

SDS-PAGE 蛋白质样品的制备

将收集的各样品加入等体积的 2×SDS-PAGE Loading Buffer，煮沸裂解 5min，冰浴 2min，12,000rpm 离心 10min，取上清-20℃保存备用。

SDS-PAGE 蛋白质电泳（参照分子克隆实验指南操作）(萨姆布鲁克,2002)

1) 按照电泳装置的使用说明，装好洁净干燥的玻璃板。

2) 分离胶的制备

按下列成分配制10mL 12%分离胶：

| | |
|--------------------|----------|
| ddH ₂ O | 3.3 mL |
| 30%丙烯酰胺混合液 | 4.0 mL |
| 1.5M Tris(pH8.8) | 2.5 mL |
| 10%SDS | 0.1 mL |
| 10%过硫酸铵 | 0.1 mL |
| TEMED | 0.004 mL |
| <hr/> | |
| 总体积 | 10 mL |

各成分加入后迅速旋涡混匀，用微量移液器将其小心地注入准备好的玻璃板间隙中，并为积层胶留出足够空间。轻轻在顶层加入一薄层水封顶，以防止空气中的氧对凝胶聚合的抑制作用。凝胶聚合完成后，倒掉覆盖的水层，用水清洗凝胶顶部数次，用滤纸吸干凝胶顶端的水。

3) 积层胶的制备

按下列成分配制2mL 5%的积层胶：

| | |
|--------------------|--------|
| ddH ₂ O | 1.4mL |
| 30%丙烯酰胺混合液 | 0.33mL |
| <hr/> | |

| | |
|------------------|---------|
| 1.0M Tris(pH6.8) | 0.25mL |
| 10%SDS | 0.02mL |
| 10%过硫酸铵 | 0.02mL |
| TEMED | 0.002mL |
| <hr/> | |
| 总体积 | 2mL |

各成分加入后迅速旋涡混匀，用微量移液器将其灌注到分离胶上，灌满后小心插入加样梳，尽可能避免产生气泡。

4) 待积层胶凝固后，小心拔下梳子。

5) 将凝胶固定于电泳装置上，加入足量的1×Tris-甘氨酸电泳缓冲液，在加样孔中分别加入20μL各样品。

6) 样品在积层胶中电泳时，使用80V电压，待溴酚蓝带进入分离胶后，将电压升至120V，继续电泳直至溴酚蓝带到达分离胶的底部且开始泳出胶底面，关闭电源。

7) 卸下凝胶，将其浸泡在至少5倍体积的考马斯亮蓝R-250染色液中，置水平摇床上室温染色至少4h，之后取出染色的凝胶并回收染液，以备再用，将凝胶浸泡于考马斯亮蓝脱色液中，在水平摇床上脱色4~8h，其间更换脱色液3~4次，直至凝胶脱色到条带清晰为止，观察记录结果并拍照。