蛋白质 SDS-PAGE Tris-Tricine 电泳系统
标准操作规程

方案参考：Schägger, H. Tricine–SDS-PAGE. Nat Protoc 1, 16–22 (2006)

*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：

✓ 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 1mm spacer plate 和 薄板 short plate）及塑料框架，微量移液器和配套吸头（1mL、200μL、10μL），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），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。

试剂准备（见附录）

- 乙二醇（电泳级）
- 40% 丙烯酰胺：*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺（29:1）(40% Acr-Bis)浓缩胶
- 40% 丙烯酰胺：*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺（19:1）(40% Acr-Bis)分离胶
- 10% APS
- TEMED
- 4×多肽电泳凝胶缓冲液（3M Tris-HCl ；0.4% SDS，pH 8.45）
- 10×Tris-tricine-SDS 电泳缓冲液 (使用之前稀释到 1×浓度)

18% Tris-Tricine凝胶配方 2021.10

分离胶	不同体积分离胶所需各成分的体积（mL）						
T=18% C=5%	5	8	10	16	25	32	48
乙二醇	1.50	2.40	3.00	4.80	7.50	9.60	14.40
40%Acr-Bis(19:1）	2.25	3.60	4.50	7.20	11.25	14.40	21.60
凝胶缓冲液	1.25	2.00	2.50	4.00	6.25	8.00	12.00
10%APS	0.038	0.060	0.075	0.120	0.188	0.240	0.360
TEMED	0.004	0.006	0.008	0.012	0.019	0.024	0.036

浓缩胶	不同体积浓缩胶所需各成分的体积（mL）						
T=5% C=3.3%	1	2	3	4	5	6	8
ddH_2O	0.612	1.22	1.83	2.45	3.06	3.67	4.89
40%Acr-Bis(29:1)	0.125	0.25	0.38	0.50	0.63	0.75	1.00
凝胶缓冲液	0.250	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	2.00
10%APS	0.013	0.025	0.038	0.050	0.063	0.075	0.100
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008

40%Acr-Bis(19:1）	
	用量
丙稀酰胺	38g
甲叉双丙稀酰胺	2g
ddH_2O	定容至100mL

4×凝胶缓冲液	
	用量
Tris	182g（3M）
SDS	2g（0.4%）
盐酸	1mol/L调节pH至8.45
ddH_2O	定容至500mL

40%Acr-Bis(29:1)	
	用量
丙稀酰胺	38.67g
甲叉双丙稀酰胺	1.33g
ddH_2O	定容至100mL

10×电泳缓冲液	
组分	用量
Tris	121.14g
Tricine	179.2g
SDS	10g
ddH_2O	up to 1000mL

聚丙烯酰胺凝胶的配制（18%T，5%C/6mL 分离胶;5%T/，3.3%C/4mL 浓缩胶）：

➢ **凝胶模具准备**

✧ 根据实验需求选择不同厚度电泳玻璃片,建议选用较薄的玻璃板，有利于小分子蛋白电泳观察、转膜（如 1mm，0.75mm 玻璃板）。

✧ 用 75%酒精擦拭玻璃片，再用蒸馏水冲洗，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。

➢ **配制分离胶**

按表 1 将不同体积成分均匀混合，可使用 1mL 移液器沿着玻璃板壁将分离胶溶液缓缓注入模具，凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5 cm 或距梳齿约 0.5 cm 即可。

✧ 在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1cm 的蒸馏水，使液面平整，隔绝空气。

✧ 静止 30~60 min，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。

✧ 配制浓缩胶，按表 2 将不同体积成分均匀混合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 30~60 min。

✧ 待胶凝固后，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。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）。

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 10~15 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 2×Tricine 蛋白加样缓冲液（见附录），按样品：缓冲液=1：1（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；
- ✓ 将电压调至恒压 150V，起始电流 45-55 mA，结束电流 10-15 mA，电泳 2~3h；观察到前端的溴酚蓝指示带至分离胶下沿位置即可停止电泳。

*如有条件，可使用专用的凝胶上样吸头或微型注射器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。

➢ **染色**

使用摇匀的 9-FastBlue 蛋白染色液（Cat：RTD6202-02），将电泳完的 PAGE 胶取出放入塑料容器，加入染色液，刚好浸没胶面，静置 1~2min。随后常温摇床 10~15min，观察结果。

附录 聚丙烯酰胺凝胶电泳相关溶液的配制

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 双蒸水，振荡溶解后按 1mL 每管分装于 1.5mL 离心管中然后冻存于-20℃。

*固体过硫酸铵放置时间过长会潮解失效，最好购买过硫酸铵小包装或购买后分装使用，密封储存与干燥处或-20℃冻存。过硫酸铵小包装可以一次性配制，然后分装 1mL 每管于 1.5mL 离心管然后冻存于-20℃。过硫酸铵（生工生物 A100486；MW:228.2；CAS#7727-54-0）

40%PAA 分离胶缓冲液(19:1)

	用量
丙稀酰胺	38g
甲叉双丙稀酰胺	2g
ddH_2O	定容至 100mL

配制后 4℃避光储存

40%PAA 浓缩胶缓冲液(29:1)

	用量
丙稀酰胺	38.67g
甲叉双丙稀酰胺	1.33g
ddH_2O	定容至 100mL

配制后 4℃避光储存

4×多肽电泳凝胶缓冲液

	用量
Tris	182g
SDS	2.0g（20mL 10%SDS）
盐酸	1mol/L 调节 pH8.45
ddH_2O	定容至 500mL

配制后 4℃储存

在分离胶中使用 SDS 的缺点之一系统是多余的 SDS 作为一个大前沿在分离的低分子量末端。较小多肽不会从这个前沿分离。更换 Laemmli 运行缓冲液中的甘氨酸为 Tricine，可将 SDS-多肽与 SDS 带分开，使它形成在前导离子前沿的后面。蛋白质在 Tricine 凝胶中的分辨率小至 1－5kD。

10×Tricine-Tris-SDS 缓冲液配制（500mL）：

将 10×Tricine-Tris-SDS 缓冲液按照下表配方配制，即配成 500mL 10×TTS 缓冲液，4℃储存，取 50mL 10×Tricine-Tris-SDS 缓冲液加入 450mL 超纯水，即配制成 1×TTS 缓冲液用于电泳。

➢ **10×Tricine-Tris-SDS 缓冲液配方**（1000 mL）（Cat No：CB010P）

	终浓度	用量
Tris	1M	121.14g
Tricine	1M	179.2g
SDS	1%	10g
ddH_2O		定容至 1000mL

1.0mol/L Tris-HCl（pH6.8）蛋白样品缓冲液（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 1mol/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。

2×Tricine 蛋白样品加样缓冲液（10 mL）（Cat No：TP050）

	终浓度	用量
Tris-HCl（1M pH 6.8）	100mM	1mL
Glycerol	24%	2.4mL
SDS	8%	0.8g
DTT	0.2M	0.31g
考马斯亮蓝 G-250	0.02%	2mg
ddH$_2$O		定容至 10mL

染色液

	用量
冰醋酸	100 mL
甲醇	450 mL
考马斯亮蓝 G-250	0.25 g
ddH$_2$O	定容至 500mL

脱色液

	用量
冰醋酸	100 mL
ddH$_2$O	定容至 1000 mL

参考文献

1、Schägger, H. Tricine – SDS-PAGE. Nat Protoc 1, 16 – 22 (2006)

2、曹佐武. 有效分离 1kDa 小肽的 Tricine-SDS-PAGE 方法[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 74-76