



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: [real-times@163.com](mailto:real-times@163.com)

## 碱性蛋白非变性 PAGE 凝胶制备及电泳试剂盒 Basic Protein Native PAGE Gel Preparation and Electrophoresis Kit

Ver.730769

货号	名称	规格
RTD6131	碱性蛋白非变性 PAGE 凝胶制备及电泳试剂盒	50 次

### ● 产品组成:

序号	货号	名称	规格	保存条件
1	AC2913-01	30%PAA(29:1)	100 ml	4℃, 避光
2	RTD6131-02	4×碱性蛋白分离胶缓冲液 pH4.3	100 ml	4℃
3	RTD6131-03	4×碱性蛋白浓缩胶缓冲液 pH6.8	50 ml	4℃
4	RTD6131-04	100×分离胶促凝剂	2.5 ml	-20℃
5	AP020P	APS (干粉)	5 ml	RT
6	TA0761-01	TEMED	0.5 ml	4℃, 避光
7	PL110	5×甲基绿上样缓冲液	1 ml	-20℃
8	TG160P	5×碱性蛋白电泳缓冲液 (干粉)	1 L	RT

### ● 产品简介:

本公司提供的试剂盒包含碱性蛋白凝胶制备及电泳所需的全部试剂, 用户只需自备制胶器具和蒸馏水。本试剂盒可用于配制碱性蛋白非变性(native)PAGE 凝胶。本试剂盒可配制 30-50 块常规大小的非变性 PAGE 胶。

各种蛋白质分子由于所含的碱性氨基酸和酸性氨基酸的数目不同, 因而有各自的等电点。凡碱性氨基酸含量较多的蛋白质称为碱性蛋白质, 等电点偏碱性, 如组蛋白、精蛋白等。反之, 凡酸性氨基酸含量较多的蛋白质, 等电点就偏酸性。分离碱性蛋白时候, 要利用低 pH 凝胶系统, 分离酸性蛋白时候, 要利用高 pH 凝胶系统。酸性蛋白通常在非变性凝胶电泳中采用的 pH 是 8.8 的缓冲系统, 蛋白会带负电荷, 蛋白会向阳极移动; 而碱性蛋白通常电泳是在微酸性环境下进行, 蛋白带正电荷, 这时候需要将阴极和阳极倒置才可以电泳。

#### 特别说明:

1. 由于本系统采用非连续凝胶系统, 分离胶 pH 为 4.3, 因此要求待分离的蛋白等电点  $pI > 7.0$ , 这样碱性蛋白在酸性凝胶系统内带正电荷, 在凝胶电泳中才能正常向阴极泳动。如果待分离的蛋白等电点  $pI < 7.0$ , 请选择非连续 Laemmli 活性凝胶系统分离 (货号: RTD6130)。
2. **本试剂盒不适用于总蛋白样品的电泳, 也不适用于总蛋白分离后的 Western Blot 检测;** 推荐应用于纯化后蛋白的碱性蛋白电泳。

### ● 保存及运输:

按照标签温度贮存; 常温运输; 开封后一年有效。

### ● 使用说明:

#### 一 配制分离胶

根据目的蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度 (表一), 配制非变性 PAGE 的分离胶。

表一 不同浓度的 PAGE 分离胶的最佳分离范围

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

配制分离胶前，根据以下配方准备 10% APS:

#### 10% APS 配制-5 ml:

将 0.5 g APS 干粉溶于 5 ml 灭菌水中，彻底溶解后分装，1 ml/支，-20℃ 备存，每次取一管使用。10% APS 应尽量减少室温存放时间，以防失效。10% APS 在 4℃ 有效期为一周，-20℃ 有效期 6 个月。若发现凝胶聚合时间延长，应考虑更换使用 -20 度保存的 10% APS。

#### 制备分离胶步骤:

1. 根据下表，将不同体积的成分在小烧杯或试管中混合，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡
2. 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液（对于 mini-gel，凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5 cm 或距梳齿约 0.5 cm 即可），然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1-5 cm 的水层，使凝胶表面保持平整。
3. 静置 15-30 分钟，待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面后，说明凝胶已聚合。

注：凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。可以根据环境温度的不同调节 APS 的加入量。

表二 配制不同浓度分离胶所需各组分的体积(毫升)

组份	6% 分离胶 5 ml	8% 分离胶 5 ml	10% 分离胶 5 ml	12% 分离胶 5 ml	15% 分离胶 5 ml
灭菌水	2.7	2.4	2	1.7	1.2
4×分离胶缓冲液 pH4.3	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
30% PAA (29:1)	1	1.3	1.7	2	2.5
100×分离胶促凝剂	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
10% APS	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

#### 二 浓缩胶制备:

1. 去除覆盖在分离胶上的水层。
2. 按照表三将不同成分在一个小烧杯或试管中混合，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。
3. 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面，直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端。
4. 将梳子插入凝胶内，避免产生气泡。
5. 静置 30-60 分钟，等待浓缩胶聚合。注：凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。可以根据环境温度的不同调节 APS 的加入量。

表三 碱性蛋白 Native PAGE 浓缩胶(5%)配方表

组份	5%浓缩胶 (2 ml)
H <sub>2</sub> O	1.15
4×碱性蛋白浓缩胶缓冲液 pH6.8	0.5
30% PAA (29:1)	0.33
TEMED	0.002
10% APS	0.02

### 三 电泳:

凝胶凝固好后, 根据以下配方准备电泳缓冲液。

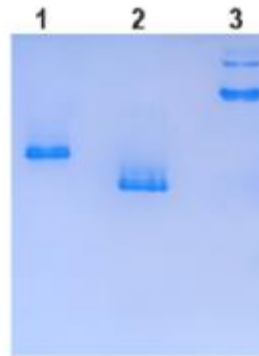
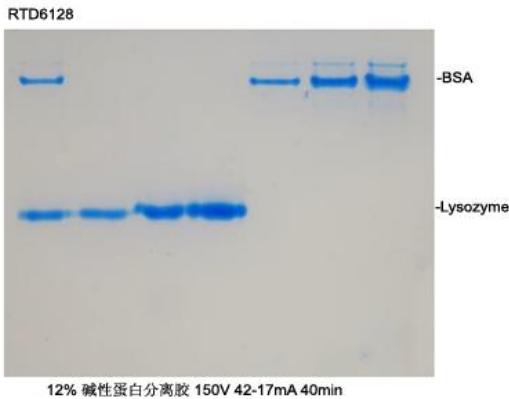
**5×碱性蛋白电泳缓冲液的配制-1 L:** 将 5×碱性蛋白电泳缓冲液干粉全部倒入 1L 烧杯中, 加入约 900 ml 水彻底溶解, 加入冰醋酸 11ml, 用水定容至 1 L, 即配成 5×碱性蛋白电泳缓冲液 (此溶液 pH 值约为 4.4)。

将 5×碱性蛋白电泳缓冲液稀释 5 倍即配成 1×碱性蛋白电泳缓冲液。在电泳槽的内槽内加入 1×碱性蛋白电泳缓冲液(让电泳缓冲液漫过加样孔), 轻轻的拨出梳子, 冲洗加样孔, 随后在电泳槽外槽加入适量的 1×碱性蛋白电泳缓冲液。上样, 把电泳电源的电源线互换, 即红色的阳极电极查到阴极孔, 黑色的阴极电极插到阳极孔, 按照表四条件, 电泳, 等指示前沿甲基绿电泳到分离胶下缘后, 结束电泳, 染色或者进行下一步实验。

表四 碱性蛋白电泳条件

恒电压	150V
起始电流	30-40mA/板胶
结束电流	10-20mA/板胶
电泳时间	40-45 分钟

### 四 实验示例:



Native Page 蛋白上样量为 3µg  
 lane 1. 带His标签蛋白, 45.5 kDa (SDS-PAGE), PI:7.85  
 lane 2. 带His标签蛋白, 47 kDa (SDS-PAGE), PI:7.29  
 lane 3. BSA

