

## Tricine-SDS-PAGE 制胶及电泳试剂盒（通用型 SK6012）使用说明书

储存条件：参照产品组成储存条件，保质期1年。

产品内容：

	Components	SK6012-20 T	SK6012-50 T	储存温度
A 盒	AB-3 (49.5% T, 3% C)	SL10901-30 mL	SL10901-75 mL	2-8°C
	AB-6 (49.5% T, 6% C)	SL10902-100 mL	SL10902-125 mL×2	2-8°C
	2× Tricine 多肽上样缓冲液	SL1303-1 mL×4	SL1303-1 mL×10	-20 °C
B 盒	3×凝胶缓冲液	SL1163-80 mL×2	SL1163-100 mL×4	RT
	10×阴极缓冲液	SL1323-100 mL×2	SL1323-125 mL×4	
	10×阳极缓冲液	SL1322-100 mL×2	SL1322-125 mL×4	
	甘油	40 mL	100 mL	
	10% APS (干粉)	SL1130-1 mL×2	SL1130-1 mL×5	
	TEMED	1 mL	2 mL	
说明书		1 份		

**注意：**过硫酸铵（APS）为结晶性粉末，2-8 °C储存，使用前每支加入 1 mL 蒸馏水即为 10% APS 溶液，现配现用最佳，溶液用后-20 °C可储存 2 个月。APS 如出现严重结块，即已变质。

产品说明：

Tricine-SDS-聚丙烯酰胺制胶及电泳试剂盒（Tricine-SDS-PAGE）是目前电泳法变性分离多肽的主要方法，适用于低分子量蛋白（2.5-40 kD）蛋白的分离。此试剂盒可以制备 20 或 50 块 0.75 mm× 14 cm×14 cm 胶。对于大于 5 kD 的蛋白，无需制备隔离胶，双层胶足以分离。对于小于 5 kDa 的蛋白，需要制备 3 层胶才能较好的分离。推荐使用 4%浓缩胶，10%隔离胶，16%分离胶作为标准浓度，可以分辨出 1-5 kD 的片段。Tricine-SDS-PAGE 系统不同于常规的 SDS-PAGE，使用两种缓冲液电泳，电泳槽内槽是 1×阴极缓冲液，含有 Tricine 和 SDS。外槽是 1×阳极缓冲液，为 0.2M Tris。

操作步骤：（以足够灌两块 0.75 mm× 14 cm×14 cm 胶为例）

## 一、制胶

1. 标记 3 个 50 mL 三角瓶，按下表用量配制分离胶 30 mL、隔离胶 9 mL 和浓缩胶 9 mL。混匀后真空脱气 10-15 分钟。

成分	16%分离胶	10%隔离胶	4%浓缩胶
AB 溶液	10.0 mL (AB-6)	1.8 mL (AB-3)	0.75 mL (AB-3)
3×凝胶缓冲液	10.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
甘油	3.0 mL	0.9 mL	-
去离子水	7 mL	3.3 mL	5.25 mL
总体积	30 mL	9 mL	9 mL

2. 在分离胶瓶中加入 10% APS 150  $\mu$ L 溶液和 TEMED 30  $\mu$ L，轻旋混匀。

3. 灌分离胶。用巴斯德吸管，将分离胶溶液沿着隔条边缘缓缓注入，直至距玻璃上沿约 5 cm。由于分离胶比重比隔离胶大，故可在其凝固前直接灌隔离胶。

4. 在隔离胶瓶中加入 10% 的 APS 溶液 75  $\mu$ L 和 TEMED 15  $\mu$ L，轻轻旋转混匀。

5. 灌隔离胶。用巴斯德吸管，将隔离胶溶液沿着隔条边缘缓缓注入，直至距玻璃板上沿约 3 cm。

6. 加入 1 cm 高的水饱和异丁醇封胶。室温放置 30-45 分钟。（氧气会抑制胶凝固；水饱和异丁醇可用水代替，但效果会差一些）。

7. 在浓缩胶瓶中加入 10% APS 溶液 75  $\mu$ L 和 TEMED 15  $\mu$ L，轻轻旋转混匀。

8. 灌浓缩胶。用巴斯德吸管，将浓缩胶沿着隔条边缘缓缓注入，直至距玻璃板上沿约 1 cm。

9. 插入 0.75 mm 厚梳子，补加浓缩胶溶液填满梳子间的空隙，通过抽真空或者吸水滤纸去除气泡。静置 30-45 分钟确认凝胶后小心拔出梳子。

## 二、加入电泳缓冲液

1. 在上层缓冲液槽中加入 1× 阴极缓冲液，并用 1× 阴极缓冲液冲洗加样孔。

**注：**10× Tricine-SDS-PAGE 阴极缓冲液用去离子水 1:9 稀释成 1×阴极缓冲液。

2. 在下层缓冲液槽中加入 1× 阳极缓冲液。

**注：**10×Tricine-SDS-PAGE 阳极缓冲液用去离子水 1:9 稀释成 1× 阳极缓冲液。

### 三、上样

1. 处理样品。如样品是蛋白沉淀物，则加入 50-100  $\mu\text{L}$  新配的 1×**上样缓冲液**溶解。如果样品是蛋白稀溶液，则需先浓缩蛋白，再与 2× Tricine 多肽上样液按 1: 1 混合。

2. 100 °C煮沸 3-5 分钟灭活蛋白酶；膜蛋白则需 37°C孵育 15-60 min。

**注意：**与**上样缓冲液**混合后的样品如未经灭活蛋白酶，切勿室温放置。

3. 上样。如需考染，复杂蛋白样品建议上样量 20  $\mu\text{L}$ （含 25-50  $\mu\text{g}$  总蛋白）；含一种或几种蛋白的样品，建议上样量 1-10  $\mu\text{L}$ 。如需银染，上样量可相应减少 10-100 倍。

### 四、电泳

1. 电泳。首先 30 V 恒压电泳 1 h， 然后 150 V 恒压电泳 4-5 h。

**注：**上样液以考马斯亮蓝 G-250 为指示剂，其迁移速度要快于最小的肽。

2. 终止电泳，取出凝胶进行后续的实验（建议银染染色，节约样品）。

**注意：**考染或银染时，尽可能采用快速染色方法，否则多肽有可能会扩散出 PAGE 胶而降低检测的灵敏度。