

SDS-聚丙烯酰胺凝 胶电泳法测定蛋白 质分子量

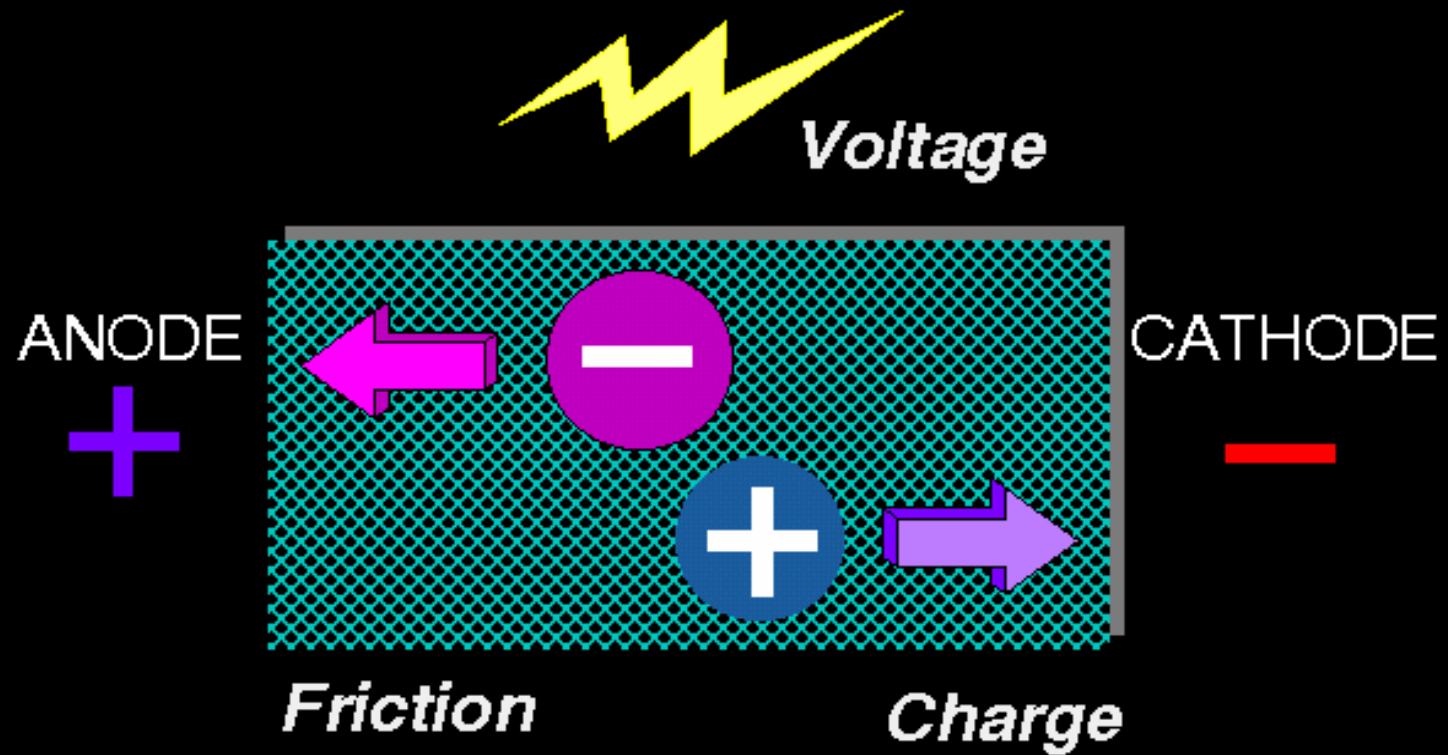
二、实验目的

- 学习SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis）的基本原理
- 掌握SDS-PAGE测定蛋白质相对分子量的方法

二、实验原理

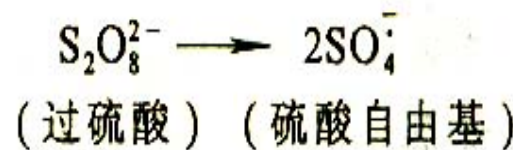
- 电泳
- 电泳介质——聚丙烯酰胺凝胶
- 缓冲液 $\text{pH} > \text{蛋白质pI}$ ，蛋白质带负电荷，向电场正极移动
- 影响蛋白迁移率的因素：静电荷，蛋白颗粒大小、形状，电场强度
- **SDS**：与蛋白分子成比例结合→带负电荷复合物，消除不同蛋白间原有电荷差
- 蛋白 Mr ： $15 \times 10^3 - 200 \times 10^3$ 时，迁移率与 $\log \text{Mr}$ 呈线性
- 浓缩、分离两层胶：浓缩效应+分子筛效应

电泳的基本原理



丙烯酰胺+双丙烯酰胺→三维网状孔结构

A. TEMED 催化 AP 生成硫酸自由基:

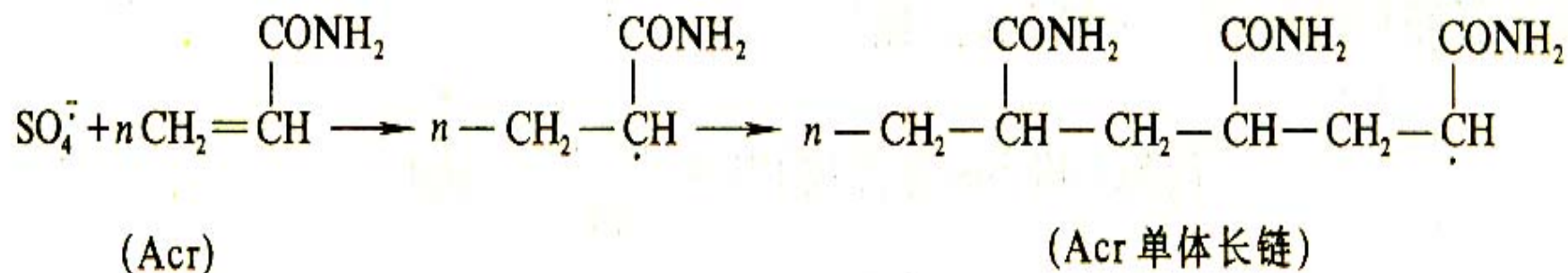


TEMED: 四甲基乙二胺

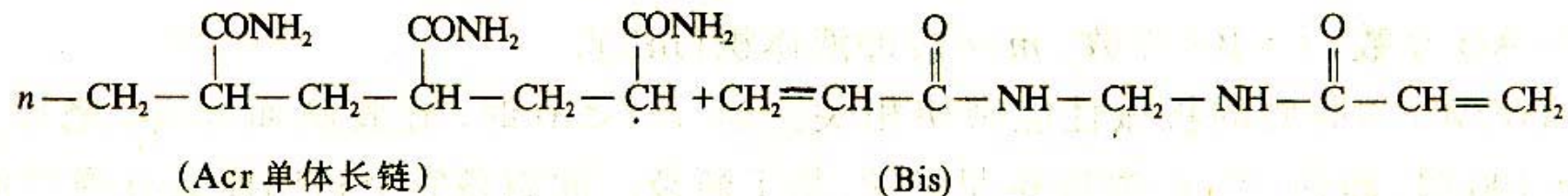
AP: 过硫酸铵

Acr: 丙烯酰胺

B. 硫酸自由基的氧原子激活 Acr 单体并形成单体长链:

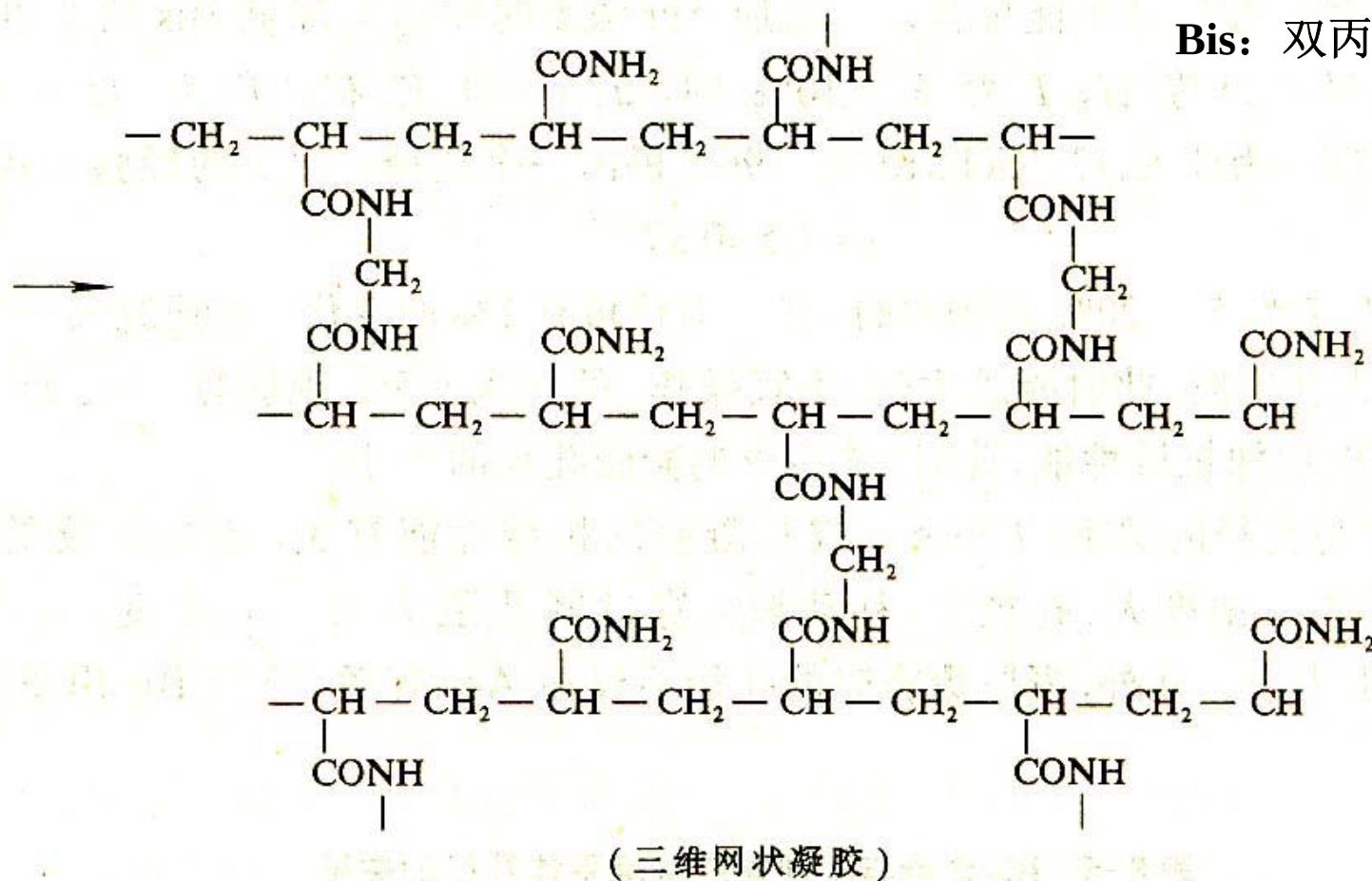


C. Bis 将单体长链间连成网状结构:

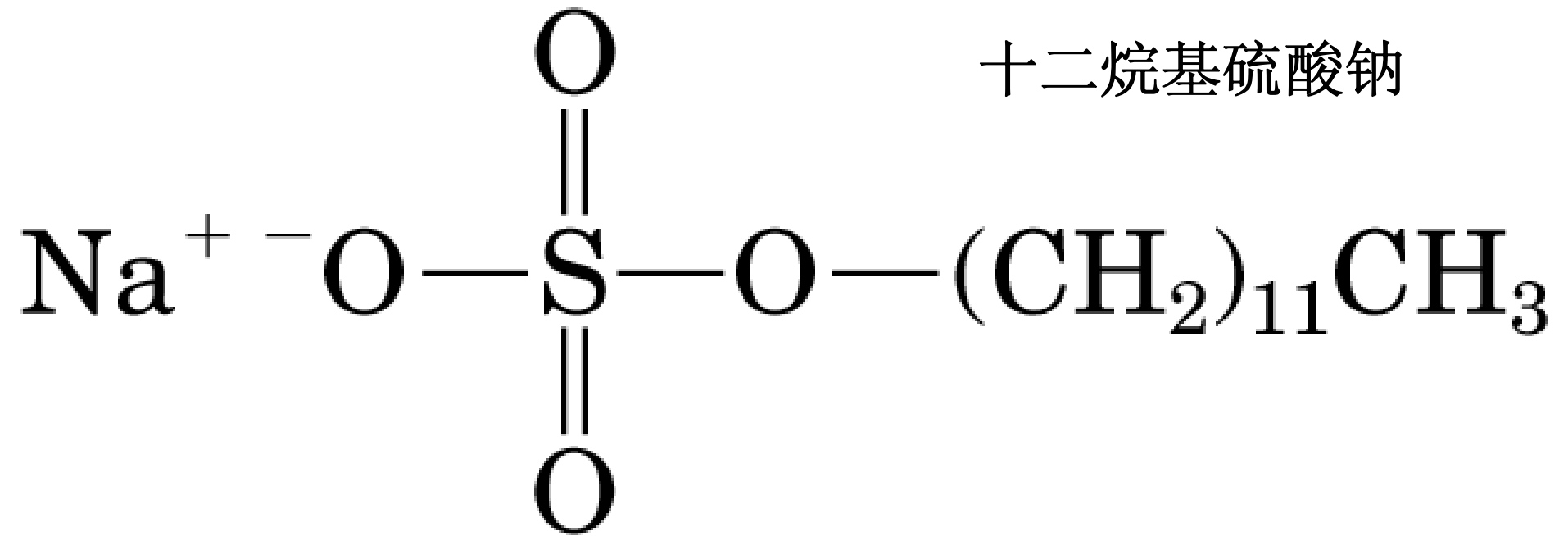


Acr: 丙烯酰胺

Bis: 双丙烯酰胺

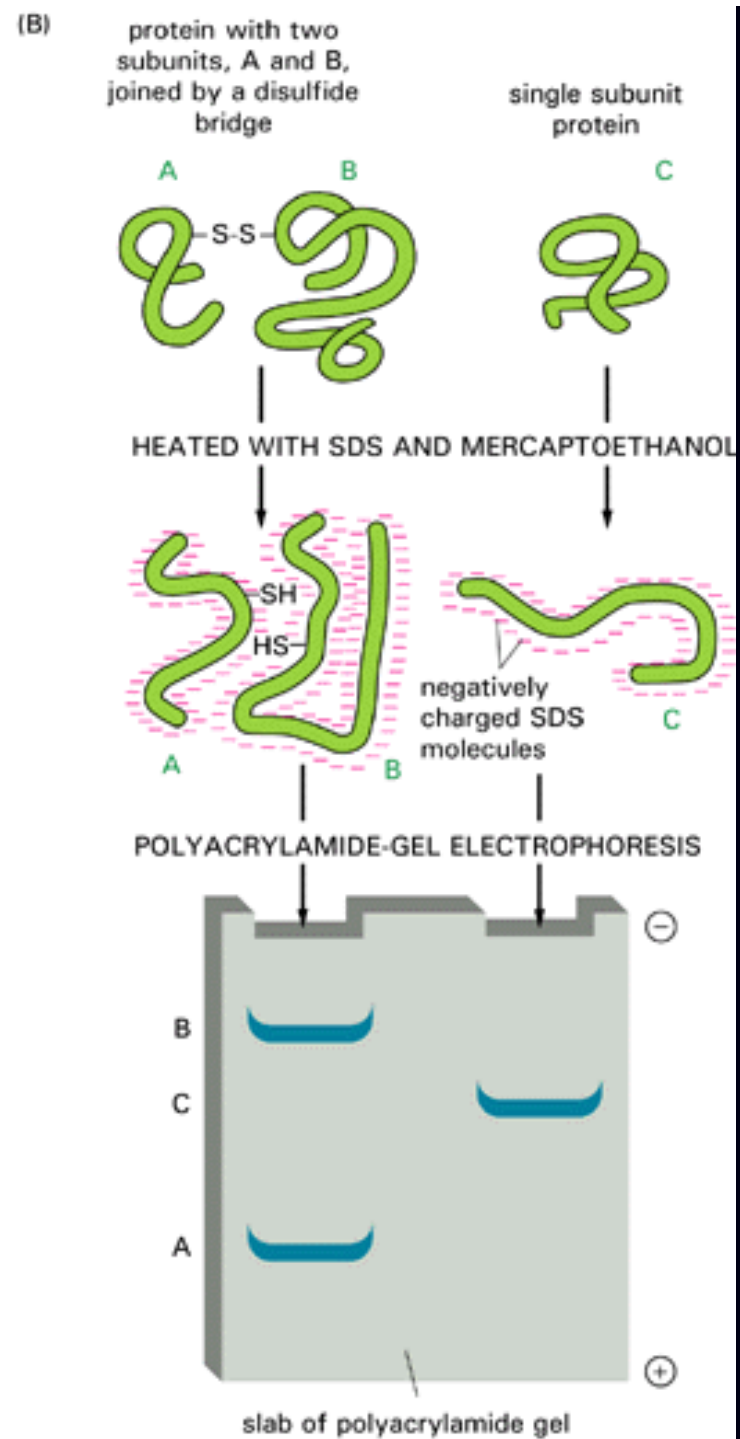


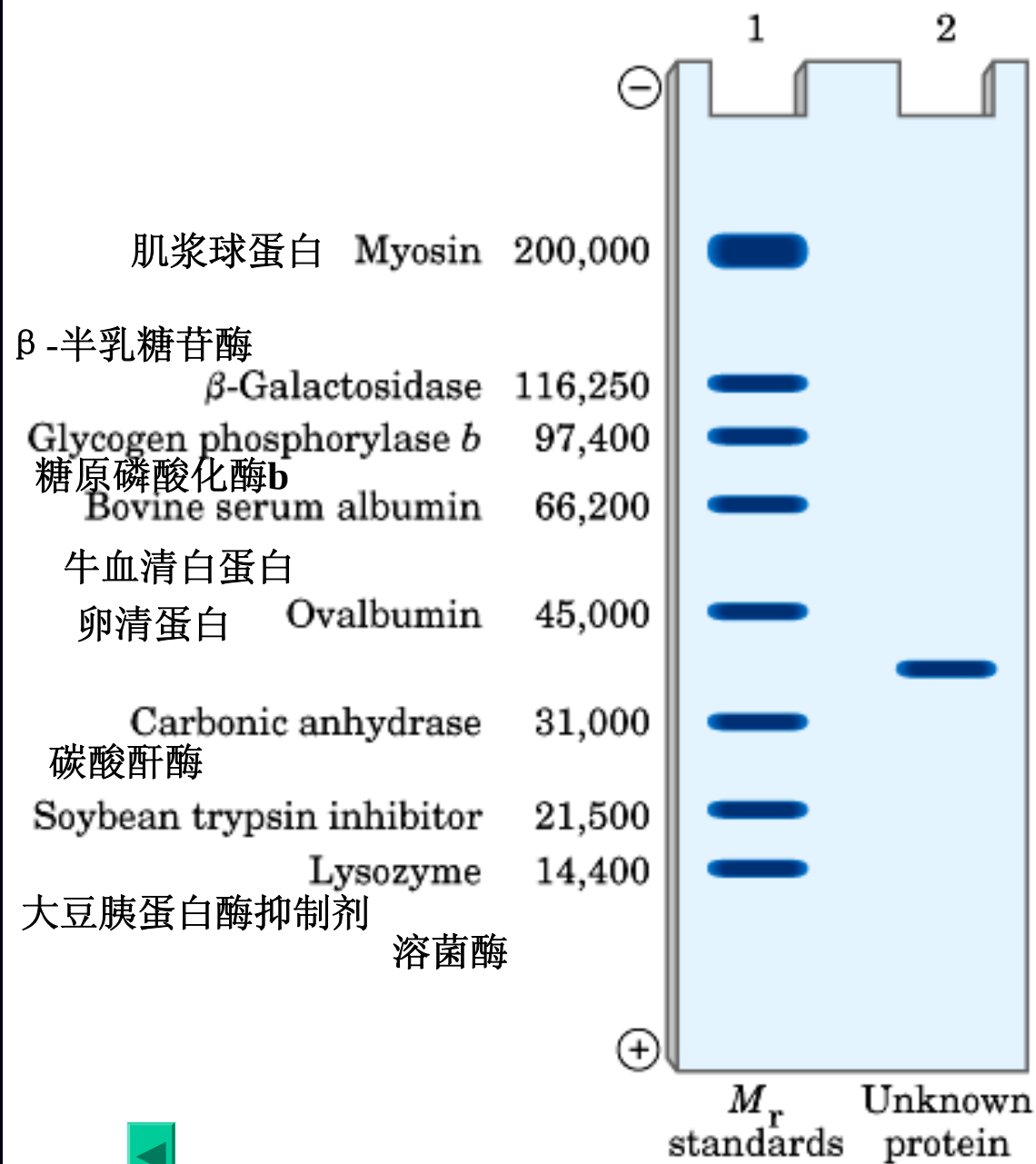
十二烷基硫酸钠



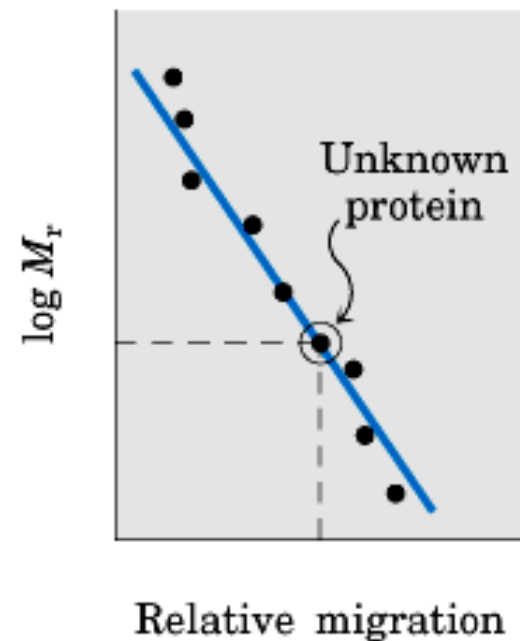
Sodium dodecyl sulfate
(SDS)

SDS的作用





(a)



(b)

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定不同分子量蛋白质

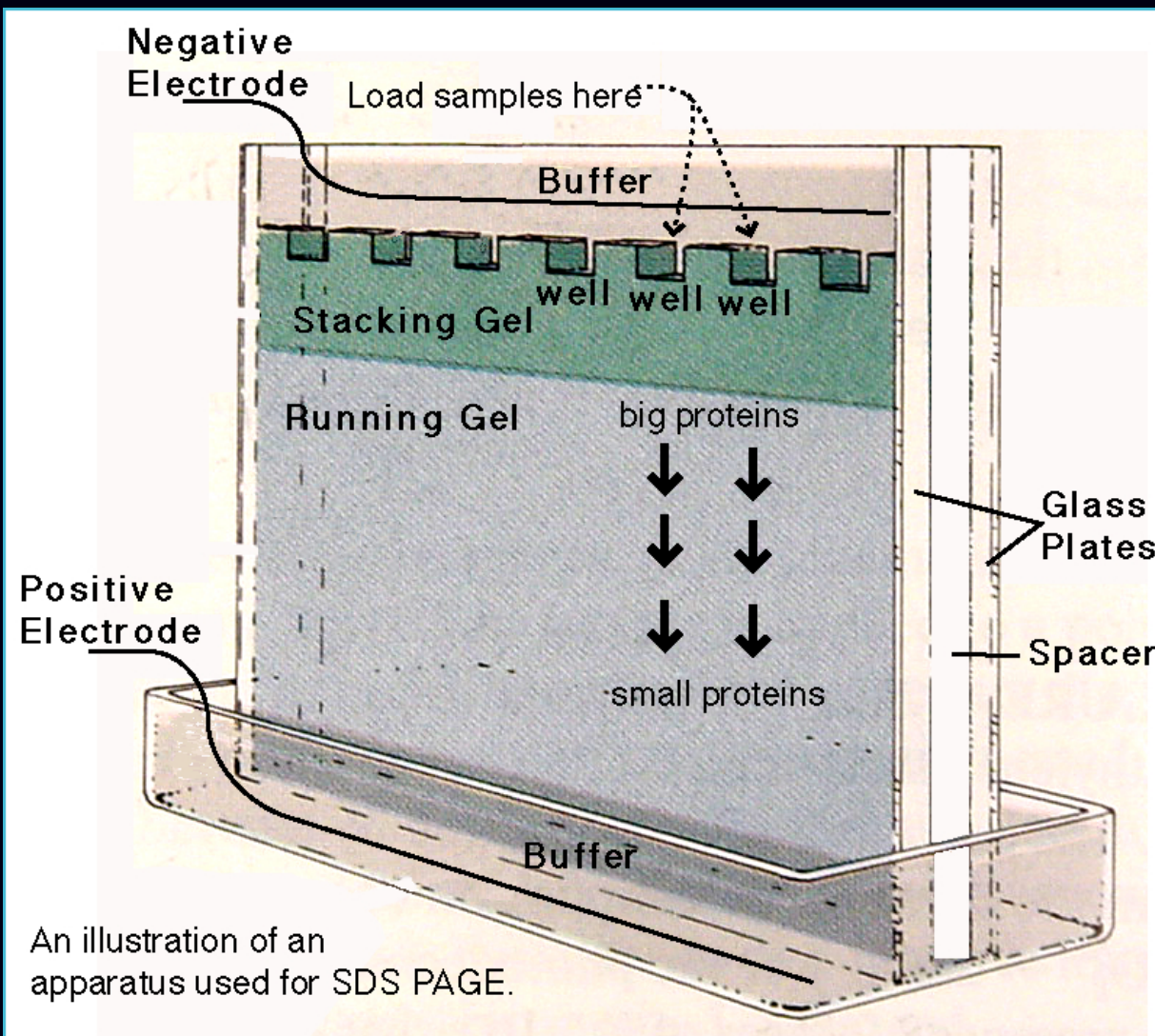
分子量范围	适用的凝胶浓度%
• $<10^4$	20-30
• $1-4 \cdot 10^4$	15-20
• $4 \cdot 10^4-1 \cdot 10^5$	10-15
• $1-5 \cdot 10^5$	5-10
• $>5 \cdot 10^5$	2-5

浓缩、分离胶的双重效应

➤ 浓缩胶用的是Tris-HCl缓冲液，pH6.8，Cl在电场中移动最快。pH6.8 Gly有少量解离，在电场中移动的最慢。蛋白质在由快慢离子形成的电位梯度中被浓缩。

➤ 分离胶用的是Tris-甘氨酸缓冲液，pH8.8，在此pH下，甘氨酸解离度增大，泳动速度增加并超过了蛋白质，原先的电位梯度消失，大小形状不同的蛋白质在电场中分离。

➤ **Tris:** 三羟甲基氨基甲烷



三、主要实验器材

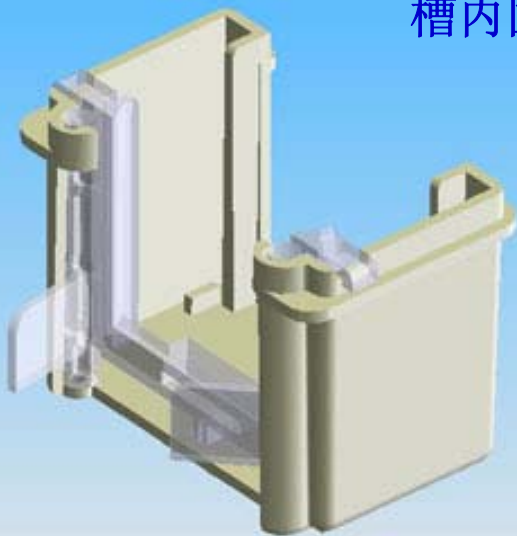
电泳仪



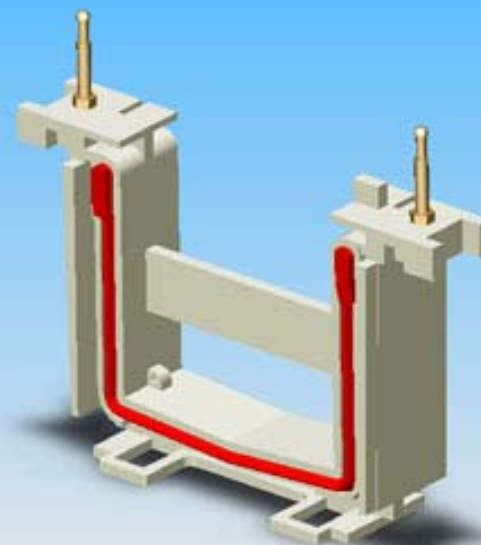
电泳装置



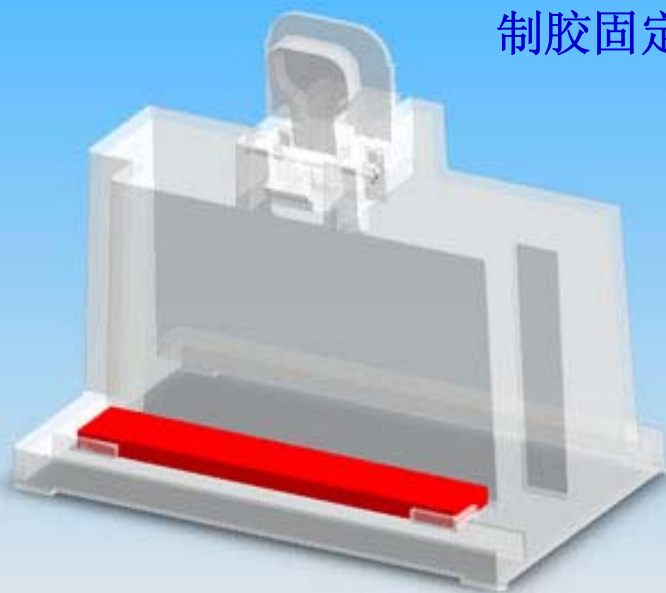
槽内固定架



电极架



制胶固定架



玻璃板 梳子 起胶板

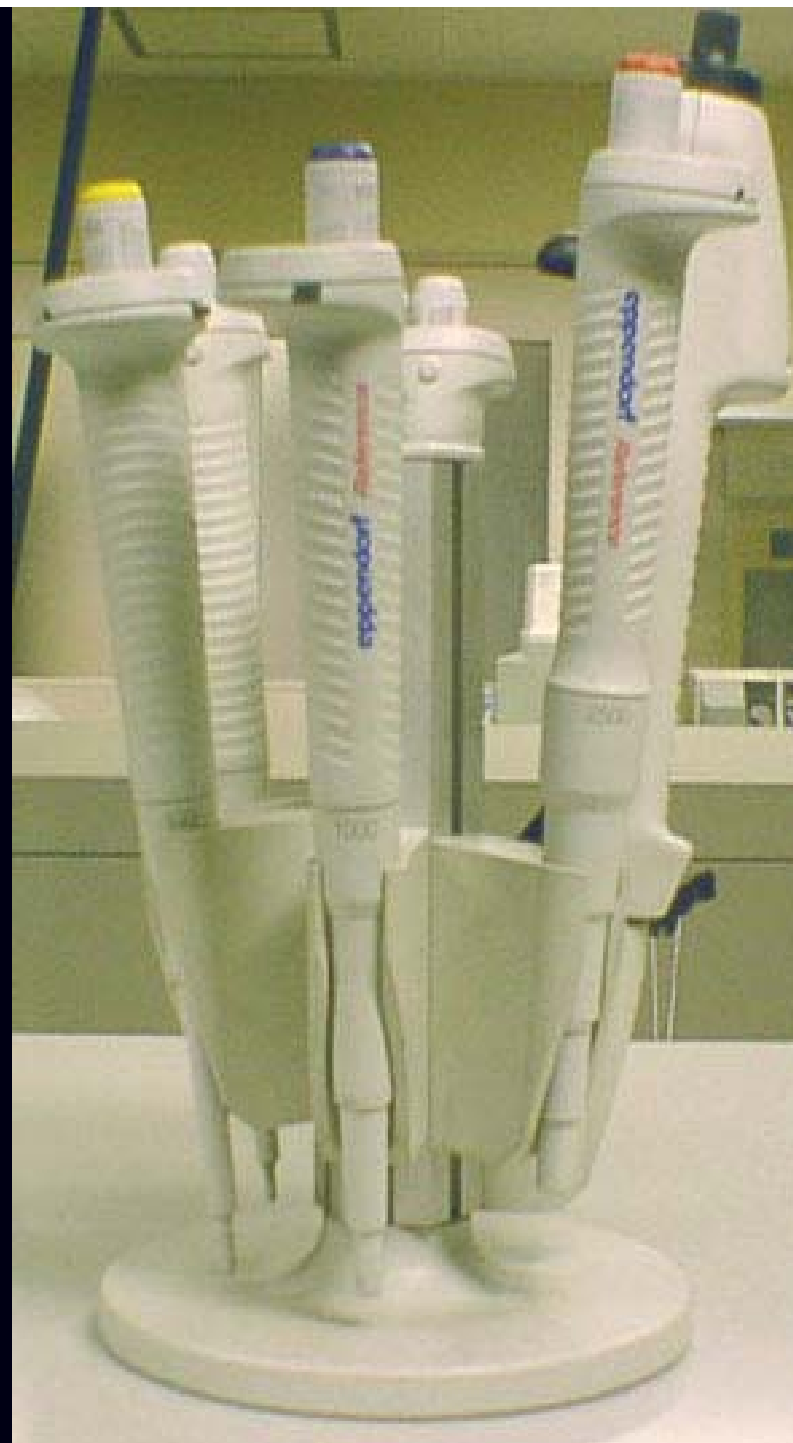


加样器、移液器、取液器、
移液枪
(pipet)

不同量程的加样器

常用加样器：

- 2
- 20 μ l
- 200 μ l
- 1000 μ l



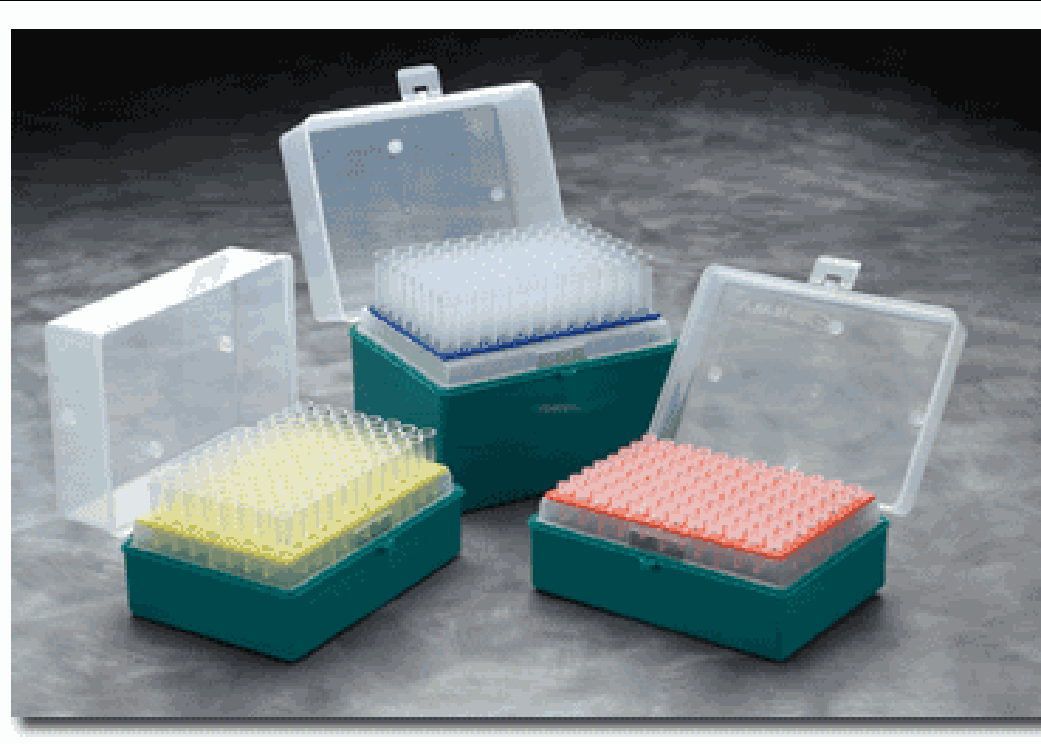
多道加样器



多道加样器的功用



不同型号的加样头





加样器的握法



选择恰当量程的加样器





确定、调节量程



吸取溶液（样品）



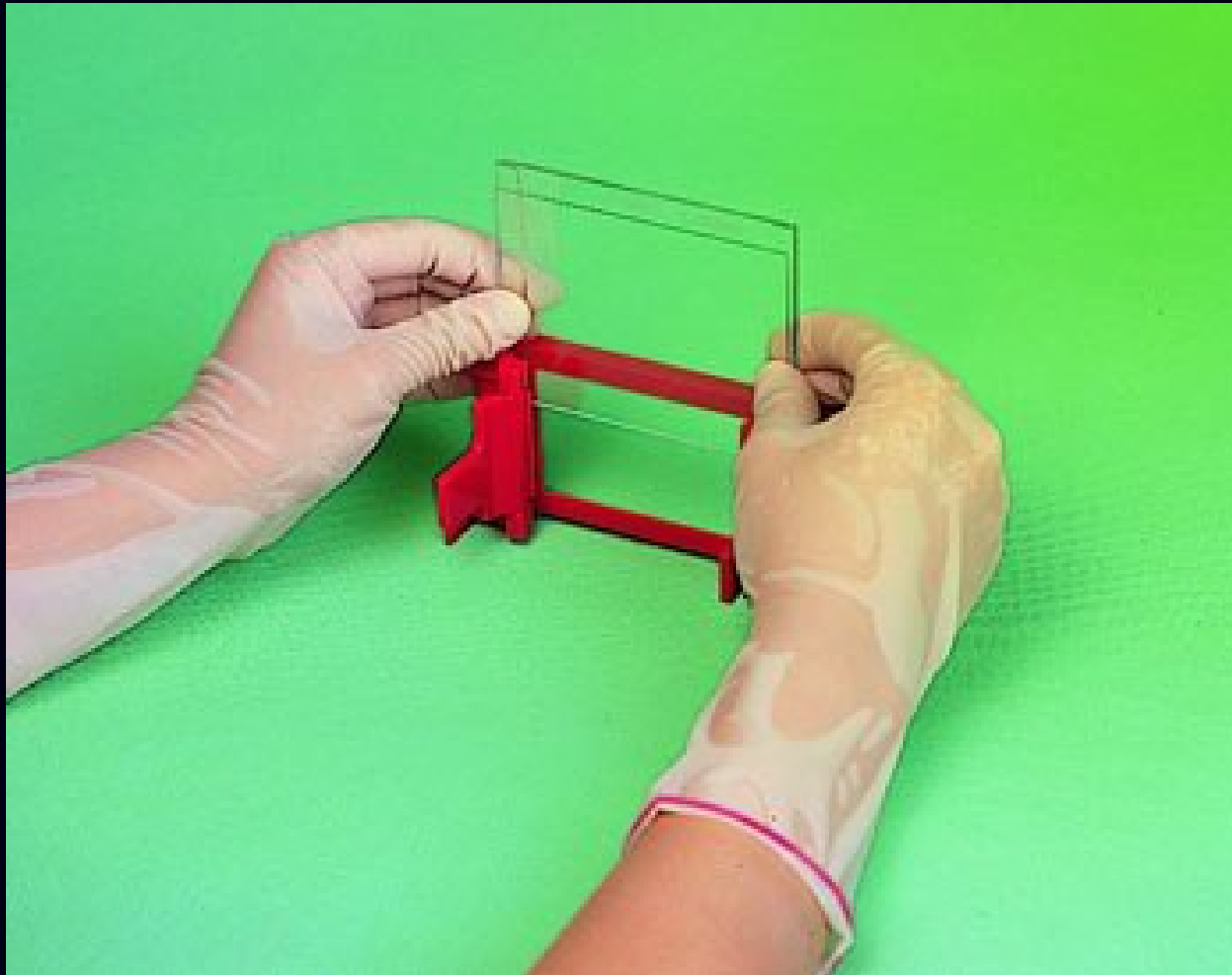


四、操作步骤

1. 凝胶模板的组装

➤红色玻璃夹底座朝下、卡口打开呈直角状。

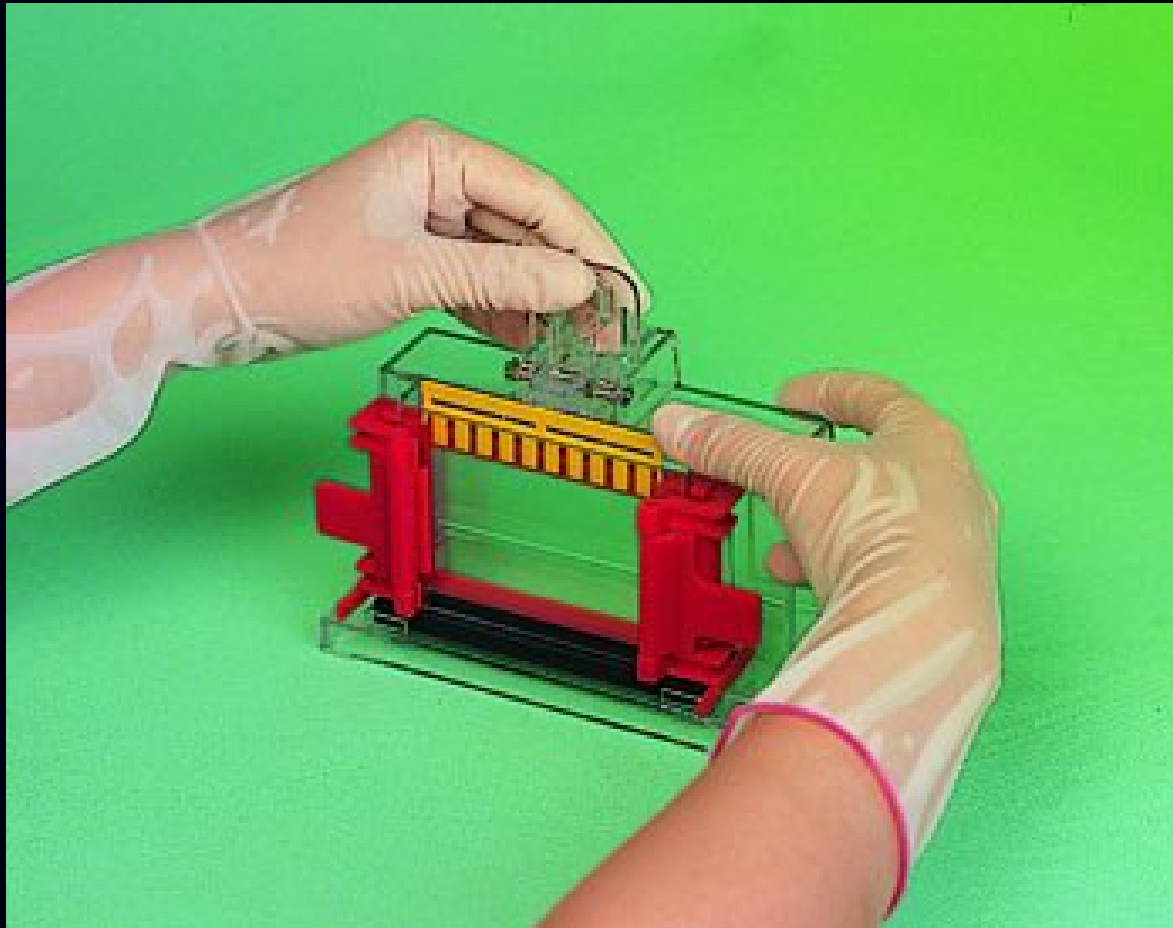
➤放入厚薄两片玻璃，薄玻璃朝向自己（厚玻璃箭头向上），旁边两条小玻璃条与薄玻璃接触，使之形成一个间隙。



在平整的桌面上放下玻璃与夹子，使玻璃和夹子的底面完全对齐，向外扳动塑料卡口，关紧夹子。



玻璃夹放在制胶架上，薄玻璃朝向自己。按弹簧夹，将玻璃夹卡入制胶架。在玻璃的间隙内分别灌制分离胶和浓缩胶，放上梳子，待胶凝固。



2. 分离胶的制备和灌注

10%分离胶的制备（10ml）-5ml/组

试剂	ml
Acr/Bis 30%	3.3
1.5mol/L Tris-HCl Ph 8.8	2.5
10% SDS	0.1
10% AP	0.1
H ₂ O	4.0
TEMED	0.004

灌注分离胶(水封，室温30分钟左右凝固)

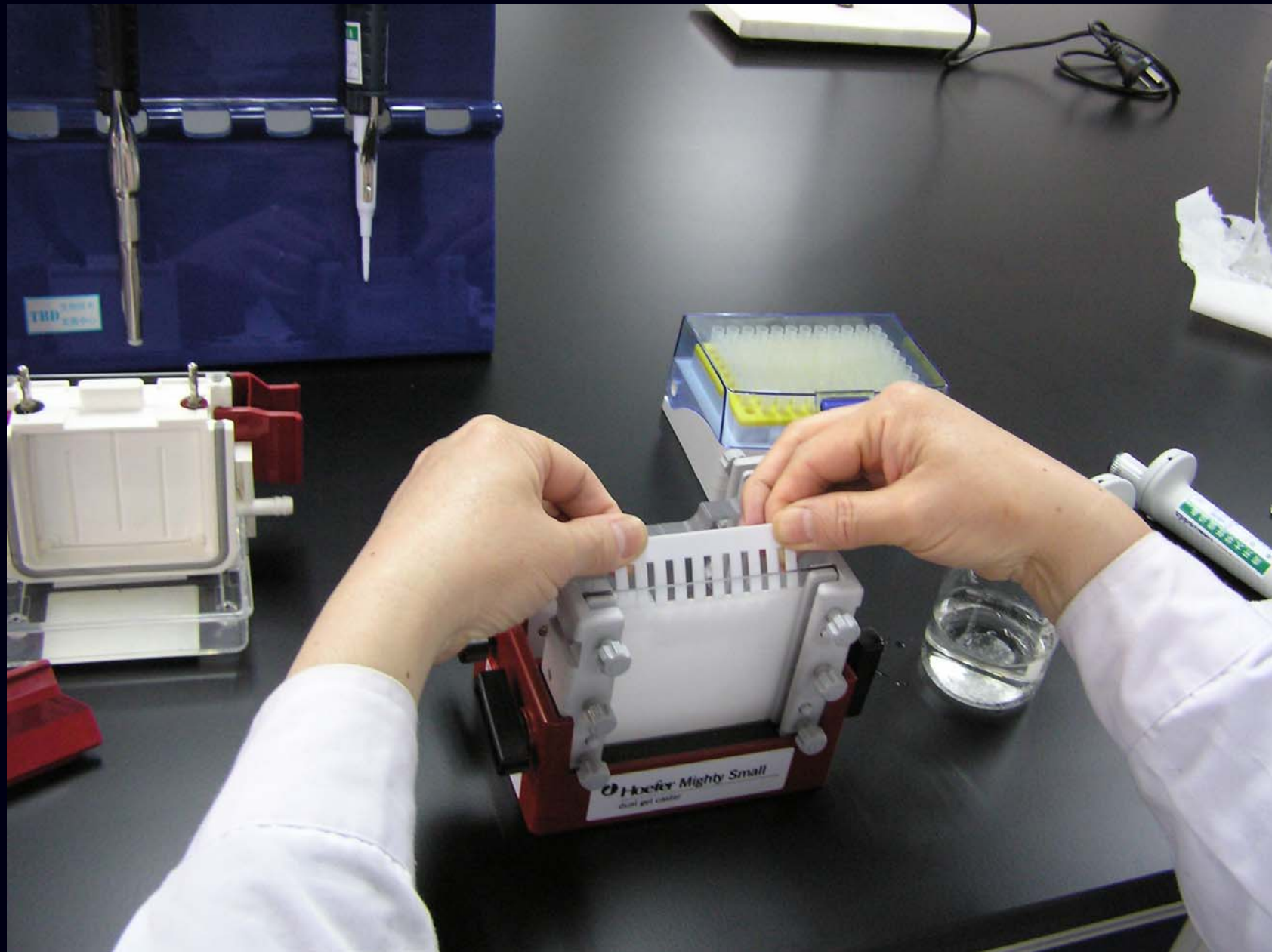
3. 浓缩胶的制备和灌注

5%浓缩胶（10ml）-3ml/组

试剂	ml
Acr/Bis 30%	1.7
0.5mol/L Tris-HCl Ph 6.8	2.5
10% SDS	0.1
10% AP	0.1
H ₂ O	5.6
TEMED	0.01

灌注浓缩胶

加梳子

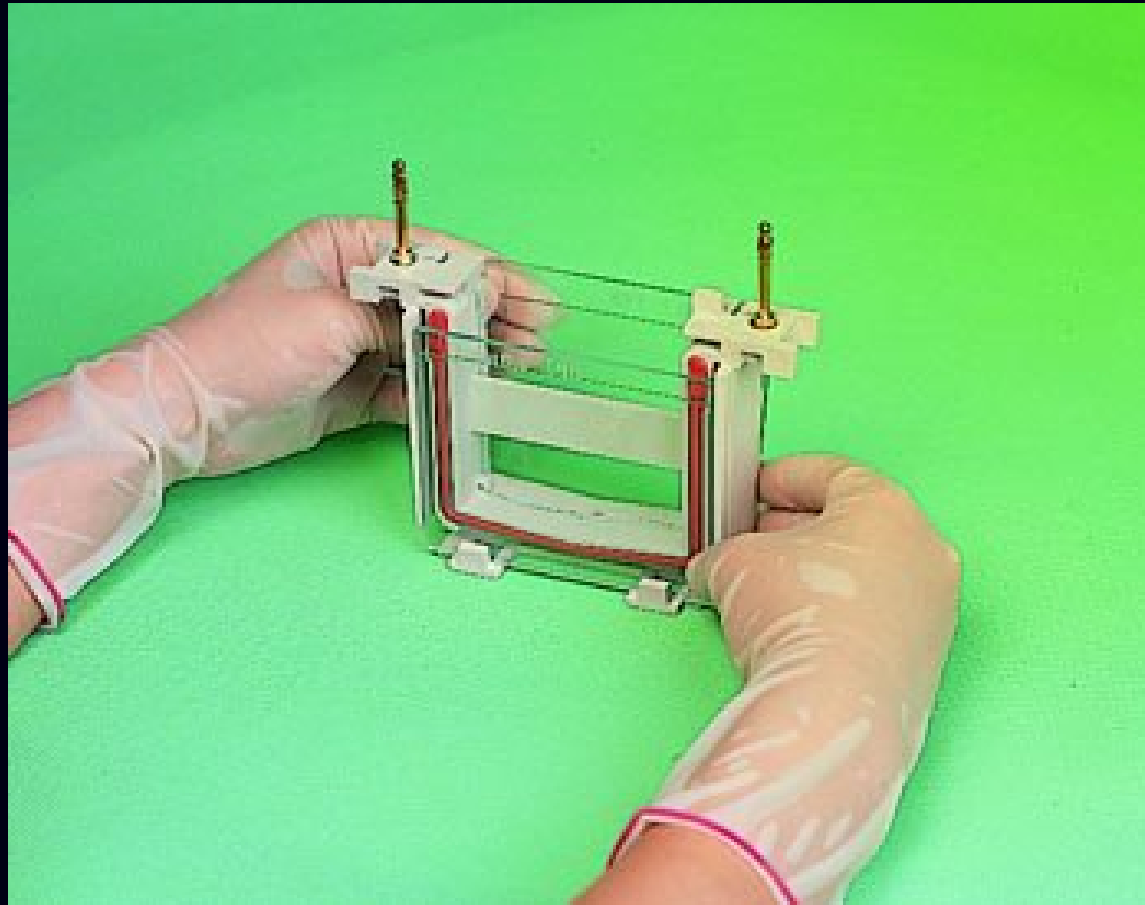


4. 蛋白质样品的处理

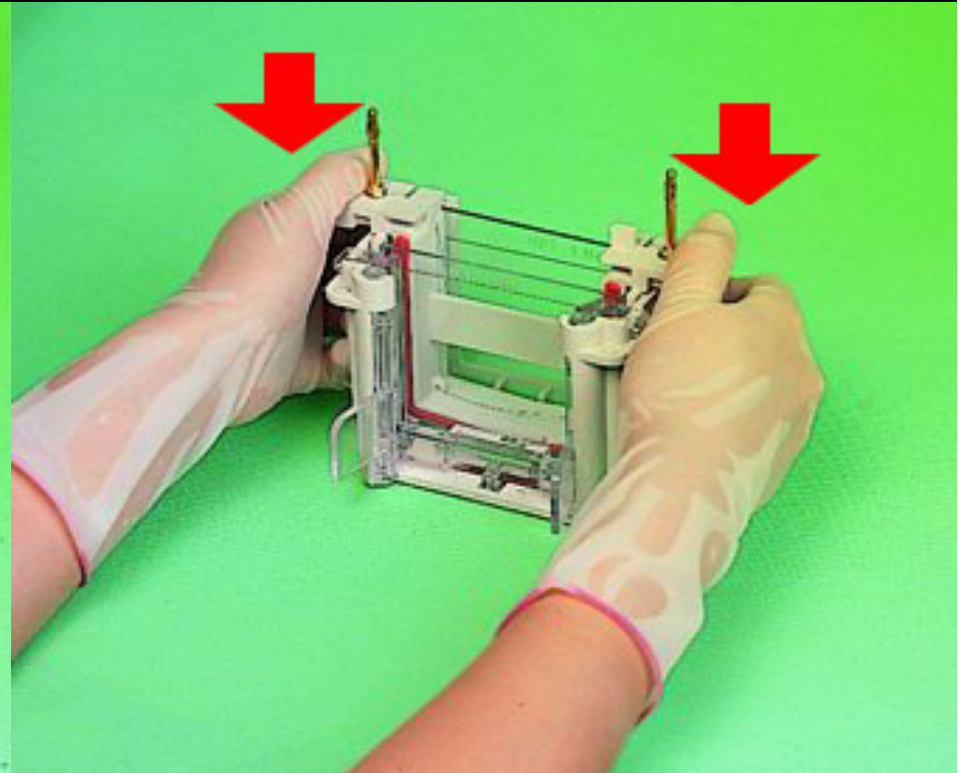
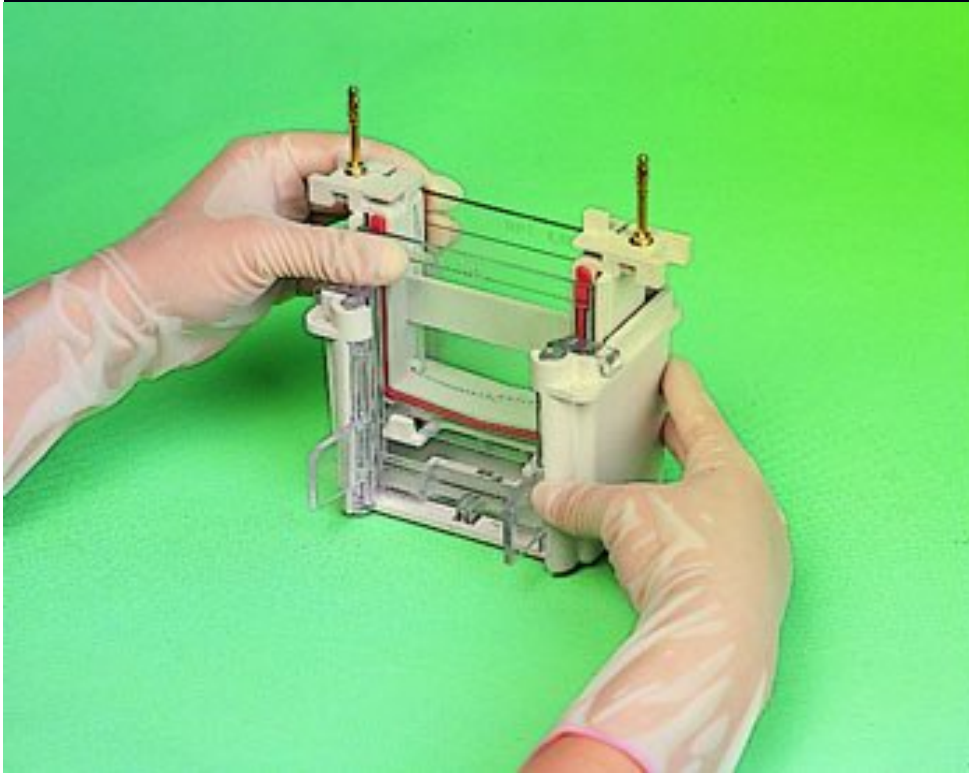
- 固体样品: 2mg蛋白溶于1ml 0.5M pH6.8 Tris-HCl (或水) 配制成蛋白溶液。取15-20 μ l样品+等体积上样缓冲液, 100°C, 2-3min。
- 液体样品: 15-20 μ l样品+等体积上样缓冲液, 100 °C , 2-3min。
- *上样缓冲液: 0.5mol/L Tris-HCl pH6.8
1.25ml, 50%甘油4ml, 10%SDS
2ml, 巯基乙醇0.4ml, 0.1%溴酚
蓝0.4ml, 加H₂O至10ml。

5. 电泳

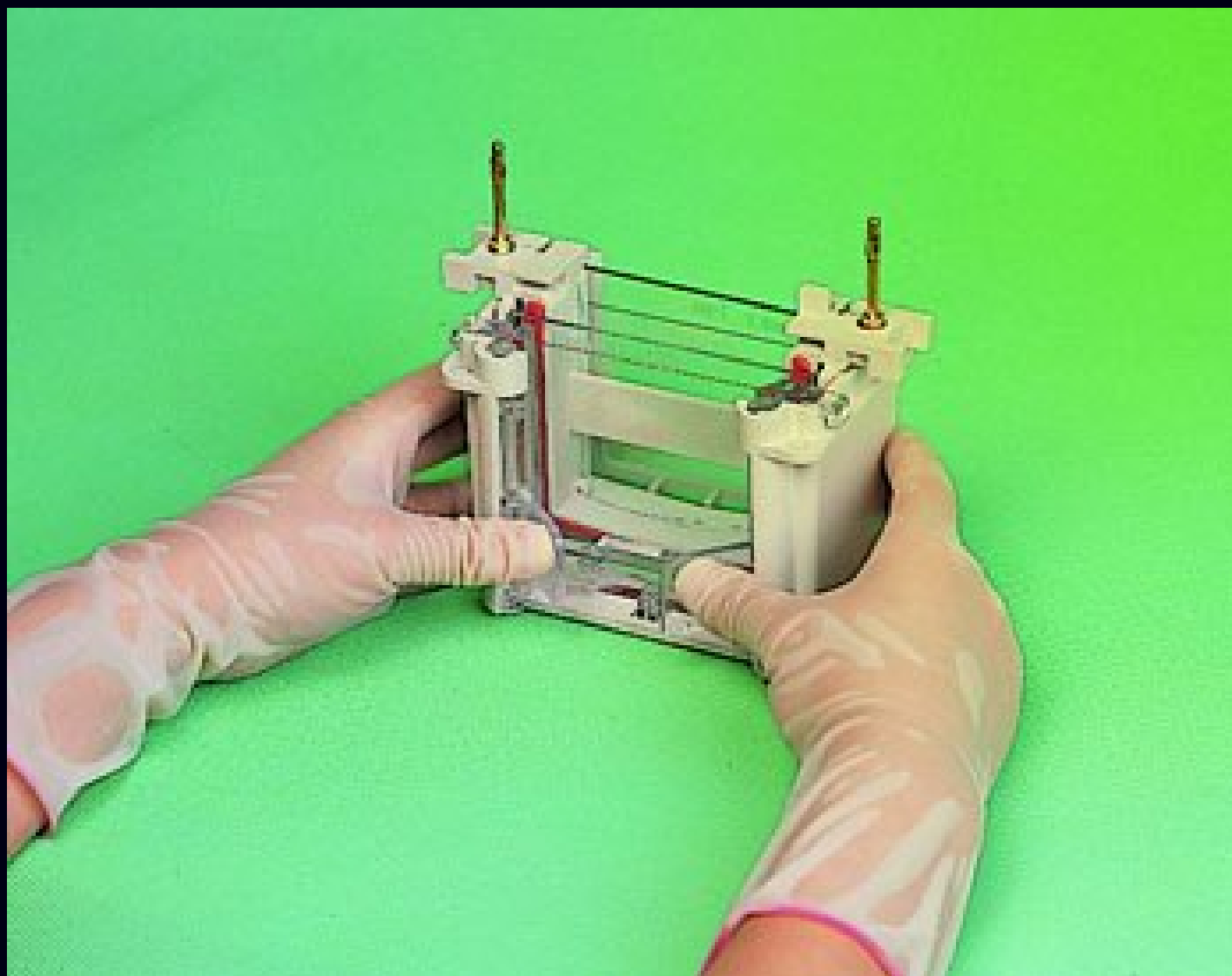
- 将玻璃（胶）放入电极架（卡在底面的卡口上），薄玻璃朝向电极架，厚玻璃的箭头朝上，玻璃与红色橡胶条必须完全紧贴（每侧1块胶）。



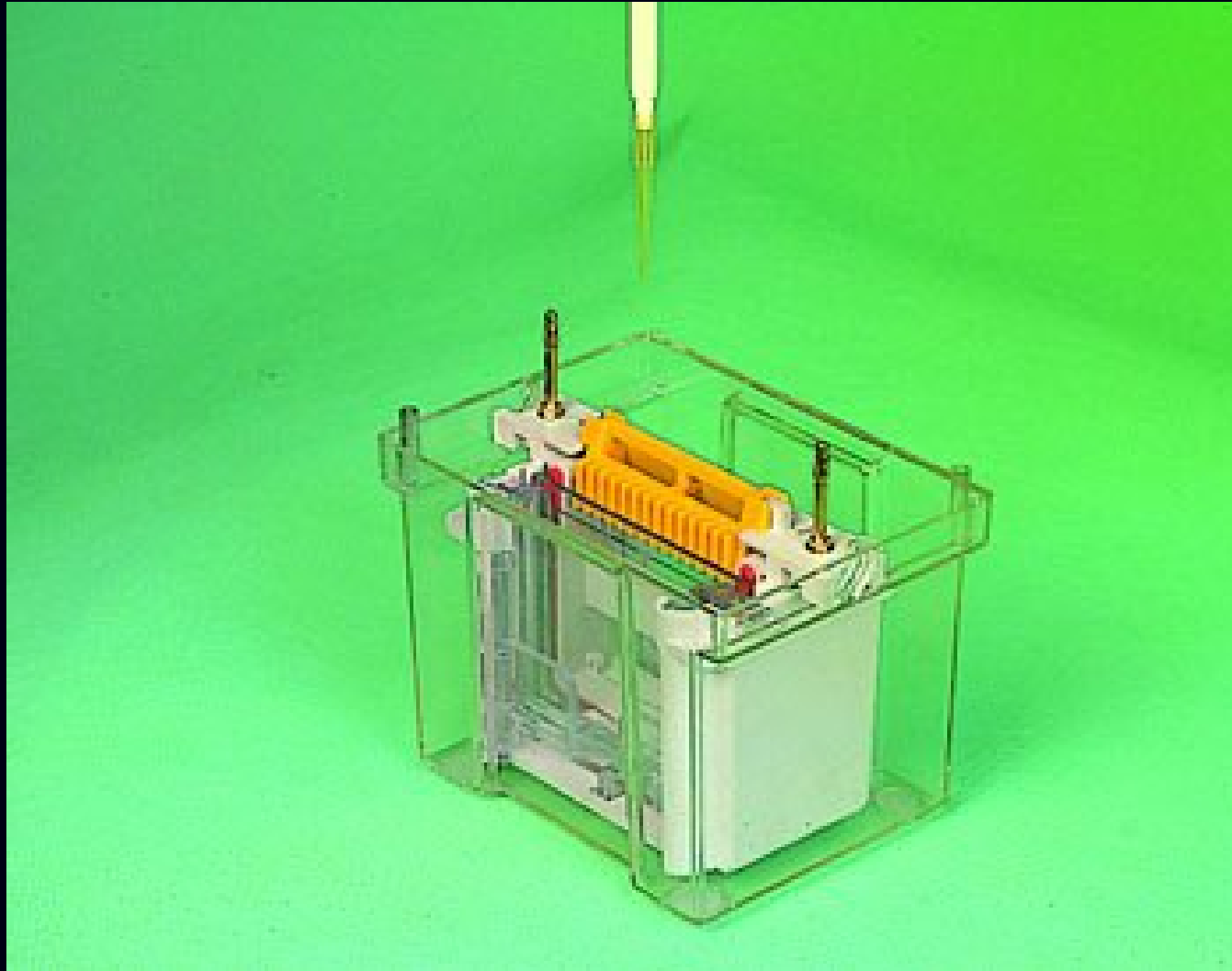
- 将底座的开关打开，并向外拨动透明的架子，使中间空隙增大，放入电极架。



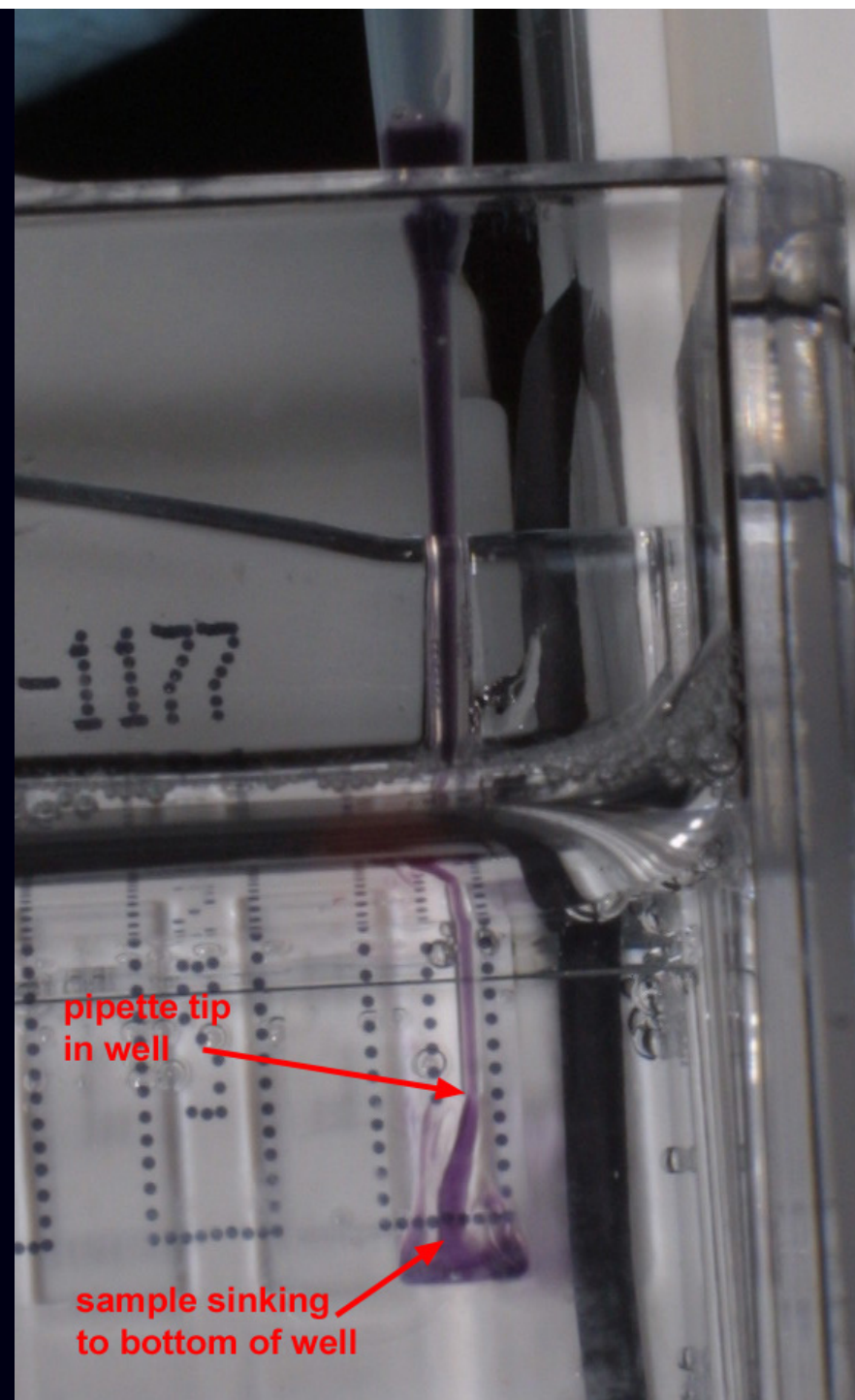
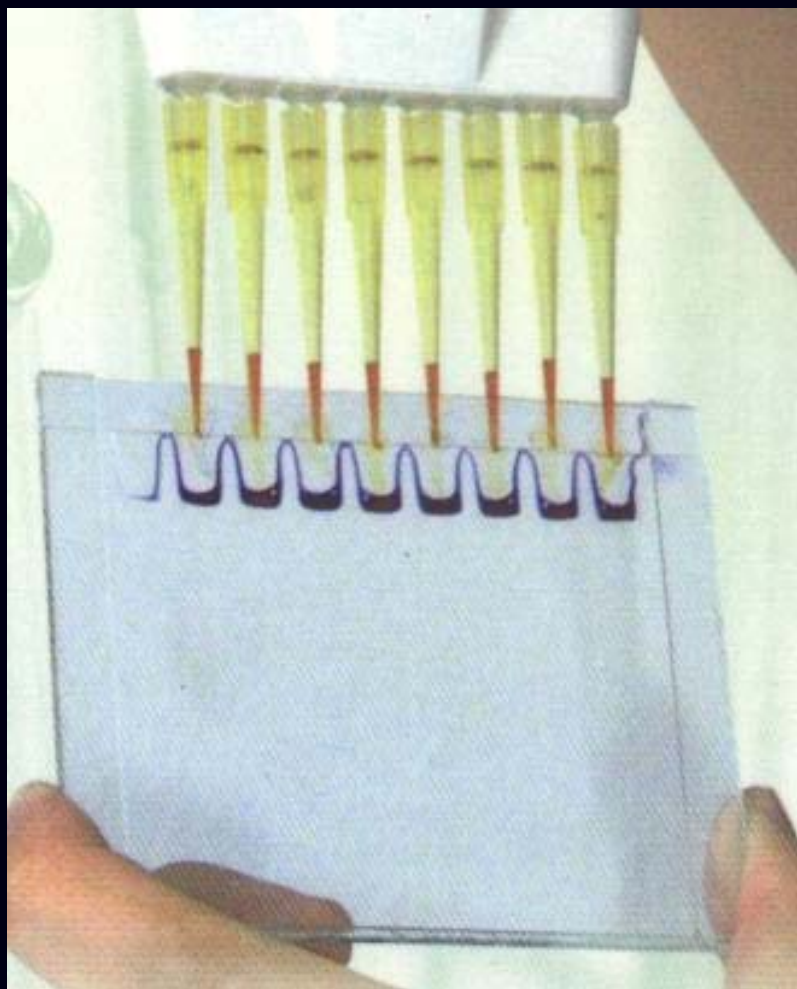
- 关上底座开关



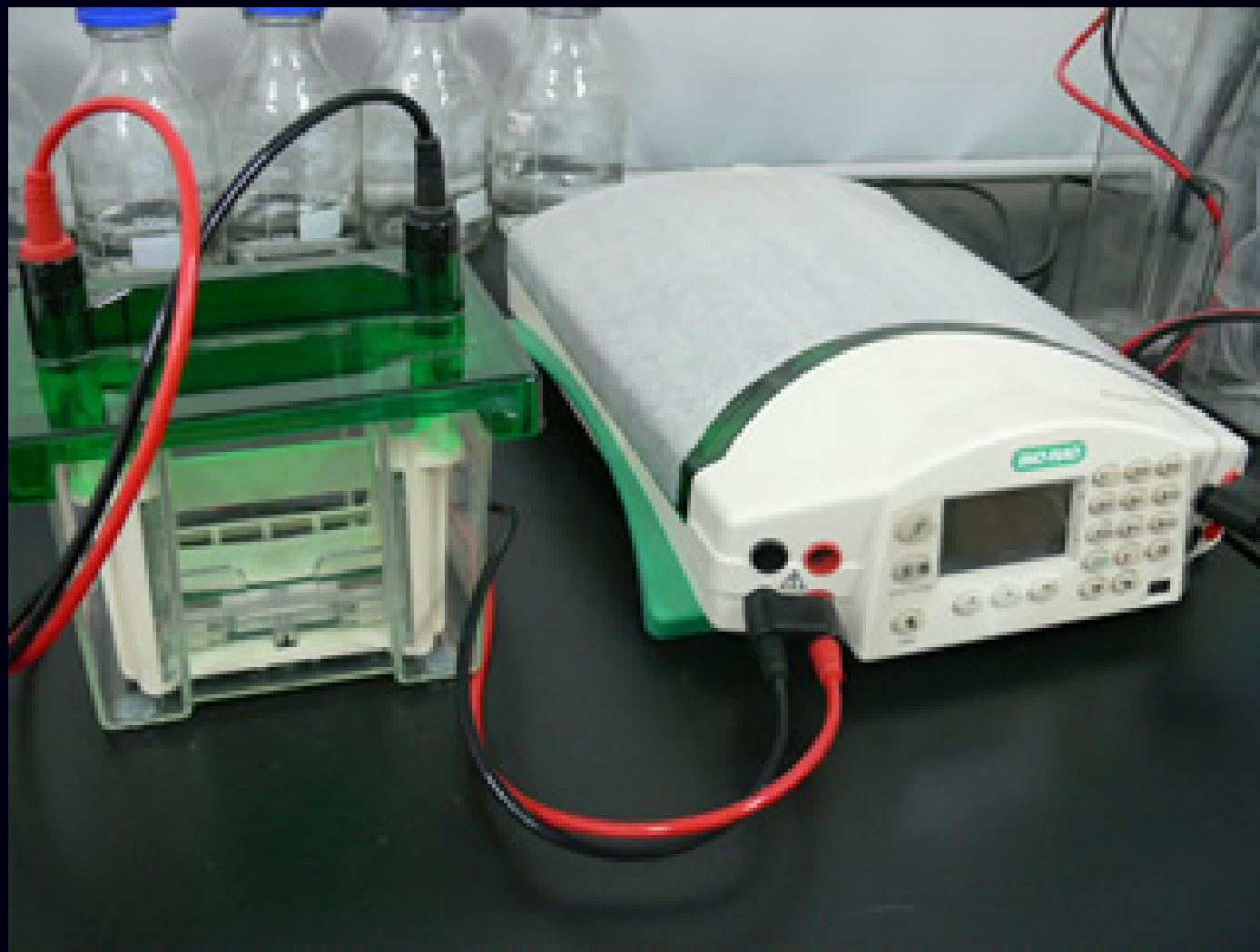
加入缓冲液（0.1%SDS，0.3%Tris，1.5%Gly），取出梳子，准备点样。



**点样：向样品槽中加入
20-30 μ l 样品**



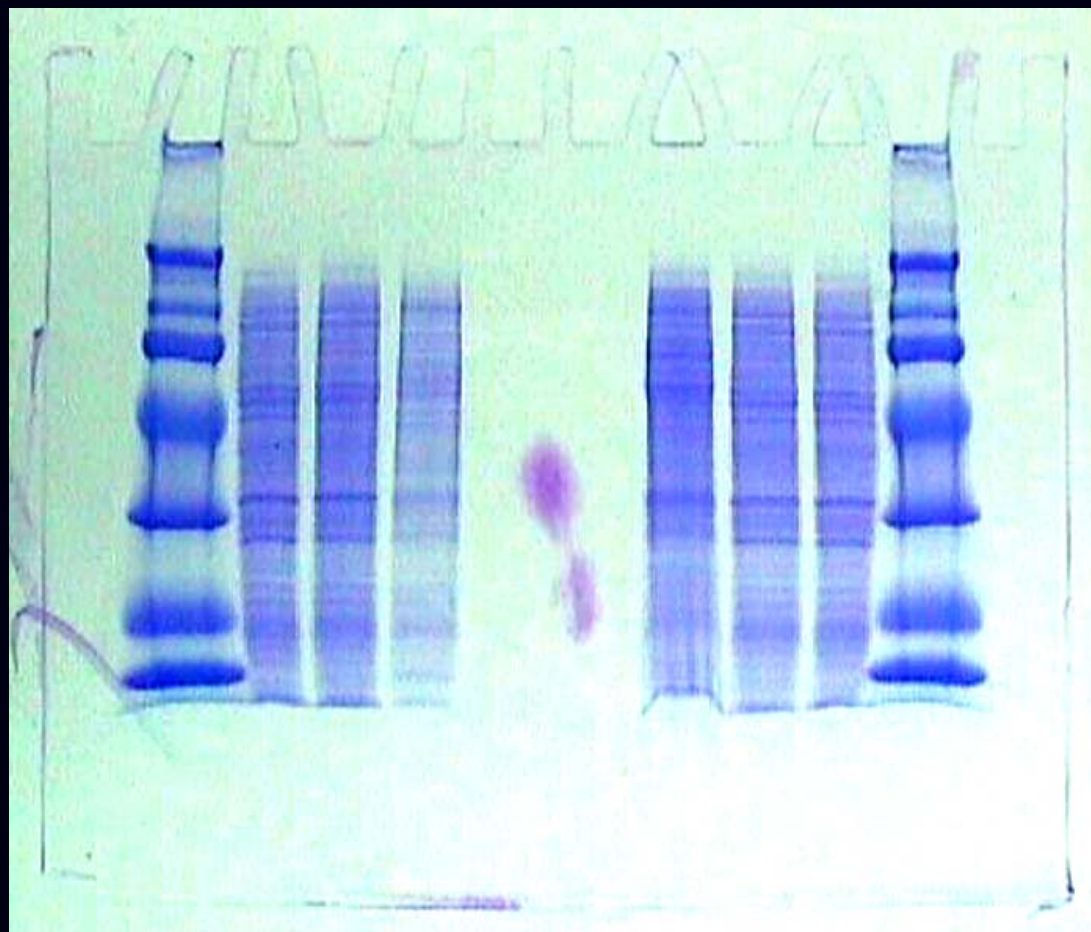
- **电泳：80V，15-20min（浓缩胶）；100V（分离胶）至指示剂距凝胶底边1cm。**



6. 染色、脱色

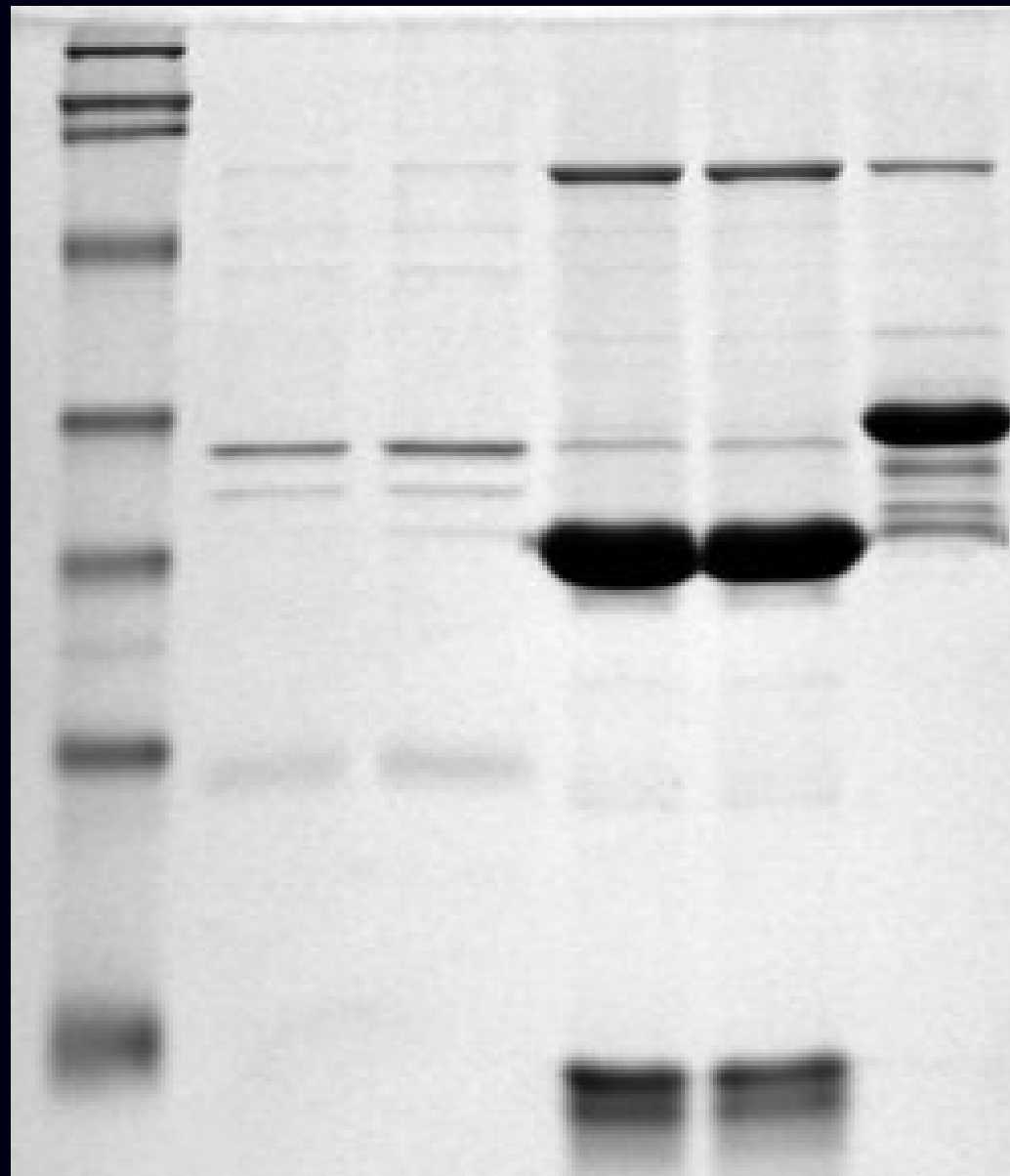
染色：凝胶于0.25%
考马斯亮蓝染色
5-10min。

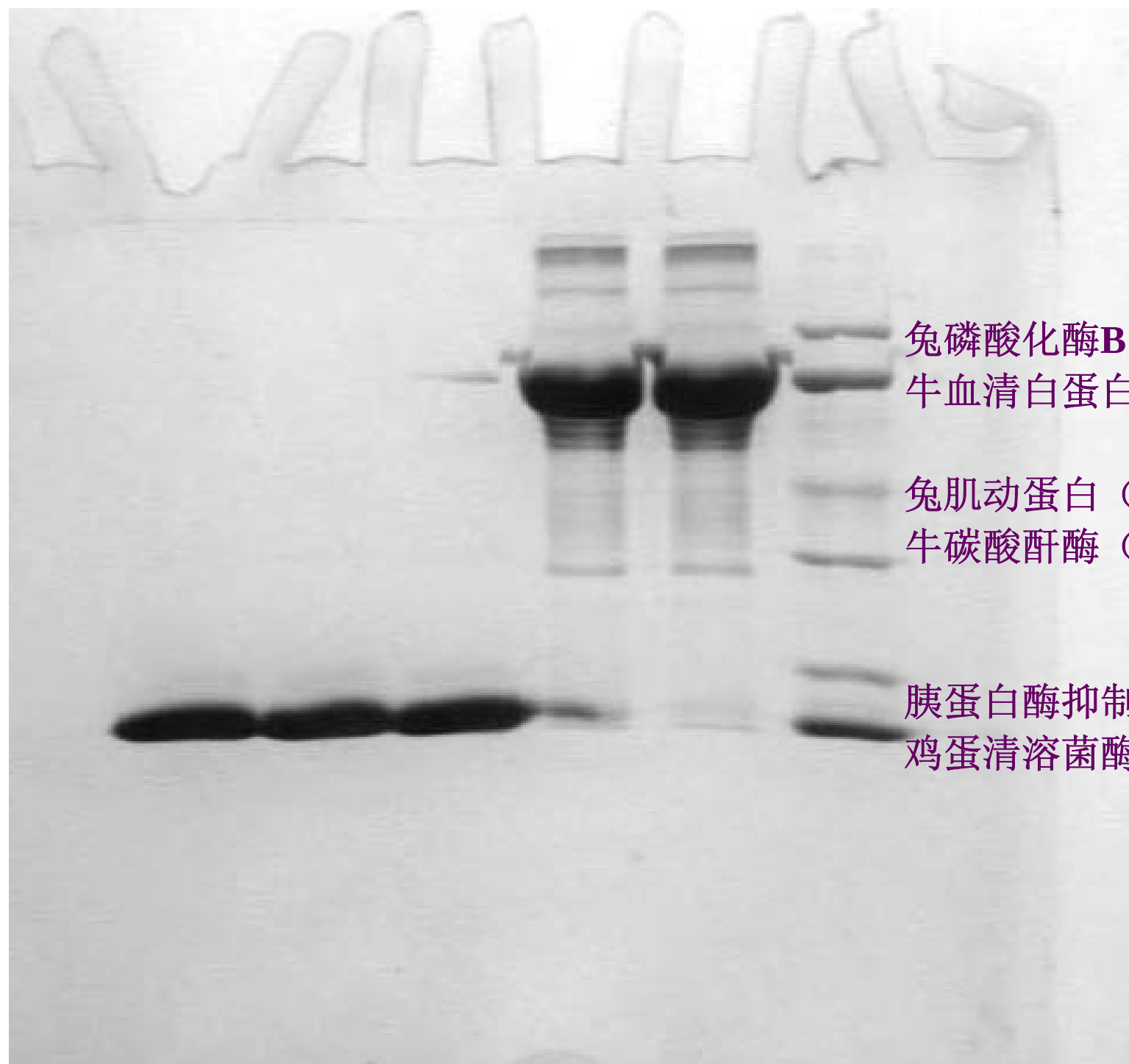
脱色：于脱色液
(7.5%冰乙酸，
5%甲醇) 中脱
色至蛋白带清
晰。



7. 照相、分析结果

根据标准蛋白的
相对迁移率和分子量
绘出标准曲线，计算
样品蛋白的分子量。





兔磷酸化酶B (97400)
牛血清白蛋白 (66200)

兔肌动蛋白 (43000)
牛碳酸酐酶 (31000)

胰蛋白酶抑制剂 (20100)
鸡蛋清溶菌酶 (14400)

8. 思考题

- 浓缩胶与分离胶的作用机制各是什么？
- 分离胶灌注完毕，以蒸馏水封闭的作用是什么？
- 根据实验结果，分析实验误差的可能原因。
- 如何配置1L 0.5mol/L Tris-HCl pH 6.8 缓冲液