

非变性PAGE凝胶制备及电泳试剂盒（常规蛋白SK6011） 使用说明书

储存条件：参照产品组成储存条件，保质期1年。

产品组成：

Components	SK6011-50T	保存条件
30% Acr-Bis (29:1)	100 mL	2-8 °C
4×分离胶缓冲液 (pH 8.8)	100 mL	RT
4×浓缩胶缓冲液 (pH 6.8)	50 mL	RT
APS (过硫酸铵)	0.1 g×5	RT
TEMED	1 mL	RT & 避光
5×非变性非还原上样液	1 mL	-20 °C
5×tris-甘氨酸电泳缓冲液 (干粉)	1 L	RT
说明书	1 份	

注意：

1. 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。
2. 将5×tris-甘氨酸电泳缓冲液（干粉）加入到900mL的蒸馏水中，搅拌溶解之后，定容到1L，即得5×电泳液，常温可保存半年。使用前用蒸馏水稀释到1×。

产品简介：

本试剂盒提供非变性 PAGE 凝胶制备以及电泳全套试剂。可以根据需求配制各种浓度的非变性分离胶，同时提供 4×非变性蛋白上样液（需-20°C保存）和 5×非变性电泳缓冲液用以满足不同分子量的酸性蛋白电泳实验，无需再准备试剂，使用方便，经济实惠。如需小量制备多种浓度变性分离胶请选购 SK6010 产品。

操作步骤：（以 0.75mm 厚 mini 胶为例）

一、灌制分离胶

1. 参照凝胶模具说明书，装配好模具。
2. 取相应体积的 30% Acr-Bis (29:1)、分离胶缓冲液和双蒸水（参照表 1）在小烧杯或试管中混合。

3. 加入 10% APS 溶液和 TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。
4. 注入模具（留少许以判断凝胶状态），避免产生气泡，凝胶混合液加至距前玻璃板顶端约 1.5 cm 或距梳齿 0.5 cm，轻轻加入 1 mL 水覆盖封胶，使分离胶表面保持平整。
5. 静置 30-60 分钟，待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面后，表面凝胶已聚合。

二、灌制浓缩胶

1. 倒掉覆盖在分离胶上的水层。
2. 将相应体积的 30% Acr-Bis (29:1)、浓缩胶缓冲液和双蒸水（参照表 2）在一个小烧杯或试管中混合。
3. 加入 10% APS 和 TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。
4. 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面（留少许以判断凝胶状态，避免产生气泡，直至前玻璃板的顶端。
5. 将梳子插入凝胶内，避免产生气泡。
6. 静置 30-60 分钟，待凝胶聚合后，小心地拔出梳子，避免破坏加样孔。
7. 进行常规电泳操作。使用 Tris 甘氨酸电泳液建议电泳条件：初始电压 80V，约 30 分钟，样品进入分离胶后，电压调至 120V，约 1 小时，样品抵达凝胶底部停止电泳。

注意事项：

1. APS 溶液常温不稳定，取用后立即放回-20 °C冰箱；若发现凝胶时间延长，应更换 APS 溶液。
2. PAGE 凝胶的凝聚速度与温度以及 APS、TEMED 的用量密切相关；可通过增加 50%-100% 的 APS 及 TEMED 的用量，加快 PAGE 凝胶的聚合速度，但凝胶聚合过快不利于操作。
3. 在凝胶配制过程中，尤其是液体混匀步骤，应尽量避免气泡的产生。
4. 在分离胶上层加蒸馏水时要小心操作，加水时速度不能太快。
5. 丙烯酰胺具有神经毒性，操作时请穿戴实验服和一次性手套。

附表 1. 配制 5 mL SDS-PAGE 分离胶（组份体积单位 mL）：

胶浓度	双蒸水	30% Acr-Bis (29:1)	分离胶缓冲液 (4×)	10%APS	TEMED
6%	2.75	1.0	1.25	0.05	0.004

8%	2.42	1.33	1.25	0.05	0.003
10%	2.08	1.67	1.25	0.05	0.002
12%	1.75	2.0	1.25	0.05	0.002
15%	1.25	2.5	1.25	0.05	0.002

附表2. 配制2 mL SDS-PAGE浓缩胶（组份体积单位mL）：

胶浓度	双蒸水	30%Acr-Bis(29:1)	浓缩胶缓冲液（4×）	10%APS	TEMED
5%	1.14	0.34	0.5	0.02	0.002

附表 3. SDS-PAGE 分离胶的浓度与最佳分离范围：

SDS-PAGE 分离胶浓度	分离范围
6%	50-150 kD
8%	30-90 kD
10%	20-80 kD
12%	12-60 kD
15%	10-40 kD

附表 4.常见问题与解决建议：

常见问题	建议
成胶速度慢或不成胶	增加 50-100%的 APS 用量，还不成胶需更换 APS。
浓缩胶与分离胶界面不齐	注入分离胶后需封胶，或检查模具是否漏液。
条带拖尾或有竖纹	蛋白样品需离心去除不溶物或透析除盐。
条带呈笑脸型	延长凝胶时间或适当降低电泳电压。
条带横向扩散	减少上样量。