天净沙系列

CAT#:27-C9000-71-9-calpain

低温运输，4℃保存

天净沙

酪蛋白法钙蛋白酶电泳胶酶谱试剂盒

Casein Method for Calpain Electrophoresis Gel Zymography Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品为酪蛋白法钙蛋白酶（Calpain，EC3.4.22.52）酶谱试剂盒，它具有以下特点：

1. 本产品即开即用操作简单便捷，客户无需从头开始设计实验。
2. 提供酪蛋白法钙蛋白酶阳性对照，便于在遇到问题时分析原因
3. 经过改良能够检测生物样品中的蛋白酶抑制剂。
4. 染色和脱色过程会呈现出蓝色的蛋白酶抑制剂条带，与白色背景形成对比。
5. 本产品可以至少进行 30 次电泳胶原位显示反应。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分，编号 240117pt1 使用大扁盒包装，常温运输及保存

成份	编号	规格	包装
丙烯酰胺干粉	100864	60 g	250 mL 棕塑瓶
甲叉双丙烯酰胺干粉	100877	3 g	5 mL 本色瓶
TEMED	CAS:110-18-9	1.5 mL	1.5 mL 棕色管
过硫酸铵干粉	CAS:7727-54-0	1 g	1.5 mL 本色盖
4×中 pH 浓缩胶配胶液 pH 5.5	240117a	100 mL	150 mL 本色瓶
4×中 pH 分离胶配胶液 pH 7.5	240117b	200 mL	250 mL 本色瓶
中 pH 电泳液 pH 7.0，干粉 A	240117c	55.2g	250 mL 本色瓶
中 pH 电泳液 pH 7.0，干粉 B	240117d	10g	250 mL 本色瓶

本产品第二部分，编号 240117pt2 使用带 logo 热封袋包装，低温运输，-20℃保存

成份	编号	规格	包装
5×中 pH 上样液	240117e	1 mL	1.5 mL 本色盖

本产品第三部分，编号 27-C9000-71-9-calpain pt3 使用大扁盒包装，

低温运输，4℃保存

成分	编号	规格	包装
酪蛋白法钙蛋白酶孵育液	27-C9000-71-9-calpain g	250 mL	250 mL 本色瓶
酪蛋白法钙蛋白酶干粉	28-C9000-71-9-calpain	5 T	0.5 mL 红盖管
通用酶储存液	7-251207	0.5 mL	0.5 mL 本色管
酪蛋白法钙蛋白酶染色液	27-C9000-71-9-calpain j	250 mL	250 mL 本色瓶
酪蛋白法钙蛋白酶底物	27-C9000-71-9-	30 T	30 mL 本色瓶

		calpain e		
使用手册	27-C9000-71-9-calpain sc	1 份	无	

运输及保存

低温运输，4℃保存，有效期一年。

自备物品

凝胶模具，底物，蒸馏水，无水乙醇，凝胶观察透射灯。

使用流程

一：配制阳性对照、底物液及分离胶

1. 酪蛋白法钙蛋白酶阳性对照：将 100 μL 试剂盒提供的通用酶储存液加入到装有酪蛋白法钙蛋白酶干粉的管中，轻柔颠倒 20 次混匀，得酪蛋白法钙蛋白酶阳性对照。注意：本试剂盒提供的阳性对照只够 5 次使用，故建议只在首次实验和在遇到问题需要分析原因时才使用。
2. 酪蛋白法钙蛋白酶底物液：将 30 mL 自备蒸馏水加入到装有酪蛋白法钙蛋白酶底物的瓶中，颠倒摇晃 20 次，得 30 mL 酪蛋白法钙蛋白酶底物液。确定浓度。对分子量在 100 kDa 以上的蛋白质，可选用 3-5%的胶；对分子量在 20-150 kDa 之间的蛋白质，可选用 5-10%的胶；对分子量在 10-80 kDa 之间的蛋白质，可选用 10-15%的胶。对未知样品，建议使用 7.5%的胶。
3. 配制 10%的 APS（过硫酸铵）：按每 0.1 g 过硫酸铵干粉加 1 mL 去离子水的比例配制 10%的 APS 溶液，该溶液可以在 4℃存放一周。
4. 配制 30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺（19：1）溶液:在本产品提供的装有 60 g 丙烯酰胺干粉的塑料瓶中加入 146 mL 自备的去离子水和 3 g 甲叉双丙烯酰胺,充分摇晃直到溶解（约需 10-20 分钟）即得 200 mL 30%丙烯酰胺（19：1）溶液。此溶液最好在一个月内用完，必须 4℃避光保存。
5. 配 10 mL 分离胶(如果配制其他体积,请按比例调节各成分用量)：在一个 25 mL 的三角瓶中，先加入 3.2 mL 去离子水、3.3 mL 30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺（19：1）溶液和 2.5 mL 4×分离胶配胶液。需额外添加 1 mL 酪蛋白法钙蛋白酶底物液，混匀后使用。
6. 摇晃混匀后抽真空 10-15 分钟以去除溶液中的氧气（氧气能抑制丙烯酰胺聚合反应，不去除的话将影响丙烯酰胺聚合反应）。
7. 加入 50 μL 新配制的 10%APS 和 10 μL TEMED（这是配制 10 mL 胶的用量，配制更大体积的胶则按比例增加），迅速摇匀后倒胶。
8. 在胶面距离顶部 1-1.5 cm 的时候停止灌胶。然后覆盖一层 1-5 mm 厚的水，使胶顶部液面平整。由于比重不同，水和丙烯酰胺溶液不会混合。

9. 室温聚合 30-60 分钟后，用 1×分离胶配胶液洗涤凝固的胶的顶部，待用。

二：配制浓缩胶（浓缩胶可以提高分辨率，适合于成分复杂的样品，一般使用浓度为 4%。使用浓缩胶时蛋白质泳动速度主要跟其尺寸和形状相关。因浓缩胶 pH 跟分离胶 pH 不同，蛋白质可能会发生聚合和沉淀。对成分单一的样品，可以不用浓缩胶，此时蛋白的泳动速度主要跟其电荷密度，尺寸和形状相关。

10. 配 10 mL 浓缩胶（如果配制其他体积,请按比例调节各成分用量）：在一个 25 mL 的三角瓶中，先加入 6.2 mL 去离子水、1.3 mL 30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺（19：1）溶液和 2.5 mL 4×浓缩配胶液。
11. 摇晃混匀后抽真空 10-15 分钟以去除溶液中的氧气（氧气能抑制丙烯酰胺聚合反应，不去除将影响丙烯酰胺聚合反应）。
12. 按上表用量加入 50 μL 10%APS 和 15 μL TEMED（这是配制 10 mL 胶的用量，配制更大体积的胶则用量需按比例增加），迅速摇匀后在已经凝固的分离胶上倒胶。
13. 在液面达到顶部时停止灌胶，插入梳子。
14. 室温聚合 30-60 分钟，拔出梳子，用 1×电泳液冲洗加样孔。

三：电泳

15. 将凝胶板固定在电泳装置上，往上槽和下槽加入足够 1×电泳液。注：本产品提供 10 升电泳液，用前需将所有干粉溶解在 1L 水中得 10×电泳液，可以室温放置，用时再稀释成 1×电泳液。一般不需要再调节 pH，但保险起见，可以用 pH 试纸测试一下 1×电泳液。对中 pH 电泳液，其干粉只能配 1×电泳液，否则不溶解。配制时称取中 pH 电泳液（pH 7.0）干粉 A 5.52 g，中 pH 电泳液（pH 7.0）干粉 B 1 g 混匀，加去离子水至彻底溶解，调 pH 到 7.0，定容至 1L。客户根据可实际需要量按比例增减。
16. 连接电极。如果浓缩胶和分离胶的 pH 高于靶蛋白 pI，靶蛋白将带负电荷并向阳极移动，可以按标准的 SDS-PAGE 方法接通电极（上阴极下阳极）；如果浓缩胶和分离胶 pH 低于靶蛋白 pI，靶蛋白将带正电荷并向阴级移动，此时应该下阴极上阳极。
17. 300V 预电泳直到电流不再降低（约需要 30 分钟）以去除残留过硫酸铵。
18. 换电泳液。
19. 在液体蛋白质样品或者酪蛋白法钙蛋白酶阳性对照（只够五次，故非每次必做）中加入 5×上样液（16 μL 液体样品加 4 μL 上样液）后上样。0.75 mm 厚的胶可以上 10 μL，1.5 mm 厚的胶可以上 20 μL。在未用加样孔中也要加 1×上样

	液以防有样品的空道的样品扩散。样品如果是蛋白质沉淀，可用 1×上样液直接溶解蛋白质沉淀后再上样。蛋白质溶液或沉淀中不能含有能够改变上样液 pH 的残留成分（如蛋白质沉淀剂 TCA），用前最好用 pH 试纸测试一下，不在上样液的 pH 范围时就用酸或碱调到正常范围。大量样品可用透析法调 pH。 20. 用 15 mA（对 0.75 mm 厚的胶）或 30 mM（对 1.5 mm 厚的胶）的电流电泳直到染料移动到分离胶底部。微型胶一般需要 1-2 小时。**注意：电泳过程最好在冷室或有冷却系统，以免电泳产热使蛋白质变性。** 21. 终止电泳，取出凝胶进行后续的实验处理（如染色或酶活性检测）。 **四、结果观察** 22. 取出凝胶，放入容器内，加入适量蒸馏水漂洗凝胶，摇床慢摇 5 分钟。 23. 重复上步一次。 24. 将酪蛋白法钙蛋白酶复性液与蒸馏水按体积比=1:9 混合得酪蛋白法钙蛋白酶复性工作液，如 10 mL 酪蛋白法钙蛋白酶复性液加 90 mL 蒸馏水。注：酪蛋白法钙蛋白酶复性液从低温环境取出时，需 37℃彻底溶化再使用。 25. 取出凝胶，弃蒸馏水，加入 50 mL 上步所得酪蛋白法钙蛋白酶复性工作液，摇床慢摇 30 分钟。注：复性结束后，凝胶呈乳白半透明状。 26. 将酪蛋白法钙蛋白酶孵育液与蒸馏水按体积比=1:9 混合得酪蛋白法钙蛋白酶孵育工作液，如如 10 mL 酪蛋白法钙蛋白酶孵育液加 90 mL 蒸馏水。 27. 弃酪蛋白法钙蛋白酶复性工作液，加入 50 mL 酪蛋白法钙蛋白酶孵育工作液，37℃摇床慢摇 10 分钟。 28. 弃上一步所加酪蛋白法钙蛋白酶孵育工作液，再加入 50 mL 酪蛋白法钙蛋白酶孵育工作液，37℃摇床慢摇 4 小时或者过夜孵育。 29. 弃酪蛋白法钙蛋白酶孵育工作液，凝胶中加入适量蒸馏水，摇床慢摇 5 分钟，重复漂洗一次。 30. 弃蒸馏水，加适量酪蛋白法钙蛋白酶染色液（以刚刚覆盖过胶面为适），摇床常温摇动 30-120 分钟，凝胶大部分区域被深染，有酪蛋白法钙蛋白酶条带的位置不被染色而形成透亮区域。 31. 蒸馏水漂洗 2-3 次，每次 5-10 分钟。 32. 由于染色后凝胶背景为蓝色。如果自然光下拍照效果不好，建议使用凝胶观察透射灯底部打光拍照。
关联产品	钙蛋白酶-1 活性测定试剂盒