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。

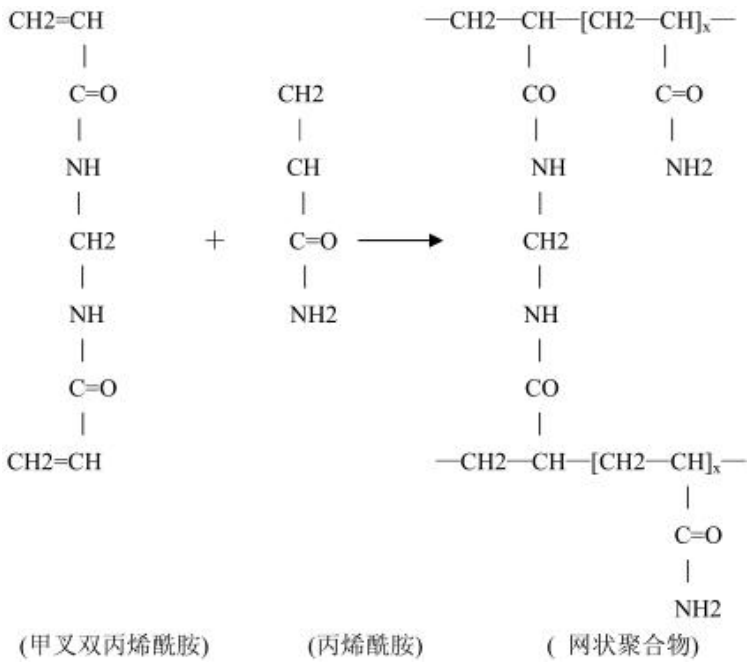
SDS-PAGE 作用机理

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 β-巯基乙醇的上缓冲液。SDS 即十二烷基磺酸钠（CH3-（CH2）10-CH2OSO3- 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； β-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 Cl^-解离度大，Pro^-解离度居中，甘 aaCOO^-解离度小，迁移顺序为（pH6.8）Cl^-> Pro^- >—COO^-。在 Cl^-与 Pro^-之间和 Pro^-与—COO^-之间都将出现低离子区，同时也出现高电势，高电势迫使 Pro^-向 Cl^-迁移，—COO^-向 Pro^-迁移。如：一个 Cl^-领路，—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，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 Pro^-，Cl^-，甘 aa 离子在 pH8.8 的溶液中，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 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℃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℃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℃冰箱保存

  电极缓冲液（pH8.3）：SDS lg，Tris 3g，Gly 14.4g，加双蒸水溶解并定容到 1000mL。4℃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，加蒸馏水定溶至 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、500m1）、量筒（500mL、250m1）、培养皿（15cm´l5cm）
- 枪头（1mL、200ul、10ul）
- 注射器等

SDS-PAGE 所需溶液：

A 液——30%丙稀酰胺（W/V）：丙稀酰胺 29.2g，N-N-甲叉双丙稀酰胺 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℃贮存。

B 液——1.5mol/L Tris·HCl，pH8.8：18.17g（9.09g）Tirs 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）Tirs 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℃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，因为它还可能会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，否则胶会被冲变型。）

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%*Va/V 总 =C ，A%为 30%凝胶贮备液，例如，12%的分离胶：0.3*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 50μg 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×SDS 上样缓冲液至终浓度为 1×。（上样总体积一般不超过 15μl，加样孔的最大限度可加 20μl 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。

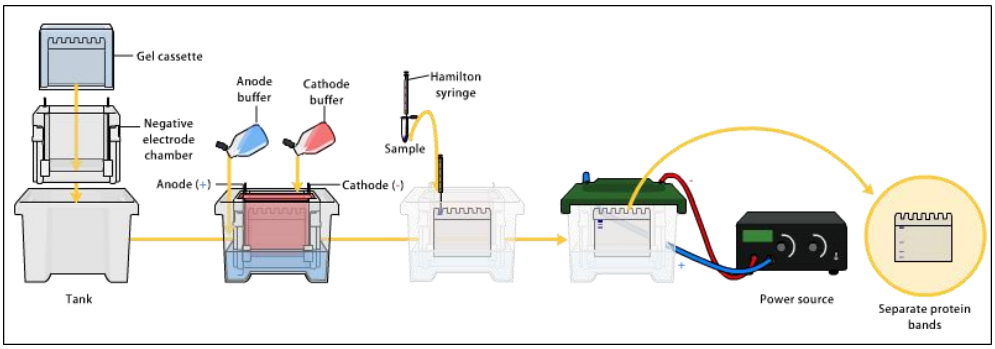
弃去染色液，用蒸馏水把胶面漂洗几次，然后加入脱色液，进行扩散脱色，经常换脱色液，直至蛋白质带清晰为止。

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）

相对迁移率 = 样品迁移距离（cm）/ 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 10μg-50μg,，一般 < 15μl。
- 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℃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）

更多优质服务推荐

1 SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务，利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台，实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象，从动物免疫到获得单抗，快至29天，比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势

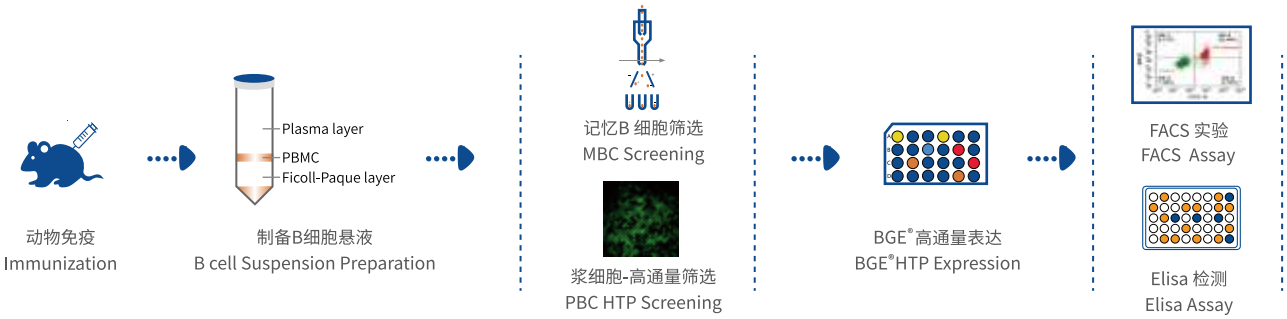
- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选，保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高，无需刺激培养，减少多样性损失
- 重轻链天然配对，亲和力更优
- 高通量，周期短，单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种

小鼠　兔　羊驼　人源化小鼠

猪　犬　绵羊　人

服务流程



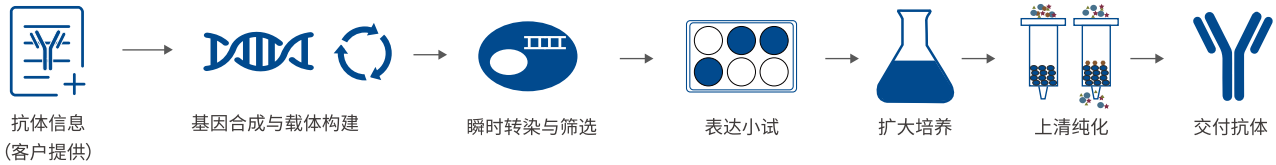
Recombinant Antibody Expression Service

2 重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、$(Fab')_2$、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势

服务流程

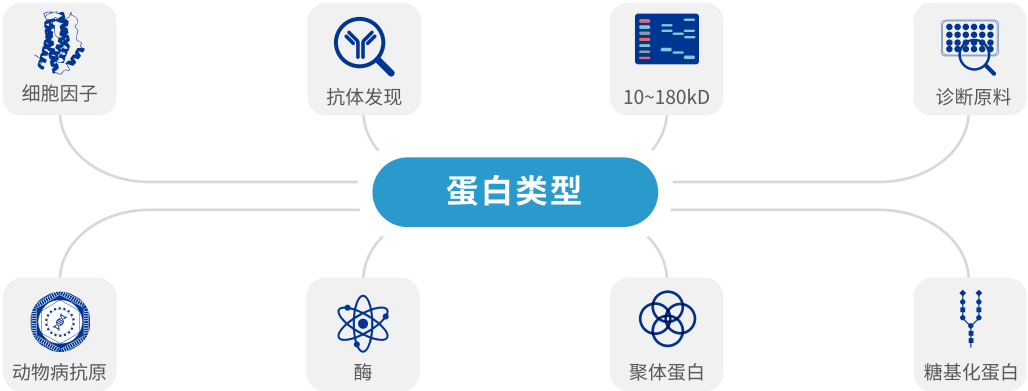


Recombinant Protein Expression Service

3 重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service
杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术，能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

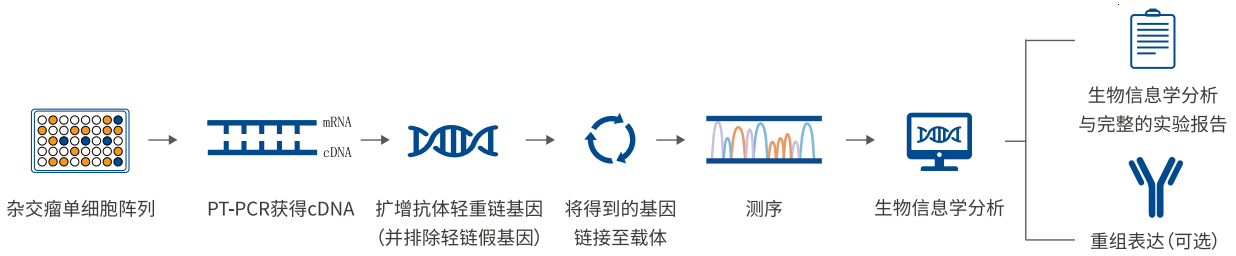
应用场景

- 抗体序列保护：获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份：杂交瘤存在退化转阴风险，抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造：获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验：测序5天，表达5天，全程高通量
- 细胞需求少：只需1~5个细胞，可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确：采用Failsafe®假基因排除技术，可排除κ轻链假基因
- 测序范围广：可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务：德泰生物拥有丰富经验，可提供表达验证服务

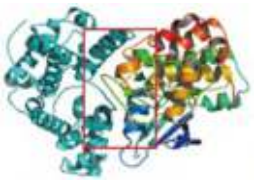
服务流程



5 Biomolecular Interaction Analysis Service
分子间相互作用检测

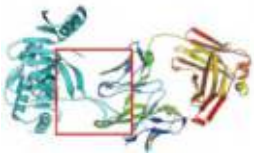
德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振（SPR）平台及生物膜干涉技术（BLI）平台，能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down，免疫共沉淀，酵母双杂交等相比，具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围


蛋白和蛋白

蛋白和小分子

蛋白和抗体


蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6 Antibody Humanization Service
抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法，通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算，获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势

- 重链和轻链同时参与优化
- 改造后的抗体人源化程度>90%
- 人源化抗体的亲和力与初始抗体相当
- 可进行多物种的抗体人源化

服务流程

1. Antibody sequence confirmation
2. Human germline acceptor selection
3. CDR grafting
4. Back mutation
5. Mutation energy ranking
6. Antibody expression
7. Affinity ranking

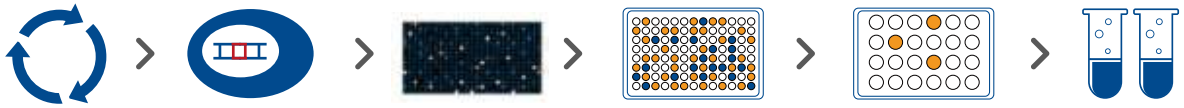
7 Stable Cell Line Development Service
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务，筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台，较传统筛选流程快近100天，大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



基因合成&质粒抽提 > 稳定转染 > On-chip筛选 > 压力筛选 > 扩大培养 > 交付单克隆细胞株

服务优势

更快的筛选速度	百k级筛选通量	可视化筛选结果	稳定高产
从DNA到细胞株 较传统方法快近100天	一次筛选640k细胞 优选高表达细胞株	先进DeepLight®平台 高表达细胞株实时成像	可稳定转代50代 重组单抗可达5 g/L