

## SDS-PAGE 电泳的基础原理和实验步骤

### 概述

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 ( sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis , 简称 SDS-PAGE ) 是聚丙烯酰胺凝胶电泳中最常用的一种[蛋白表达](#)分析技术。此项技术的原理, 是根据检体中蛋白质分子量大小的不同, 使其在电泳胶中分离。在[大肠杆菌表达纯化](#)外源蛋白的实验中, SDS-PAGE 更是必不可少的操作, 其通常用于检测蛋白的表达情况 ( 表达量, 表达分布 ), 以及分析目的蛋白的纯度等。

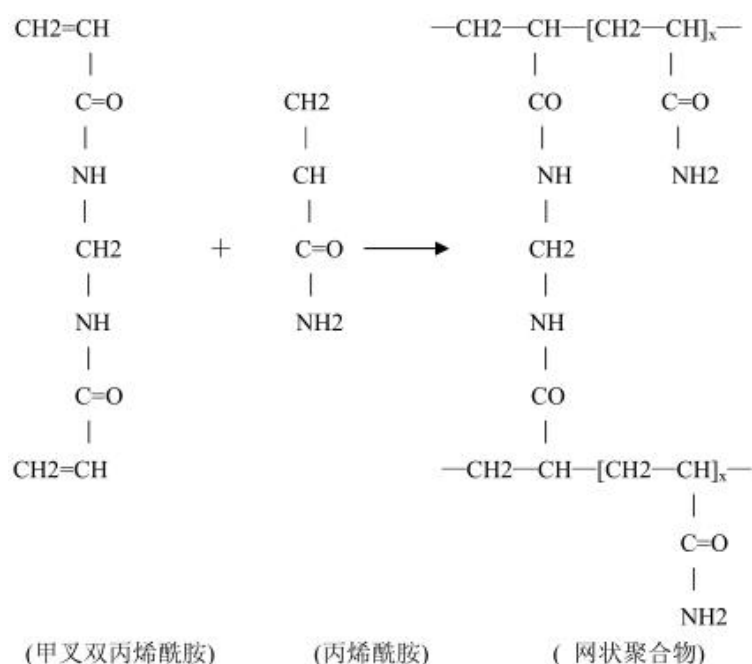
### SDS-PAGE 作用机理

蛋白中含有很多的氨基 ( + ) 和羧基 ( - ), 不同的蛋白在不同的 pH 值下表现出不同的电荷, 为了使蛋白在电泳中的迁移率只与分子量有关, 我们在上样前, 通常会进行一些处理 ( 上样缓冲液 )。即在样品中加入含有 SDS 和  $\beta$ -巯基乙醇的上缓冲液。SDS 即十二烷基磺酸钠 (  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3-\text{Na}^+$  ), 是一种阴离子表面活性剂, 它可以断开分子内和分子间的氢键, 破坏蛋白质分子的二级和三级结构;  $\beta$ -巯基乙醇是强还原剂, 它可以断开半胱氨酸残基之间的二硫键。电泳样品加入样品处理液后, 经过高温处理, 其目的是将 SDS 与蛋白质充分结合, 以使蛋白质完全变性和解聚, 并形成棒状结构同时使整个蛋白带上负电荷; 另外样品处理液中通常还加入溴酚蓝染料, 用于监控整个电泳过程; 另外样品处理液中还加入适量的蔗糖或甘油以增大溶液密度, 使加样时样品溶液可以快速沉入样品凹槽底部。当样品上样并接通两极间电流后 ( 电泳槽的上方为负极, 下方为正极 ), 在凝胶中形成移动界面并带动凝胶中所含 SDS 负电荷的多肽复合物向正极推进。样品首先通过高度多孔性的浓缩胶, 使样品中所含 SDS 多肽复合物在分离胶表面聚集成一条很薄的区带 ( 或称积层 )。

电泳启动时, 蛋白样品处于 pH6.8 的上层, pH8.8 的分离胶层在下层, 上槽为负极, 下槽为正极。出现了 pH 不连续和胶孔径大小不连续: 启动时  $\text{Cl}^-$  解离度大,  $\text{Pro}^-$  解离度居中, 甘 aa  $\text{COO}^-$  解离度小, 迁移顺序为 ( pH6.8 )  $\text{Cl}^- > \text{Pro}^- > -\text{COO}^-$ 。在  $\text{Cl}^-$  与  $\text{Pro}^-$  之间和  $\text{Pro}^-$  与  $-\text{COO}^-$  之间都将出现低离子区, 同时也出现高电势, 高电势迫使  $\text{Pro}^-$  向  $\text{Cl}^-$  迁移,  $-\text{COO}^-$  向  $\text{Pro}^-$  迁移。如: 一个  $\text{Cl}^-$  领路,  $-\text{COO}^-$  推动, 蛋白在中间, 这样就起到浓缩的作用了。在浓缩胶运动中, 由于胶联度小, 孔径大,  $\text{Pro}^-$  受阻小, 因此不同的蛋白质就浓缩到分离胶之上成层, 起浓缩效应, 使全部蛋白质处于同一起跑线上。当蛋白质进入分离胶时, 此时  $\text{Pro}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , 甘 aa 离子在 pH8.8 的溶液中,  $\text{Cl}^-$  完全电离而很快到达正极, 甘 aa 电离度加大很快跃过蛋白质, 而到达正极, 只有蛋白质分子在分离

胶中较为缓慢的移动。由于  $\text{Pro}^-$  在电泳过程中，受到溶液离子的变化而 pH 值发生变化，但每一瞬间，其所带电荷数除以单位质量是不同的，所以带负电荷多者迁移快，反之则慢，这就现了电荷效应。由于胶孔径小，而且成为一个整体的筛状结构，它们对大分子阻力大，小分子阻力小，起着分子筛效应，也就是蛋白质在分离胶中，以分子筛效应和电荷效应而出现迁移率的差异，最终达到彼此分开。

PAGE 胶的聚合原理：甲叉双丙烯酰胺和丙烯酰胺在过硫酸胺的作用下聚合，形成胶，如下图：



**注：**催化剂：过硫酸铵（AP）在隔氧的状态下，最好现配现用，使用新鲜的。

加速催化剂：TEMED，四甲基乙二胺。催化剂的作用是使单体聚合成网状聚合物。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶的分离范围：

15	10 ~ 43
12	12 ~ 60
10	20 ~ 80
7.5	36 ~ 94
5.0	57 ~ 212

## 试剂及主要器材

通常在 SDS-PAGE 电泳实验中用到以下几种试剂：

### 1、主要试剂

- 30%凝胶贮备液：丙烯酰胺 (Acr) 29.2g，亚甲基双丙烯酰胺 (Bis) 0.8g，加双蒸水至 100mL。外包锡纸，4°C冰箱保存，30 天内使用。
- 分离胶缓冲液 (1.5Lmol / L)：Tris 18.17g，加双蒸水溶解，6mol/L HCl 调 pH8.8，定容 100mL。4°C冰箱保存
- 浓缩胶缓冲液 (0.5LLmol / L)：Tris 6.06g，加水溶解，6mol/L HCl 调 8，并定容到 100mL。4°C冰箱保存
- 电极缓冲液 (pH8.3)：SDS 1g，Tris 3g，Gly 14.4g，加双蒸水溶解并定容到 1000mL。4°C冰箱保存。
- 10%SDS，室温保存
- 质量浓度 10%过硫酸铵 (新鲜配制)
- 上样缓冲液：5Lmol / L Tris-HCl pH6.8 1.25mL，甘油 2mL，10%SDS 2mL，β-巯基乙醇 1mL，0.1% 溴酚蓝 0.5mL，加蒸馏水定容至 10mL。
- 考马斯亮蓝 R-250 染色液 (1L)：1g 考马斯亮蓝 R250，加入 450 甲醇，100mL 冰醋酸
- 脱色液 (1L)：100mL 甲醇，100mL 冰醋酸
- 未知分子量的蛋白质样品 (1mg / mL )

### 2、实验器材

- 垂直板电泳槽
- 电泳仪
- 长滴管及微量加样器
- 烧杯 (250mL、500mL)、量筒 (500mL、250mL)、培养皿 (15cm×15cm)
- 枪头 (1mL、200ul、10ul)
- 注射器等

SDS-PAGE 所需溶液：

A 液——30%丙烯酰胺 (W/V) : 丙烯酰胺 29.2g, N-N-甲叉双丙烯酰胺 0.8g, 加入去离子水定容至 100mL, pH 值不能超过 7.0, 过滤于棕色玻璃瓶中 4°C 贮存。

B 液——1.5mol/L Tris-HCl, pH8.8 : 18.17g (9.09g) Tris 碱, 溶于 60mL (30mL) 去离子水中, 加入约 3mL (1.5mL) 以上的浓盐酸调节 pH 值至 8.8, 定容至 100mL (50mL)。

C 液——1.5mol/L Tris-HCl, pH6.8 : 12.1g (6.05g) Tris 碱, 溶于 60mL (30mL) 去离子水中, 加入约 7mL (3.5mL) 以上的浓盐酸调节 pH 值至 6.8, 定容至 100mL (50mL)。

D 液——10%SDS : 10g (2g) SDS 溶于去离子水中, 定容至 100mL (20mL), 加热至 68°C 助溶。

E 液——10%过硫酸铵 : 5g (0.5g) 过硫酸铵, 溶于 50mL (5mL) 去离子水中; 现配现用或分装至 0.5mL 离心管中冷冻备用。

F 液——TEMED (N-N-N'-N' - 四甲基乙二胺) 原液, 低温保存。

聚丙烯酰胺 (Acrylamide) 的作用: 丙烯酰胺与为蛋白质电泳提供载体, 其凝固的好坏直接关系到电泳成功与否, 与促凝剂及环境密切相关。

制胶缓冲液: 浓缩胶选择 pH6.7, 分离胶选择 pH8.9, 选择 TRIS-HCL 系统。

TEMED 与 AP: AP 提供自由基, TEMED 是催化剂, 催化自由基引起的聚合反应进行。

十二烷基硫酸钠 (SDS): 阴离子去污剂, 作用有四: 去蛋白质电荷、解离蛋白质之间的氢键、取消蛋白分子内的疏水作用、去多肽折叠。

**注意:** 丙烯酰胺具有很强的**神经毒性**并可以通过皮肤吸收, 其作用具累积性。称量丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺 (N,N'-Methylenebisacrylamide) 时应戴手套和面具。可认为聚丙烯酰胺无毒, 但也应谨慎操作, 因为它还可能含有少量未聚合材料。

## SDS-PAGE 实验标准操作流程

### 1. 清洗玻璃板

一只手扣紧玻璃板, 另一只手蘸点洗衣粉 轻轻擦洗。两面都擦洗过后用自来水冲, 再用蒸馏水冲洗干净后立在筐里晾干。

### 2. 灌胶与上样

- 玻璃板对齐后放入夹中卡紧。然后垂直卡在架子上准备灌胶。(操作时要使两玻璃对齐, 以免漏胶。)

- 配 12%分离胶，加入 TEMED 后立即摇匀即可灌胶。灌胶时，可用 3mL 的吸管或 10mL 枪吸取适量的胶沿玻璃放出，待胶面升到绿带中间线高度时即可。然后胶上加一层水，液封后的胶凝的更快。（灌胶时开始可快一些，胶面快到所需高度时要放慢速度。操作时胶一定要沿玻璃板流下，这样胶中才不会有气泡。加水液封时要很慢，否则胶会被冲变形。）

分离胶和浓缩胶的制备：按下表中溶液的顺序及比例，配置 12%的分离胶和 5.1%的浓缩胶。

试剂名称	12%的分离胶 ( 8 块, 35mL )	5.1%的浓缩胶 ( 8 块, 12mL )
30%凝胶贮备液/mL	14	2
分离胶缓液 ( pH8.8 ) /mL	8.75	
浓缩胶缓冲液 ( pH6.8 ) /mL		3
双蒸水/mL	12.25	6.9
10%过硫酸铵/ul	175	100
TEMED/ul	15	10

注：分离胶与浓缩胶的浓度计算公式：

$$A\% \cdot V_a / V_{\text{总}} = C, \quad A\% \text{ 为 } 30\% \text{ 凝胶贮备液, 例如, } 12\% \text{ 的分离胶: } 0.3 \cdot 10 / 25 = 12\%$$

- 当水和胶之间有一条折射线时，说明胶已凝了。再等 3min 使胶充分凝固就可倒去胶上层水并用吸水纸将水吸干。
- 按前面方法配 5.1%的浓缩胶,加入 TEMED 后立即摇匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中。灌胶时也要使胶沿玻璃板流下以免胶中有气泡产生。插梳子时要使梳子保持水平。由于胶凝固时体积会收缩减小，从而使加样孔的上样体积减小，所以在浓缩胶凝固的过程中要经常在两边补胶。待到浓缩胶凝固后，两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出。
- 用水冲洗一下浓缩胶，将其放入电泳槽中。（小玻璃板面向内，大玻璃板面向外。若只跑一块胶，那槽另一边要垫一块塑料板且有字的一面面向外。）
- 测完蛋白含量后，计算含 50 $\mu$ g 蛋白的溶液体积即为上样量。取出上样样品至 0.5mL 离心管中，加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液至终浓度为 1 $\times$ 。（上样总体积一般不超过 15 $\mu$ l，加样孔的最大限度可加 20 $\mu$ l 样品。）上样前要将样品于沸水中煮 5min 使蛋白变性。

- 加足够的电泳液后开始准备上样。（电泳液至少要漫过内测的小玻璃板。）用微量进样器贴壁吸取样品，将样品吸出不要吸进气泡。将加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品。（加样太快可使样品冲出加样孔，若有气泡也可能使样品溢出。加入下一个样品时，进样器需在外槽电泳缓冲液中洗涤 3 次，以免交叉污染。

### 3. 电泳

加样完毕，盖好上盖，连接电泳仪，打开电泳仪开关后，样品进胶前电压控制在 100 ~ 200V，大约 15 ~ 20min；样品中的溴酚蓝指示剂到达分离胶之后，电压升到 200V，电泳过程保持电压稳定。当溴酚蓝指示剂迁移到距前沿 1 ~ 2cm 处即停止电泳，约 0.5-1 小时。如室温高，打开电泳槽循环水，降低电泳温度。

电泳。

### 4. 染色、脱色

电泳结束后，关掉电源，取出玻璃板，在长短两块玻璃板下角空隙内，用刀轻轻撬动，即将胶面与一块玻璃板分开，然后轻轻将胶片托起，指示剂区带中心插入铜丝作为标志，放入大培养皿中染色，使用 0.25% 的考马斯亮蓝染液，染色 2 ~ 4h，必要时可过夜。

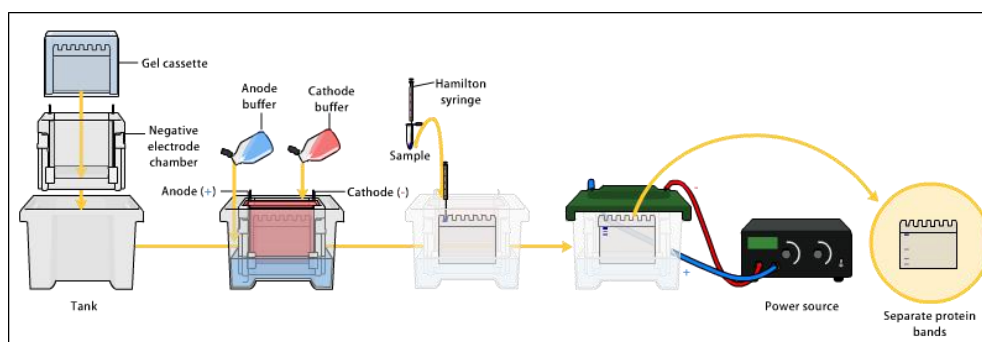
弃去染色液，用蒸馏水把胶面漂洗几次，然后加入脱色液，进行扩散脱色，经常换脱色液，直至蛋白质带清晰为止。

### 5. 结果处理

- 测量脱色后凝胶板的长度和每个蛋白质样品移动距离（即蛋白质带中心到加样孔的距离），测量指示染料迁移的距离。
- 按以下公式计算蛋白质样品的相对迁移率（Rm）

$$\text{相对迁移率} = \text{样品迁移距离 (cm)} / \text{染料迁移距离 (cm)}$$

- 标准曲线的制作：以各标准蛋白质相对迁移率为横坐标，蛋白质分子量的对数为纵坐标在半对数坐标纸上做图，得到一条标准曲线。
- 测定蛋白质样品的分子量：根据待测蛋白质样品的相对迁移率，从标准曲线上查得该蛋白质的分子量。



## 注意事项

- APS 和 TEMED 是促凝的，根据温度加入的量是可以变动，一般不超过 30%。
- 玻璃板一定要洗干净，否则制胶是会有气泡。
- 聚丙烯酰胺具有神经毒性，操作时注意安全，戴手套。（凝胶以后，聚丙烯酰胺毒性降低。）
- 凝胶的时间要严格控制好，一般在 20-30min。
- 点样时，如果孔比较多，尽量点在中央。（点在边上时，跑出的带是斜的）
- 点样前要排尽胶底部的气泡，防止干扰电泳。
- 电泳结束后，取胶时，小心把玻璃板翘起（防止再次落下）。
- 脱色时，尽量多次进行换水。
- 上样量不宜太高，蛋白含量每个孔控制在 10 $\mu$ g-50 $\mu$ g，一般 < 15 $\mu$ l。
- 做胶时，凝胶时间控制在 25min。梳子需一次平稳插入,梳口处不得有气泡,梳底需水平。
- 上样时，Marker 最好标在中间，边上的孔尽量不要上样。
- 制胶时，在加 APS 前尽量不要搅拌，加入 APS 后可以轻轻搅拌，不要产生气泡。
- 分离胶缓冲液的 pH 一定要准确，尽量在 20 $^{\circ}$ C 左右调掉 8.8
- 安装电泳槽时要注意均匀用力旋紧固定螺丝，防止夹坏玻璃板，避免缓冲液渗漏。
- 凝胶配制过程要迅速，催化剂 TEMED 要在注胶前再加入,否则凝结无法注胶。注胶过程最好一次性完成,避免产生气泡。
- 微量注射器（加样器）上样时，注射器不可过低,以防刺破胶体；也不可过高，样品下沉时易发生扩散，溢出加样孔。
- 剥胶时要小心,保持胶完好无损,染色要充分。

注意：温度，时间，光照，APS 和 TEMED 都会对凝胶产生影响

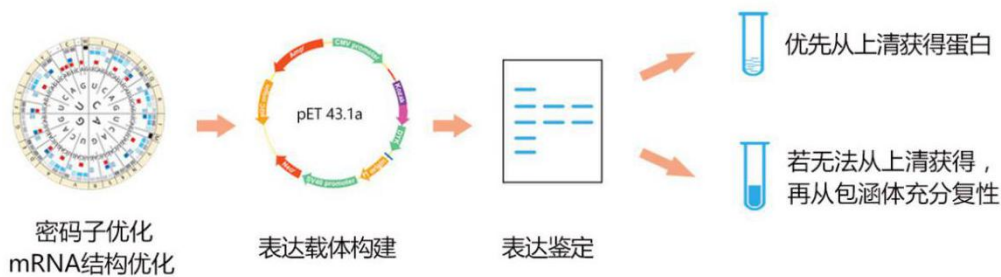
查看 SDS-PAGE 实验 FAQ：[SDS-PAGE 常见问题 \(FAQ\)](#)

## 南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

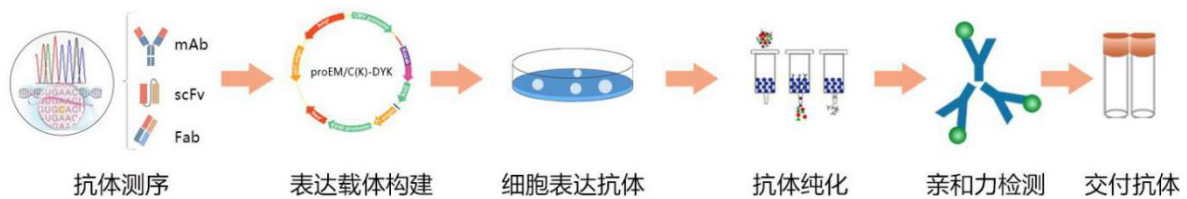
### 一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



### 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

