

Tricine-SDS-PAGE 电泳试剂说明书（通用型）

产品内容：

Components	SK6012-20T	SK6012-50T
AB-3（49.5% T, 3% C）	SL10901-30ml	SL10901-75ml
AB-6（49.5% T, 6% C）	SL10902-100ml	SL10902-250ml
3×Tricine-SDS-PAGE 凝胶缓冲液	SL1163-80ml×2	SL1163-100ml×4
10×Tricine-SDS-PAGE 阴极缓冲液	SL1323-100ml×2	SL1323-125ml×4
10×Tricine-SDS-PAGE 阳极缓冲液	SL1322-100mL×2	SL1322-125ml×4
2×Tricine 多肽上样缓冲液	SL1303-4×1ml	SL1303-10×1ml
甘油	40mL	100mL
10% APS	SL1130-1ml×5	SL1130-1ml×5
TEMED	1mL	2mL
说明书	1 份	1 份

产品说明：

Tricine-SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)是目前电泳法变性分离多肽的主要方法。此试剂可以制备 20/50 块 0.75 mm× 14 cm×14 cm 胶。

对于大于 5 kDa 的片段，无需制备隔离胶，并且用 AB-3 足以分离。对于小于 5 kDa 的片段，需要制备隔离胶，并且用 AB-6 制备分离胶。

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 kDa 的片段。

使用方法：

推荐在分离多肽时使用由 4% 浓缩胶、10% 隔离胶和 16% 分离胶从上到下组成的三层 Tricine-SDS-PAGE 胶，下面为配制该胶的流程。

1. 配制 30 mL 16%分离胶和 9 mL 10%隔离胶（足够灌两块 0.75 mm× 14 cm×14 cm 胶）。

A) 标记 2 个 50 mL 的三角瓶，按下表的用量加入各成分：

成分	分离胶	隔离胶
AB	AB-6 (10.0 mL)	AB-3(1.8 mL)
3×Tricine-SDS-PAGE 凝胶缓冲液	10.0 mL	3.0 mL
甘油	3.0 mL	0.9 mL
去离子水	6.2 mL	3.3 mL
总体积	30 mL	9 mL

B) 混匀后真空脱气 10-15 分钟。

C) 在分离胶瓶中加入 150 uL 10%的 APS 溶液和 30 uL TEMED 溶液， 轻轻旋转混匀。

D) 灌胶。用一根巴斯德吸管，将分离胶溶液沿着一个隔条的边缘加到玻璃板夹层中，直到溶液的高度距离玻璃上沿还有 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。

E) 在隔离胶瓶中加入 75 uL 10%的 APS 溶液和 15 uL TEMED 溶液， 轻轻旋转混匀。

F) 灌胶。用巴斯德吸管，将积层胶溶液缓缓地沿着一侧隔条边缘加入到玻璃平板夹层中，直到溶液离玻璃板顶部约 3 cm 高为止。

G) 盖 1cm 高的水饱和的异丁醇使胶面跟氧气隔绝（氧气会抑制胶的凝固；此处水饱和的异丁醇可用水代替，但效果会差一些）。

H) 让分离胶和隔离胶在室温聚合 30-45 分钟。

2. 配制 9 mL 4%浓缩胶（足够灌两块 0.75 mm×14 cm×14 cm 胶）。

A) 在一个 50 mL 的三角瓶中，先按下表的用量加入各成分：

成份	用量
AB-3 (49.5% T, 3% C)	0.75 mL
3×Tricine-SDS-PAGE 凝胶缓冲液	3.0 mL
补去离子水到 9 mL	需加 5.25 mL

B) 混匀后真空脱气 10-15 min。

C) 将 75 uL 新鲜配制的 10%的过硫酸铵溶液和 15 uL TEMED 溶液加 入到溶液中，轻轻旋转混匀。

D) 灌胶。用巴斯德吸管，将积层胶溶液缓缓地沿着一侧隔条边缘加入到 玻璃平板夹层中，直到夹层中的溶液离玻璃板顶部约 1 cm 高为止。

E) 插入 0.75 mm 厚的塑料梳子，再补加浓缩胶溶液填满梳子间的空隙。 注意避免产生气泡。

F) 让浓缩胶在室温聚合 30-45 分钟。

3. 小心拔出塑料梳子，在上层缓冲槽中加入 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。

4. 在电泳装置的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×阴极缓冲液。

5. 在密封的螺盖微量离心管中，用 2×Tricine 多肽上样缓冲液按 1: 1 的比例稀释蛋白样品，于 100℃ 煮沸 3-5 分钟。

注意：如果样品是蛋白沉淀物，则加入 50-100 uL 新配的 1×Tricine-SDS-PAGE 上样缓冲液溶解；如果样品是蛋白稀溶液，可先浓缩蛋白质。与 Tricine-SDS-PAGE 上样缓冲液混合后的样品如未经 100℃ 加热灭活蛋白酶，切勿放于室温。如果是膜蛋白，请 37℃ 保温 15-60min。

6. 上样。如果用考马斯亮蓝染色，对于成分复杂的蛋白质样品，上样量最好为 20 uL (含 25-50 ug 总蛋白质)；对于只有一种或几种蛋白质的样品，上样量最好为 1-10 uL。如果用银染，上样量可减少 10-100 倍。

7. 电泳。先 30 V 恒压电泳 1 h (对 0.75mm×14cm×14cm 的胶而言)，然后 150 V 恒压电泳 4-5 h。

注：本产品的 Tricine-SDS-PAGE 上样液 使用了考马斯亮蓝 G-250 作为指示剂，其泳动速度比最小的肽还快。

8. 终止电泳，取出凝胶进行后续的实验处理 (最好用银染染色，节约样品)。

注意：考染或银染时，基本步骤同蛋白电泳，但任何一步 (尤其是固定步骤) 的处理时间都不要超过 20 分钟，否则多肽非常容易扩散出 PAGE 胶而降低检测的灵敏度。