</b>           | 1 块胶   | 2 块胶   | 4 块胶   | 6 块胶    | 8 块胶    | 1 块胶  | 2 块胶  | 4 块胶   |
| ddH <sub>2</sub> O   | 3.7ml  | 7.4ml  | 14.8ml | 22.2ml  | 29.6ml  | 2.7ml | 5.4ml | 10.8ml |
| 3.5×Bis-Tris<br>胶缓冲液 | 2.3ml  | 4.6ml  | 9.2ml  | 13.8ml  | 18.4ml  | 2.3ml | 4.6ml | 9.2ml  |
| 32% 丙 烯 酰<br>胺 储 液   | 2.0ml  | 4.0ml  | 8.0ml  | 12ml    | 16ml    | 3.0ml | 4.0ml | 8.0ml  |
| 10%APS               | 75ul   | 150ul  | 300ul  | 450ul   | 600ul   | 50ul  | 100ul | 200ul  |
| TEMED                | 5ul    | 10ul   | 20ul   | 30ul    | 40ul    | 3ul   | 6ul   | 12ul   |
| 总体积                  | 8ml    | 16ml   | 32ml   | 48ml    | 64ml    | 8ml   | 16ml  | 32ml   |
|                      |        |        |        |         |         |       |       |        |
| <b>浓缩胶</b>           | 1 块胶   | 2 块胶   | 4 块胶   | 6 块胶    | 8 块胶    |       |       |        |
| ddH <sub>2</sub> O   | 1.76ml | 3.52ml | 7.04ml | 10.56ml | 14.08ml |       |       |        |
| 3.5×Bis-Tris<br>胶缓冲液 | 0.86ml | 1.72ml | 3.44ml | 5.16ml  | 6.88ml  |       |       |        |
| 32% 丙 烯 酰<br>胺 储 液   | 0.38ml | 0.76ml | 1.52ml | 2.28ml  | 3.04ml  |       |       |        |
| 10%APS               | 20ul   | 40ul   | 80ul   | 120ul   | 160ul   |       |       |        |
| TEMED                | 4ul    | 8ul    | 16ul   | 24ul    | 32ul    |       |       |        |
| 总体积                  | 3ml    | 6ml    | 12ml   | 18ml    | 24ml    |       |       |        |

### 附录 3 样品缓冲液的配制 (4× LDS Loading Buffer, 10ml)

#### ➤ LDS 上样缓冲液配方 (4×)

| 组分  | 用量       | 1X 终浓度或百分比 |
|---|----------|------------|
| Tris HCl (Merck T3253; MW: 157.20)                    | 666mg    | 106mM      |
| Tris (生工生物 A100826 ; MW: 121.14)                      | 683mg    | 141mM      |
| LDS (生工生物 A600569; MW: 272.33)                        | 800mg    | 2% (m/v)   |
| EDTA-2Na-2H <sub>2</sub> O (生工生物 A100105; MW: 372.24) | 7.59mg   | 0.51mM     |
| 甘油 (生工生物 A100854; MW: 92.09)                          | 1mL      | 10% (m/v)  |
| 考马斯亮蓝 G250 (生工生物 A600038; MW: 854.04)                 | 7.52mg   | 0.22mM     |
| 酚红 (生工生物 A600420 ; MW: 354.38)                        | 2.48mg   | 0.175mM    |
| ddH <sub>2</sub> O                                    | 定容至 10ml |            |

#### ➤ 配制方法 (10ml)

- ✓ 称取 Tris HCl 0.666g, Tris 0.682g, LDS 0.800g, EDTA-2Na 0.006g, 甘油 4g
- ✓ 用 1ml 移液器加入 1%考马斯亮蓝 G250 0.75ml, 1%丽春红 S 0.25ml
- ✓ 补足去离子水至 10ml, 涡旋仪振荡混匀
- ✓ 分装于 1.5ml 离心管中, 1ml/管, 4℃ 存放, 保存 6 个月

#### 附: 样品的制备

| 试剂                             | 还原型样品         | 非还原型样品        |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| 样品                             | X ul          | X ul          |
| 4×LDS 上样缓冲液                    | 2.5ul         | 2.5ul         |
| 还原剂 10× (500mM DTT 或 25% β-ME) | 1ul           | —             |
| 去离子水                           | 与样品体积和为 6.5ul | 与样品体积和为 7.5ul |
| 总体积                            | 10ul          | 10ul          |

#### 参考资料

1. Bis-Tris Gel Recipes | Corson Lab | IU School of Medicine
2. U.S. Patent 6,162,338  
(<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=/netahtml/srchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=6,162,338.WKU.&OS=PN/6,162,338&RS=PN/6,162,338>)