

SDS-PAGE 电泳的常见问题解析 (FAQ)

1. 关于凝胶的一些问题

1. 胶的凝结不好，例如有花纹特别是浓度高的胶在冬天温度较低的情况下，在分离胶的下部有波浪样的花纹，凝胶不均匀。解决方法：加大 TEMED 和过硫酸胺的量，使其凝结速度加快。同时洗干净玻璃板，防止有残留的胶干结在玻璃板上。
2. 胶不凝，解决方法：温度较低时加大 TEMED 和过硫酸胺的量，过硫酸胺必须新鲜配制。如若还是不行重新配制一下缓冲溶液。
3. 胶易碎，例如浓度较高的胶在染色和脱色过程以及扫描过程中破裂。解决方法：首先在上述过程中一定要动作轻缓，其次在室温较高的情况下可以适当减少 TEMED 和过硫酸胺的量。
4. 电泳完后胶上有很多长条纹的杂带，解决方法：建议电泳缓冲液不要回收利用。配制胶的溶液一定要纯。

2. 凝胶时间不对

通常胶在 30 分钟到 1 小时内凝。如果凝的太慢，可能是 TEMED，AP 剂量不够。如果凝的太快，可能是 AP 和 TEMED 用量过多，此时胶太硬易裂，电泳时易烧胶。

3. 浓缩胶与分离胶断裂、板间有气泡对电泳的影响

前者主要原因是拔梳子用力不均匀或过猛所致；后者是由于在解除制胶的夹子后，板未压紧而致空气进入引起的，一般对电泳结果不会有太大的影响。

4. 样品的处理

根据样品分离目的不同，主要有三种处理方法：还原 SDS 处理、非还原 SDS 处理、带有烷基化作用的还原 SDS 处理。

1. 还原 SDS 处理：在上样 buffer 中加入 SDS 和 DTT (或 Beta 巯基乙醇) 后，形成 SDS 与蛋白相结合的分

子。

2. 带有烷基化作用的还原 SDS 处理：碘乙酰胺的烷基化作用可以很好的保护 SH 基团，得到较窄的谱带；另碘乙酰胺可捕集过量的 DTT，而防止纹理现象的产生。100uL 样品缓冲液中加入 10uL20%的碘乙酰胺，并在 25°C下保藏 30min。
3. 非还原 SDS 处理：生理体液、血清、尿素等样品，一般只用 1%SDS 沸水中煮 3min，未加还原剂，因而蛋白折叠未被破坏，不可作为测定分子量来使用。

5. 条带两边翘起中间凹下的原因 (∩)

在较厚的凝胶中，由于凝胶不均匀冷却，中间部分凝固不好。

电泳系统温度偏高。

处理办法：待其充分凝固再作后续实验。

6. 条带两边向下中间鼓起的原因 (∪)

一般原因是两板之间的底部间隙气泡未排除干净，或聚合不完全。

处理办法：可在两板间加入适量缓冲液，以排除气泡。

7. 条带偏斜

原因：电极不平衡或者加样位置偏斜。

8. 条带两边扩散

原因：加样量过多。

9. 电泳的条带过粗

电泳中条带很粗是常见的事，主要是浓缩胶的原因。

处理办法：适当增加浓缩胶的长度；保证浓缩胶贮液的 pH 正确；适当降低电压。

10. 目的蛋白质条带模糊

1. 电泳凝胶浓度选择不当。
2. 低于 10Kd 的小分子蛋白质要用 Tricine 胶。

3. 靠近前沿的电泳带分辨率不佳。根据分子量与凝胶孔径的关系，选择适当浓度的凝胶。
4. 蛋白质样品水解。注意除去蛋白质样品的内源性的水解酶，不要反复冻融。
5. 电泳时间过长或过短。溴酚蓝达到分离胶的底部即应该关闭电泳电源。
6. 缓冲溶液、SDS 都要新鲜配制。
7. 避免加样过多，提高分辨率。小体积样品可给出窄带，加样体积根据样品浓度和凝胶厚度灵活掌握。一般上样体积为 10-15 μ L (即 2-10 μ g 蛋白质)。
8. 加热变性后的蛋白质样品要放置到室温即电泳，不要久放，因为蛋白质的二硫键在高温下可能是会断开，但是暴露于空气中温度降低会重新形成二硫键，而且可能在过久放置过程中蛋白质可能会再折叠，更不要扔到冰箱里保存。

11. “鬼带”的出现及处理

“鬼带”就是在跑构象复杂的蛋白质大分子时，在泳道顶端出现一些未知条带或在加样孔底部生成沉淀，这主要是因为还原剂在加热的过程中被氧化失活，使解离的蛋白质分子重新折叠和亚基重新缔合，由于其分子量通常要比目标条带大，所以会生成未知条带或沉淀。

处理办法：在加热煮沸后，再添加适量的 DTT 或 Beta 巯基乙醇，以补充不足的还原剂；或可加适量 EDTA 来阻止还原剂的氧化。

12. 拖尾现象

主要是样品溶解效果不佳或分离胶浓度过大引起的。

处理办法：加样前离心；选择适当的样品缓冲液，加适量样品促溶剂；电泳缓冲液时间过长，重新配制；降低凝胶浓度。

13. 纹理现象

主要是样品不溶性颗粒引起的。

处理办法：加样前离心；加适量样品促溶剂。

14. 溴酚蓝不能起到指示作用

我们在实验中有时会出现溴酚蓝已跑出板底，但蛋白质却还未跑下来的现象。

主要原因：缓冲液和分离胶的浓度过高。

处理办法：更换正确 pH 值的 Buffer；降低分离胶的浓度。

15. 甘氨酸在电极缓冲液中的作用

SDS-PAGE 中样品液和浓缩胶选 TRIS/HCL 缓冲液, 电极液选 TRIS/甘氨酸, 电泳开始后, HCL 解离成氯离子, 甘氨酸解离出少量的甘氨酸根离子。蛋白质带负电荷, 因此一起向正极移动, 其中氯离子最快, 甘氨酸根离子最慢, 蛋白居中。电泳开始时氯离子泳动率最大, 超过蛋白, 因此在后面形成低电导区, 而电场强度与低电导区成反比, 因而产生较高的电场强度, 使蛋白和甘氨酸根离子迅速移动, 形成以稳定的界面, 使蛋白聚集在移动界面附近, 浓缩成一中间层。

16. 电泳电压很高但电流很低

现象：电压 50v 以上, 可电流却在 5mA 以下。

主要原因：电泳槽没有正确装配, 电流未形成通路。包括：内外槽装反；外槽液过少等。

处理办法：正确装配电泳槽即可。

17. 如何提高 SDS-PAGE 电泳分辨率

使聚丙烯酰胺的充分聚合, 可以提高凝胶的分辨率。

建议做法：待凝胶在室温凝固后, 可在室温下放置一段时间使用。忌即配即用或冰箱放置, 前者易导致凝固不充分, 后者可导致 SDS 结晶。

18. 电泳时间比正常要长

可能是因为凝胶缓冲系统和电极缓冲系统地 PH 选择错误, 即缓冲系统地 PH 和被分离物质的等电点差别太小, 或缓冲系统的离子强度太高。

19. 配胶缓冲液系统在电泳中的影响

缓冲液在电泳过程中的主要作用是维持合适的 pH。电泳时正极与负极都会发生电解反应, 正极发生的是氧化反应, 负极发生的是还原反应, 长时间的电泳将使正极变酸, 负极变碱。缓冲液可以维持溶液两极的 pH 保持基本不变。在浓缩胶中, pH 环境呈弱酸性, 因此甘氨酸解离很少, 泳动效率低; 而 CL 离子却很高, 两者之间形成导

电性较低的区域，蛋白分子就介于二者之间泳动并聚集到一起，浓缩为一狭窄的区域。所以，pH 对整个反应体系的影响是至关重要的，实验中在排除其他因素之后仍不能很好解决问题的情况，应首要考虑该因素。

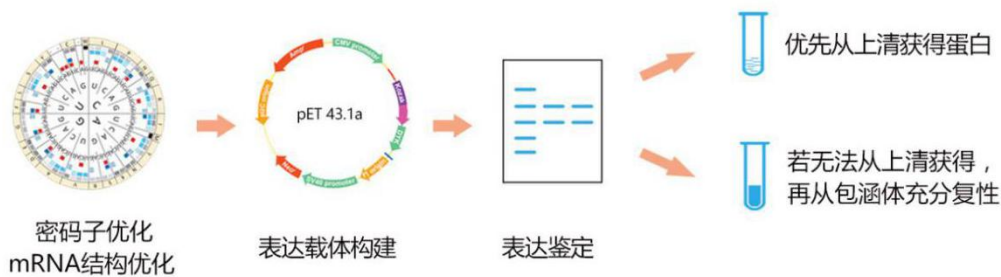
更多蛋白表达系统的技术难点可参考[蛋白表达专题](#)

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

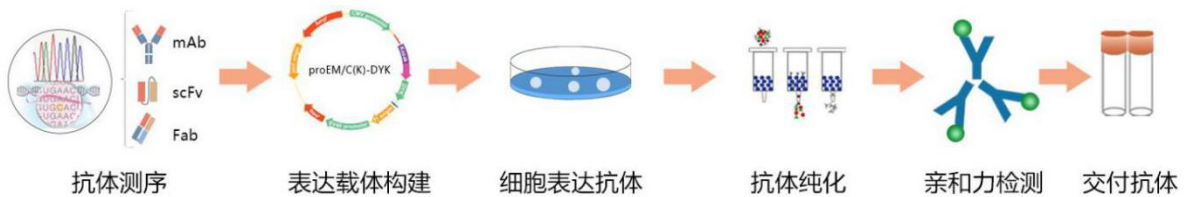
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

