

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

蛋白质 Tris-Glycine 电泳系统标准操作规程

1. 方案来源:

分子克隆实验指南 (第四版), 第十九章, 方案 8 蛋白质的 SDS-PAGE

*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

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 μ L、10 μ 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[®] system、Tanon[®] 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。

- ✓ 30%丙烯酰胺/亚甲基双丙烯酰胺混合液 (Acr-Bis)
- ✓ 1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)
- ✓ 1.0mol/L Tris-HCl (pH6.8)
- ✓ 10%十二烷基硫酸钠 (SDS)
- ✓ 10%过硫酸铵 (APS), 四甲基乙二胺 (TEMED)
- ✓ 电泳缓冲液 (Tris Glycine SDS Running Buffer, TGS)
- ✓ 上样缓冲液 (Laemmli Loading Buffer)
- ✓ 蒸馏水 (dH₂O), 超纯水 (ddH₂O) 或及超纯水 (UP)。

*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件 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 离心管中按顺序加入适量的蒸馏水，30% Acr-Bis，1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)，10%SDS，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 离心管中依次加入蒸馏水，30%Acr-Bis，1.0mol/L Tris-HCl (pH6.8)，10%SDS，摇匀。
- ◇ 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 Laemmli 5×loading buffer，则按样品：缓冲液=1：4（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

30%丙烯酰胺：N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 29.2：0.8 混合液（30%Acr-Bis）

➤ 配方：

组分	用量
Acrylamide（生工生物 A601032；MW：71.08）	29.2%
Bisacrylamide（生工生物 A100172；MW:154.17）	0.8%

➤ 配制方法（100mL）：

- ✓ 称取 Acr 29.2g、Bis 0.8g 于 100mL 烧杯中；
- ✓ 加超纯水（建议使用温水促进溶解）50mL，搅拌至溶解完全；
- ✓ 倒入 100mL 容量瓶，用蒸馏水定容至 100mL；
- ✓ 用中速滤纸过滤，置于 4 度保存。

*在储存过程中，光和碱性条件能够催化丙烯酰胺缓慢脱氨生产丙烯酸和双丙烯酸，储存前请检查核实溶液的 pH 为 7.0 或更小，并将溶液置于 4℃ 下避光储存。建议存储时间不超过两个月。若因试剂不纯或其他原因导致溶液中有不溶物，建议用滤纸过滤后再装瓶储藏。

丙烯酰胺的纯度对电泳有很大影响，建议用电泳级丙烯酰胺进行实验。

丙烯酰胺为无色晶体，溶于水可形成聚合物。丙烯酰胺单体通过自由基引发的反应聚合为长链，在 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的存在下，这些链彼此交联而形成凝胶。所形成的凝胶的孔径由聚合反应期间形成的链长度和交联程度决定。

1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8) 分离胶缓冲液

➤ 配制方法 (100mL):

- ✓ 称取 18.17g Tris 粉末, 倒入 100mL 烧杯中,
- ✓ 加入 80mL 蒸馏水, 搅拌至完全溶解,
- ✓ 用 6mol/L 盐酸调至 pH8.8,
- ✓ 倒入 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至 100mL, 4℃ 贮存。

1.0mol/L Tris-HCl (pH6.8) 浓缩胶缓冲液

➤ 配制方法 (100mL):

- ✓ 称取 12.11g Tris 粉末, 到入 100mL 烧杯中,
- ✓ 加入 80mL 蒸馏水, 搅拌至完全溶解,
- ✓ 用 6mol/L 盐酸调至 pH6.8,
- ✓ 倒入 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至 100mL, 4℃ 贮存。

Tris (hydroxymethyl) aminomethane; 三羟甲基氨基甲烷
(生工生物 A600194; MW: 121.14; CAS#77-86-1)

10%十二烷基硫酸钠 (SDS)

➤ 配制方法 (100mL) :

- ✓ 称取 10g SDS 晶体粉末，倒入 10 mL 离心管中；
- ✓ 加入 90mL 超纯水，涡旋振荡至溶解完全；
- ✓ 用超纯水定容至 100mL，室温保存。

*SDS 溶液在低温下易析出结晶，使用前需温浴至完全溶解，否则影响溶液浓度。

不建议一次性大量配制长期使用。

不同厂家甚至不同批次的 SDS 对电泳迁移有很大影响。建议选用同一厂家，并一次性订购大量 SDS 备用。

SDS (生工生物 A100227; MW: 288.38; CAS# 151-21-3)

SDS 为一种阴离子表面活性剂，能打断蛋白质的氢键和疏水键，并按一定的比例和蛋白质分子结合形成密度相同的短棒状复合物，不同分子量的蛋白质形成的复合物的长度不同，其长度与蛋白质分子量呈正相关，使蛋白质带负电荷的量远远超过其本身原有的电荷，掩盖了各种蛋白分子间天然的电荷差异。因此，各种蛋白质 SDS 复合物在电泳时的迁移率，不再受原有电荷和分子形状的影响，只与蛋白分子量成正相关。不同的氨基酸结合 SDS 量有差异，一般地，每克蛋白质结合 1.4g SDS。蛋白质结合 SDS 量受 SDS 有效浓度影响。

10%过硫酸铵 (APS)

➤ 配制方法 (10mL):

- ✓ 称取 1g 过硫酸铵至 1.5mL 离心管中，
- ✓ 加入 10mL 超纯水，振荡溶解后按 1mL 每管分装于 1.5mL 离心管中然后冻存于-20℃。

*固体过硫酸铵开封后易潮解失效，最好购买过硫酸铵小包装。过硫酸铵小包装开封后最好一次性配制，然后分装 0.5mL 每管于 1.5mL 离心管，可长期冻存于-20℃。

过硫酸铵 (生工生物 A100486; MW:228.2; CAS#7727-54-0)

电泳缓冲液 (10×Tris Glycine SDS Running Buffer, 10×TGS)**➤ 配方 (1000mL):**

组分	用量	终浓度
Tris (生工生物 A100826 ; MW: 121.14)	30.28g	250mM
Glycine (生工生物 A100167 ; MW:75.07)	144.13g	1.92M
SDS (生工生物 A100127 ; MW: 288.38)	10g	1%
ddH ₂ O	定容至 1000mL	

➤ 配制方法 (1000mL):

- ✓ 称取 Tris 30.28g, 甘氨酸 144.13g, 加入 1000mL 烧杯中;
- ✓ 加 800mL 蒸馏水, 搅拌使其充分溶解;
- ✓ 倒入 1000mL 试剂瓶中, 用蒸馏水定容至 1000mL 刻度线, 母液室温保存可一个月;
- ✓ 使用时按需求量倒取, 加蒸馏水十倍稀释至工作浓度 (1×)。

*母液配制好后建议检查 pH, 应处于 8.3 附近, 若差距较大 (>0.5), 应调整。但此问题的出现更应检查实验用水的 pH、试剂纯度和状况等。

附录 2 各浓度分离胶及浓缩胶配方表

Separation Gel	不同体积分离胶所需各成分的体积 (mL)					
6%	5	10	15	20	25	30
ddH ₂ O	2.65	5.30	7.95	10.60	13.25	15.90
30% Acr-Bis(29:1)	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00
1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)	1.25	2.50	3.75	5.00	6.25	7.50
10% SDS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
10% APS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.020	0.024
8%						
ddH ₂ O	2.32	4.64	6.96	9.28	11.60	13.92
30% Acr-Bis(29:1)	1.33	2.66	3.99	5.32	6.65	7.98
1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)	1.25	2.50	3.75	5.00	6.25	7.50
10% SDS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
10% APS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018
10%						
ddH ₂ O	1.98	3.96	5.94	7.92	9.90	11.88
30% Acr-Bis(29:1)	1.67	3.34	5.01	6.68	8.35	10.02
1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)	1.25	2.50	3.75	5.00	6.25	7.50
10% SDS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
10% APS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012
12%						
ddH ₂ O	1.65	3.30	4.95	6.60	8.25	9.90
30% Acr-Bis(29:1)	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00	12.00
1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)	1.25	2.50	3.75	5.00	6.25	7.50
10% SDS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
10% APS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012
15%						
ddH ₂ O	1.15	2.30	3.45	4.60	5.75	6.90
30% Acr-Bis(29:1)	2.50	5.00	7.50	10.00	12.50	15.00
1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)	1.25	2.50	3.75	5.00	6.25	7.50
10% SDS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
10% APS	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012
Loading Gel	不同体积浓缩胶所需各成分的体积 (mL)					
5%	1	2	3	4	5	6
ddH ₂ O	0.68	1.36	2.04	2.72	3.40	4.08
30% Acr-Bis(29:1)	0.17	0.34	0.51	0.68	0.85	1.02
1.0mol/L Tris-HCl (pH6.8)	0.125	0.250	0.375	0.500	0.625	0.750
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
10% APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006

附录 3 样品缓冲液的配制 (Laemmli 5X buffer / loading buffer)

➤ 非还原样品缓冲液配方 (5×)

组分	用量	1X 终浓度或百分比
Tris-HCl (pH6.8), 1mol/L	25mL	50mM
甘油 (生工生物 A100854; MW: 92.09)	50mL	10% (v/v)
SDS (生工生物 A100127 ; MW: 288.38)	10g	2% (m/v)
溴酚蓝 (生工生物 A00449; MW: 669.96)	10mg	0.02% (m/v)
ddH ₂ O	定容至 100ml	

➤ 配制方法 (100mL) :

- ✓ 称取 SDS 10g, 溴酚蓝 10mg;
- ✓ 加入 1 mol/L Tris-HCl (pH6.8) 25mL, 搅拌溶解;
- ✓ 最后加入甘油 50mL, 混匀;
- ✓ 转入 100mL 容量瓶, 用超纯水定容至 100mL;
- ✓ 分装于 1.5mL 离心管中, -20℃ 贮存

➤ 还原样品缓冲液配方 (5×): 非还原样品缓冲液+ 500mM DTT

DTT (生工生物, A100281, MW: 154.25), 可配制成 1M 储液。

➤ 配制方法 (1mL) :

- ✓ 称取 DTT 154mg, 加入 ddH₂O 至 1mL。 -20℃ 贮存

*通常样品中都会添加还原剂, 如 β-巯基乙醇 (2-5%, v/v) 或二硫苏糖醇 (DTT, 50-100mM), 在表面活性剂 (SDS) 存在的条件下, 可以打开折叠蛋白质的二硫键。一般在使用前加入。考虑到 β-巯基乙醇有强烈刺激性气味, 本实验操作规程使用 DTT 作为还原剂。终浓度是指上样缓冲液添加到样品中后, 1X 样品和缓冲液混合物中组分浓度。5X 缓冲液可保存在室温, 使用时添加 DTT。

参考文献

1. M. R. 格林, J. 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南 (第四版), 第十九章, 方案 8 蛋白质的 SDS-PAGE.
2. Laemmli U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 1970, 227(7): 680-685.
3. Davis B. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann NY Acad Sci, 1964, 121: 404-427.
4. Ornstein L. Disc Electrophoresis-I Background and Theory. Ann N Y Acad Sci. 1964,



121:321-349.