天净沙系列

CAT#:240116

常温运输和保存，有低温成分

天净沙

一站式蛋白质非变性 PAGE 电泳试剂盒（高 pH）

One-Stop Protein Native PAGE Kit (High pH)

使用手册 V1.0

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

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（Native PAGE）是目前电泳法分离活性蛋白的主要方法之一，跟 SDS-PAGE 根据分子量大小分离蛋白质不同，它主要根据蛋白质的 pI 分离蛋白质。由于蛋白质的 pI 各不相同，所以对不同靶蛋白质需要选用具有不同 pH 的电泳体系。单独配制不同 pH 的 Native PAGE 电泳胶十分繁琐，为此本公司开发了本产品。它有下列特点:

1. 即开即用，用户不需单独准备各种成分，十分方便。
2. 非变性，电泳过程中蛋白质保持天然的构象和亚基之间的相互作用，得到的蛋白质一般都具有生物活性（而 SDS-PAGE 得到的蛋白没有活性）。
3. 可以用于分析蛋白质和 DNA 或 RNA 的相互作用、蛋白修饰、蛋白构型改变、回收有活性蛋白质等试验。
4. 电泳后可直接用于考染、银染、Western 杂交等实验。
5. 本产品足够 30 次 mini PAGE 电泳。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

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 白盖管
4×高 pH 浓缩胶配胶液 pH 6.7	240116a	100 mL	125 mL 本色瓶
4×高 pH 分离胶配胶液 pH 8.9	240116b	200 mL	250 mL 本色瓶
高 pH 电泳液 pH 8.3（干粉）	240116c	10 L	500 mL 本色瓶
5×高 pH 上样液	240116d	1 mL	1.5 mL 棕色管
使用手册	240116sc	1 份	1 份

运输及保存

常温运输和保存，TEMED 需 4℃避光保存；5×高 pH 上样液需低温运输、-20℃保存，保存期为一年。

自备试剂

去离子水、天然 PAGE 蛋白质标准或蛋白质等电电泳标准品

使用方法

一：配制分离胶

1. 确定浓度。对分子量在 100 kD 以上的蛋白质，可选用 3-5%的胶；对分子量在 20-150 kD 之间的蛋白质，可选用 5-10%的胶；对分子量在 10-80 kD 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。
2. 配制 10%的 APS（过硫酸铵）：按每 0.1 克过硫酸铵干粉加 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。

3. 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 克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。
4. 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 4.2 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。
5. 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）。
6. 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。
7. 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。
8. 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。

9. 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。
10. 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）。
11. 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。
12. 在液面达到顶部时停止灌胶，插入梳子。
13. 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

14. 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 1 L 水中得 10×电泳液（注：需要 65℃加热），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。高 pH 电泳缓冲液的 pH 是 8.3。

	15. 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。 16. 300 V 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。 17. 换电泳液。 18. 在液体蛋白质样品中加入 5×上样液（16 μL 液体样品加 4μL 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。注意：如果用考染检测，每个孔的蛋白最好在 50-100 μg 总蛋白，如果银染则只需要 1 μg 即可。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。 19. 上样自备的天然 PAGE 蛋白质标准或等电电泳的标准品（如果有的话）。 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）。
关联产品	一站式蛋白质非变性 PAGE 电泳试剂盒（低 pH）