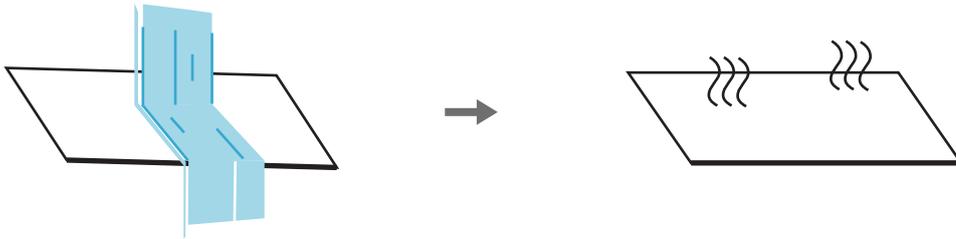


SDS-聚丙烯酰胺凝胶 电泳分离蛋白质

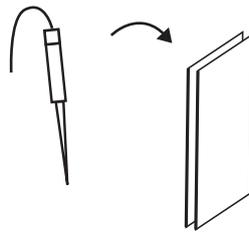
实验步骤

1 制备SDS-PAGE凝胶

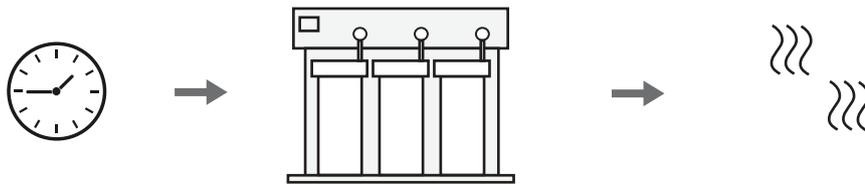
先将电泳玻璃板用水洗净,后用酒精擦拭,晾干。按说明安装玻璃板,并用去离子水检查玻璃板三边是否漏液。如漏液,则重新安装玻璃板再次试漏。



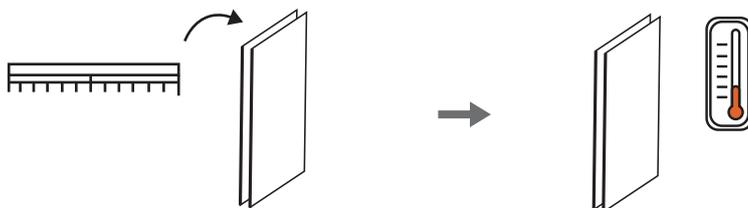
按照表3-2所示配制分离胶,最后加入TEMED,迅速向一个方向旋转混合物(防止气泡的产生),用1000 μ L微量移液器将其注入两块玻璃板之间的间隙中(灌至红色板的上边缘),然后在胶面上小心地覆盖一层异丙醇,进行封闭。



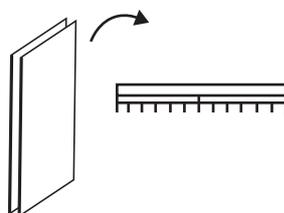
室温放置约40min至分离胶聚合,倒掉异丙醇覆盖液,用去离子水冲洗分离胶表面3~4次,以洗净未聚合的聚丙烯酰胺凝胶。倒掉去离子水,并用吸水纸吸干残留的水分。



按照表3-2所示配制浓缩胶,最后加入TEMED,迅速旋转混合。缓慢注满玻璃板间隙,插入样品梳(写有1cm的一侧向里,先插入一侧,再从一侧向另一侧压着插入,以排出气泡),垂直放置于室温。

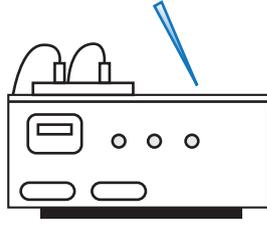


约30min聚合完成,平行拔出梳子,取出玻璃板,撕去封玻璃夹板的橡胶条。将玻璃夹板“凹”面贴紧电泳槽,并用夹子进行固定。

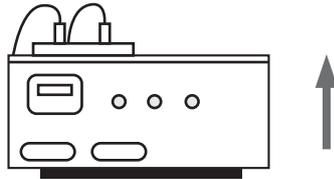


2 SDS-PAGE电泳

向电泳槽中加入300mL电泳缓冲液, 从左侧上样孔依次加入10 μ L IPTG诱导前样品(无DTT)、IPTG诱导前样品(有DTT)、IPTG诱导后样品(无DTT)、IPTG诱导后样品(有DTT)、5 μ L蛋白质marker, 其余空白孔加入适量的4 \times 蛋白上样缓冲液。

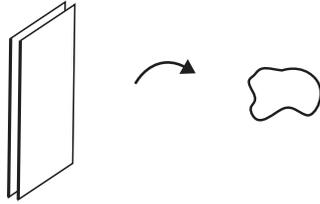


盖好盖子连接电源(红接红, 黑接黑), 慢慢调节电压为80V, 进行电泳。等溴酚蓝指示剂到达分离胶时, 把电压加大到150V, 至指示剂的蓝色条带迁移到凝胶的底部边缘时即可停止电泳。

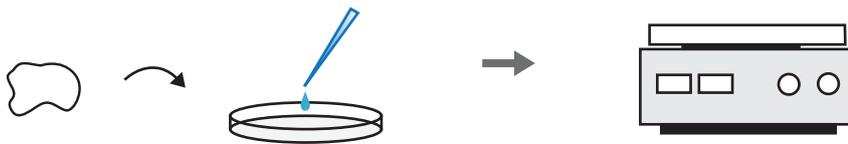


3 考马斯亮蓝染色、脱色

将玻璃板从电泳槽中卸下, 将其撬开, 取出凝胶, 去除浓缩胶, 并在右上角切掉个角, 以标记顺序。



将胶放入培养皿中, 加入约40mL染色液, 在脱色摇床上染色50min。



染色后, 将染色液进行回收, 先用水冲洗胶2~3次, 再加入脱色液进行脱色, 直至看到清晰的蛋白质带为止(一般为1~2天)。

