



## Mini P-4 型电泳槽

# 使用手册



---

北京凯元信瑞仪器有限公司

地址：北京市宣武门外大街 28 号富卓大厦 B 座 605 电话：8610-63015080 传真：63015596 Website: [www.kysino.cn](http://www.kysino.cn)

# 目录

		页码
<b>第一章</b>	<b>总论</b>	<b>1</b>
1.1	简介	1
1.2	产品组成	1
1.3	技术规格	3
1.4	安全须知	4
<b>第二章</b>	<b>组装及基本操作</b>	<b>5</b>
2.1	凝胶板准备	5
2.2	电泳模块组装与上样	7
<b>第三章</b>	<b>分离原理与条件优化</b>	<b>10</b>
3.1	引言	10
3.2	SDS-PAGE (Laemmli) 缓冲液体系	11
3.3	Native PAGE	11
<b>第四章</b>	<b>试剂准备和储液配制</b>	<b>12</b>
4.1	每块凝胶的体积	12
4.2	SDS-PAGE (Laemmli) 缓冲液体系	12
4.3	不连续 Native PAGE (Omstein-Davis)	14
4.4	连续 Native PAGE	16
<b>第五章</b>	<b>参考书目</b>	<b>17</b>
<b>第六章</b>	<b>日常维护</b>	<b>18</b>
<b>第七章</b>	<b>故障排除</b>	<b>18</b>
<b>第八章</b>	<b>产品信息与配件</b>	<b>20</b>
<b>第九章</b>	<b>质量保证</b>	<b>21</b>

## 第一章 总论

### 1.1 简介

Mini P-4 型电泳槽可以运行预制胶和手工灌制的凝胶，最多可容纳 4 块凝胶同时运行；兼容 1-D 和 2-D 电泳应用。Mini P-4 型电泳槽带有制胶架和带固定边条的玻璃板，使得手工灌制凝胶变得简便，并防止漏胶。电泳槽可运行 1-4 块凝胶，并允许凯元 (CAVOY) 其他电极模块（例如 Mini TBC 模块）公用槽体。

### 1.2 产品构成

为得到 Mini P-4 电泳槽的最佳使用效果，请在使用前熟悉电泳槽各部件及其组装与分解操作。（参见图 1 和图 2）

带固定边条的玻璃板	指较高并带有永久固定边条的玻璃板。边条的厚度有 0.75；1.0；1.5 毫米三种，并被直接显示于玻璃板上。
短玻璃板	是较短的平玻璃板。与带固定边条的玻璃板组合成凝胶三明治夹。
灌胶框	灌胶前放置于桌面上使带边条的玻璃板和短玻璃板对齐并确保其组成凝胶三明治夹。
凝胶夹组件	一个夹胶框、一块带边条玻璃板和一块短玻璃板。
制胶架	保证凝胶夹组件在灌胶过程中不漏胶。包括使凝胶组件密封于灌胶垫上的压力杠杆。
凝胶三明治	带边条的玻璃板和短玻璃板以及其中的聚合凝胶。
缓冲液挡板	透明模压挡板。用于做 1 或 3 块胶时
电极芯	把持凝胶三明治，并提供 U 型密封垫以及上、下电极和电极连接插头。正极（下电极）以红色表示，负极（上电极）以黑色表示。
共用组件	运行 3 块或 4 块胶的必备组件。把持凝胶三明治，并提供 U 型密封垫以及上、下电极。
缓冲液槽与上盖	缓冲液槽与上盖在电泳过程中完全闭合以确保电泳正常进行，上盖打开即切断电路。槽与上盖同时兼容其它电泳模块，如：转移电泳、2-D 的第一向电泳、电泳洗脱等等。

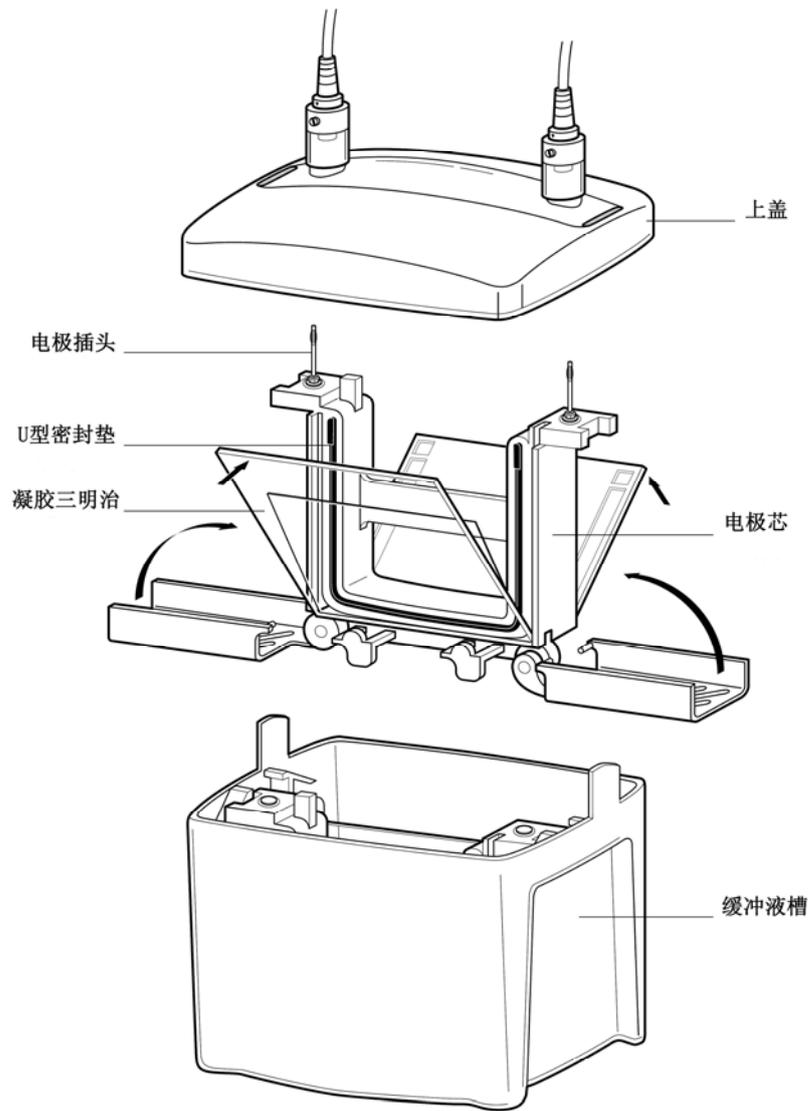


图 1：Mini P-4 电泳槽组装

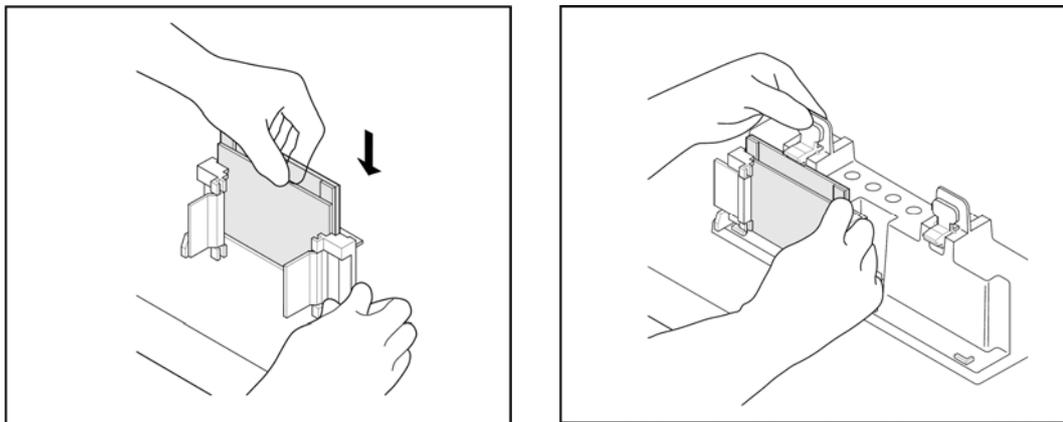


图 2：夹胶框与制胶架的组装

### 1.3 技术规格

制胶架:	聚碳酸酯 (Polycarbonate)
销钉、固定环与弹簧:	不锈钢 (Stainless steel)
灌胶框:	聚碳酸酯 (Polycarbonate) + 玻纤
灰色胶垫:	硅橡胶 (Silicon rubber)
电极芯:	聚碳酸酯 (Polycarbonate) + 玻纤
电极:	铂金丝 (Platinum wire) 0.010 英寸直径
U 型密封垫:	绿色硅橡胶 (Silicon rubber)
缓冲液槽与上盖:	聚碳酸酯 (Polycarbonate)
电泳梳子	聚碳酸酯 (Polycarbonate)

每孔最大上样体积:

孔数	每孔宽度	0.75 mm	1.0 mm	1.5 mm
<b>5</b>	12.7 mm	70 $\mu$ l	105 $\mu$ l	160 $\mu$ l
<b>9</b>	5.08 mm	33 $\mu$ l	44 $\mu$ l	66 $\mu$ l
<b>10</b>	5.08 mm	33 $\mu$ l	44 $\mu$ l	66 $\mu$ l
<b>15</b>	3.35 mm	20 $\mu$ l	26 $\mu$ l	40 $\mu$ l
<b>IPG</b>	6.2 mm	----	420 $\mu$ l	730 $\mu$ l
Prep/2-D				
Reference well	3.1 mm	13 $\mu$ l	17 $\mu$ l	30 $\mu$ l
Sample well	71.7 mm	310 $\mu$ l	400 $\mu$ l	680 $\mu$ l

外形尺寸:	16 cm (L) x 12 cm (W) x 18 cm (H)
预制胶兼容性:	Ready Gel precast gels
电压限制:	600 V DC and 30 w
重量 (含包装)	2.0 kg

化学试剂兼容性:

Mini P-4 电泳槽的所有组件均不可以接触丙酮和乙醇。使用有机试剂造成的损坏均不在保修范围之内。有关 Mini P-4 电泳槽对于不同的实验室试剂的化学兼容性问题请致电 010-63015080 (北京凯元信瑞仪器有限公司) 或当地经销商查询。

Mini P-4 电泳槽的梳子不能反复接触 100%TEMED。制胶前长时间用 TEMED 反复摩擦, 会导致梳子结构完整性的损坏。

## 1.4 安全须知

Mini P-4 电泳槽的电源由外接的直流电压电源提供。此电源的输出必须与外部地线隔离，从而保证直流电压的输出全部通过电泳槽，不与地线形成回路。所有凯元（CAVOY）系列电泳电源均满足这一安全标准。不论使用任何电源，下列指标为 Mini P-4 电泳槽所允许的最大操作参数：

- 600 V（直流）          最大输入电压
- 30 W                      最大输入功率
- 40℃                      最高使用温度

通过电泳槽的电流全部经过上盖接入，从而为用户提供安全互锁。当上盖被打开时接入电泳槽的电流即被切断，请务必在关断电源后打开或移走上盖。不要尝试在没有上盖的情况下使用电泳槽。

**注意：**凯元（CAVOY）系列产品从设计到生产均满足认定的安全标准，严格按照使用说明的操作将是安全的。该设备不可以任何方式、方法进行修改或改进。同时，对产品的改造会造成

- 使质保失效
- 破坏安全标准
- 造成潜在安全隐患

北京凯元信瑞仪器有限公司对于任何使用该产品由人为故意或未经许可对产品的修改所造成的损害和损失不承担责任。

## 第二章 组装及基本操作

### 2.1 凝胶板准备

#### 手工灌制凝胶

##### 1. 玻璃板夹和制胶架装配

注意：所有玻璃板必须为洁净、干燥的。

- a. 将灌胶框垂直放置在水平桌面上，并使灌胶框门处于开放状态。
- b. 按照所需凝胶厚度选择带边条的玻璃板，将短玻璃板放置其上（见图 3a）。
- c. 使带边条玻璃板的标记端向上，将两块玻璃板滑入灌胶框，使短玻板一面朝向前方（见图 3b）。

注意：确认两块玻璃板平齐处于水平平面上，并且标记方向正确。玻璃板方向错误或者未对齐会造成漏胶。

- d. 玻璃板到位后关合灌胶框们，将玻璃板夹夹紧在灌胶框中（见图 3c）。检查玻璃板底部是否平齐。
- e. 保持灌胶框门朝外，将灌胶框放置于制胶架的灰色灌胶胶垫上。同时将弹簧杠杆压在带边条的玻璃板上（见图 3d）。
- f. 重复步骤 a—e 可制作另一块胶板。

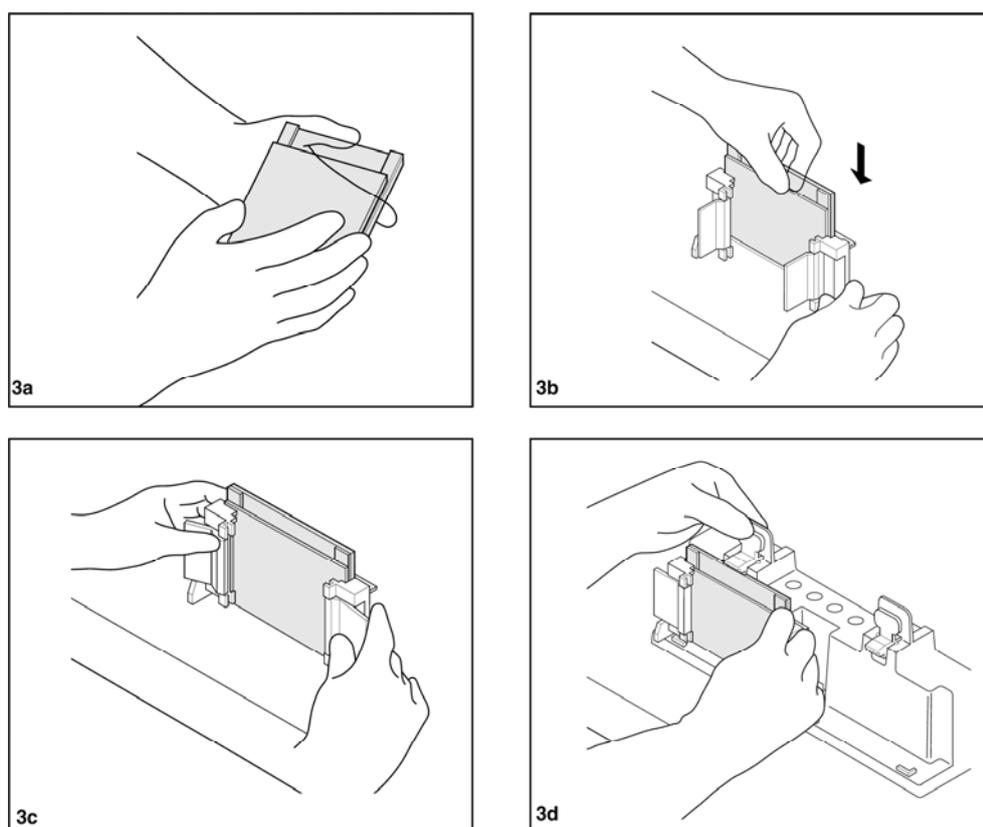


图 3：组装灌胶框和制胶架

## 2. 灌胶

### a. 不连续聚丙烯酰胺凝胶

- i. 将梳子完全放入组合好的凝胶夹中，在梳齿下端 1 厘米处作标记。此标记为分离胶高度。
- ii. 混合除 APS 及 TEMED 外的所有试剂来制作分离胶单体溶液（参见第四章的凝胶列表）。真空脱气 15 分钟以上。
- iii. 在脱气后的单体溶液中加入 APS 和 TEMED，用移液管或加样枪将溶液注入玻璃板之间至标记处。注入溶液时须平稳以防止其与空气混合。
- iv. 立即以水或者叔戊醇（2-甲基 2-丁醇）覆盖溶液表面。

注意：如果用水覆盖须小心缓慢平稳加入以防与溶液混合

- v. 放置 45 分钟到 1 小时使凝胶聚合。以双蒸水彻底清洗凝胶表面。不要让醇类物质在胶上超过 1 小时以防止上部凝胶脱水。

注意：此分离胶可在室温下储存过夜。加入 5 毫升 1:4 稀释的 1.5M Tri-HCl, PH 8.8 缓冲液 (Laemmli system) 以防止分离胶干燥。如果用其它缓冲体系，加入 5 毫升 1 倍稀释的分离胶缓冲液储存。

- vi. 准备浓缩胶单体溶液。混合除 APS 和 TEMED 外的所有试剂，真空下脱气 15 分钟以上。
- vii. 注入浓缩胶溶液前用滤纸使分离胶表面干燥。
- viii. 在脱气后的浓缩胶单体溶液中加入 APS 和 TEMED 并将溶液注入玻璃板之间直至与短玻璃板平齐。
- ix. 在边条之间从上部插入所需的梳子，确认梳子两端突起在边条之间引导。完全插入直至梳子背脊与短玻璃板对齐。
- x. 放置 30-45 分钟使浓缩胶聚合。
- xi. 轻轻取出梳子并以蒸馏水或缓冲液彻底清洗凝胶表面。
- xii. 以蒸馏水，去离子水清洗用过的夹胶框和制胶架。

### b. 连续聚丙烯酰胺凝胶

- i. 混合除 APS 及 TEMED 外的所有试剂来制作凝胶单体溶液（参见第四章的凝胶列表）。真空脱气 15 分钟以上。
- ii. 在脱气后的单体溶液中加入 APS 和 TEMED，将溶液注入玻璃板之间直至与短玻璃板平齐。
- iii. 在边条之间从上部插入所需的梳子，确认梳子两端突起在边条之间引导。完全插入直至梳子背脊与短玻璃板对齐。
- iv. 放置 45 分钟到 1 小时使凝胶聚合。
- v. 轻轻取出梳子并以蒸馏水或缓冲液彻底清洗凝胶表面。
- vi. 以蒸馏水，去离子水清洗用过的夹胶框和制胶架。

## 2.2 电泳模块组装与上样

所需材料：

- 洁净干燥的 Mini P-4 电泳缓冲液槽
- 电泳模块（电极芯模块只能用于 1 或 2 块胶，3 或 4 块胶需要共用组件模块）
- 运行缓冲液（1-2 块胶 700 毫升；3-4 块胶 1000 毫升）
- Power B 型电泳电源

### 1. 组装

注：只运行 2 块胶时使用电极芯（有电极插头）而非共用组件（没有电极插头）。运行 4 块胶时，电极芯和共用组件均要使用，每个组件 2 块胶。

- a. 将夹胶框呈打开方式放置于干净平整桌面上（见图 4a）
- b. 将第一块凝胶三明治板以短玻璃板向内方式放置于凝胶支撑架上，凝胶支撑架模铸于组件底部且每侧均有两个。此时凝胶板相对中心有 30 度的夹角。**放置第一块胶时须小心确认夹胶框保持平衡状态不会翻倒。**在另一侧的凝胶支撑架上放置第二块胶。此时共有两块胶每侧一块相对中心倾斜（见图 4b）。

注：凝胶板必须以短玻璃板向内方式放置于夹胶框两侧。同时，夹胶框需要 2 块胶板组合形成功能组件。如果运行奇数胶（1 或 3 块胶），则必须使用缓冲液挡板（见图 4b）。

- c. 用一只手轻轻将 2 块胶板推向中心靠紧绿色胶垫，确保短玻璃板正在绿色胶垫上端的凹槽之下。
- d. 一只手压紧胶板，另一只手将绿色夹胶框夹合拢在胶板上，使其锁定到位。或者用双手持定整个组件并稳定住胶板，同时合拢两侧的夹胶框夹使其锁定到位（见图 4c）。

夹胶框夹会推动胶板使短玻璃板与绿色胶垫的凹槽对紧防止漏液（请确认短玻璃板正在绿色胶垫上端的凹槽之下）。此时可以用缓冲液清洗样品孔和上样了（见图 4d）。

注：如果运行超过 2 块胶，请在共用组件上重复 a-d 的操作。

重要提示：请不要尝试在胶板没有被确认正在绿色胶垫上端的凹槽之下时合拢夹胶框夹。为防止胶板在锁定过程中移动，请用一只手稳固均匀地将其加紧在夹胶框两侧。

**注意：运行 1-2 块胶时请不要把共用组件放入电泳槽中。那样做会产生额外的热，影响电泳分离效果。**

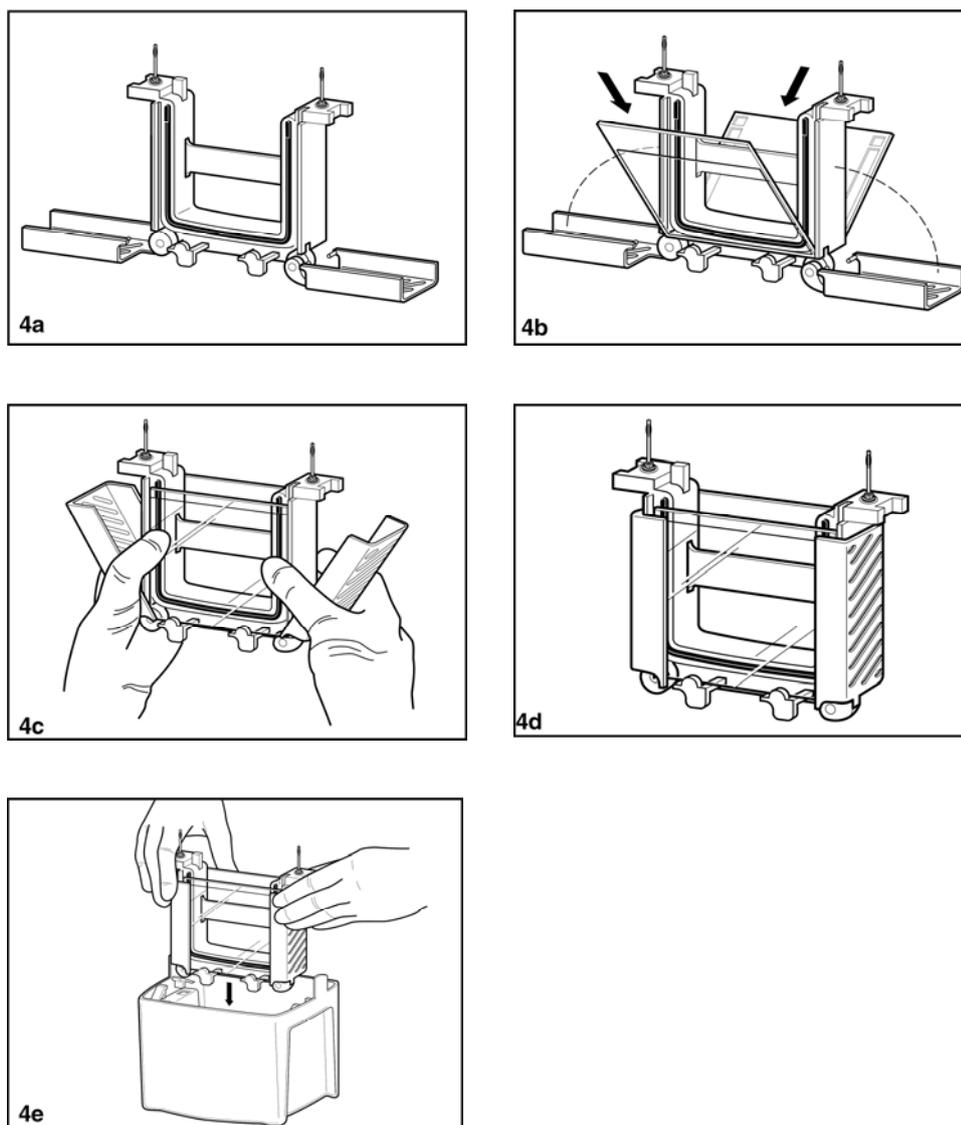


图 4： 组装 Mini P-4 电泳槽的电泳模块

## 2. 上样

- a. 向组件（上极槽）中注入缓冲液直至外玻璃板上沿之下。
- b. 当电泳模块尚在桌面上未被放入缓冲液槽中时上样。
- c. 使用注射器或加样枪将样品加入样品孔中。

注：加样时应缓慢使样品均匀沉降于样品孔底部。注意不要用针头或加样器头刺破胶孔底部。

注：加样可以在模块被放入电泳槽之前或之后进行。两种方法均可以得到满意的结果。两种情况下组件模块（上极槽）和缓冲液槽（下极槽）均须如第 2.2.2a 和第 2.2.3d 条描述的注入缓冲液。

### 3. 在缓冲液槽中放置电泳模块

注：所需缓冲液体积：2 块胶 700 毫升；4 块胶 1000 毫升

MiniP-4 缓冲液槽具有两个位置可放置两个模块：电极芯模块在后共用组件在前。

- a. 首先把 Mini P-4 缓冲液槽放置于平整桌面上，使正面（具有 2-Gels 和 4-Gels 标记的那一面）朝前。如果方向正确，槽中边缘的红色标记应该在右边，黑色标记在左边。
- b. 如果只运行 2 块胶则只需用电极芯模块。将其放在后部位置上使得红色（+）极与槽中右侧的红色标记相对应。
- c. 如需做 4 块胶。除放入电极芯模块（如上所述）外，还要将共用组件模块（无电极插头）放入前部位置。确认两者的红色（+）电极与槽中右侧的红色标记相对应。注意，位置和方向的错误会使上盖无法盖合。
- d. 在缓冲液槽（下极槽）中加入缓冲液至标记位置。（2 块胶需 550 毫升；4 块胶需 680 毫升）

### 4. Mini P-4 缓冲液槽装配

- a. 将上盖盖在缓冲液槽上。确认颜色标记的插头与插座相对应。插头、插座的匹配可以使定位准确。上盖上的障碍物可以防止定位错误。注意，缓冲液槽两侧的突出部分应该从上盖的狭缝中穿出，以保证上盖的正确闭合。此时用拇指已持续力按压上盖，直到压紧在缓冲液槽上。

**注意：运行 1-2 块胶时请不要把共用组件放入电泳槽中。那样做会产生额外的热，影响电泳分离效果。**

### 5. 电源条件

- a. 将电源插头认准正负极插入电泳电源插孔内。
- b. 给 Mini P-4 电泳槽通电开始电泳。恒压 200V 是 SDS-PAGE 和多数 native PAGE 电泳的推荐条件，同样的 200V 条件可以被用于 2 块胶和 4 块胶上。用户针对不同的应用优化的电压条件会不同。在 200V 电压条件下运行 SDS-PAGE 大约需要 35 分钟。

### 6. 凝胶取出

- a. 电泳完成后关断电源、拔出电源插头。
- b. 移开上盖，小心取出电极组件，倒出电泳缓冲液。  
注：为防止缓冲液漏洒，请在打开夹子前倒掉缓冲液。
- c. 打开夹子，取出凝胶板。
- d. 轻轻分离两块玻璃板，从凝胶板中取出凝胶。
- e. 采用胶面向下，将胶与玻璃板浸泡在固定或转移缓冲液中的办法使凝胶与玻璃板分离。
- f. 用后以蒸馏去离子水清洗 Mini P-4 电泳槽的电极芯、夹胶框和缓冲液槽

### 第三章 分离原理与条件优化

#### 3.1 引言

聚丙烯酰胺凝胶电泳依据物质分子的大小和电荷数量来分离蛋白质分子。电泳过程中，样品分子、凝胶网孔结构、缓冲体系和电流之间存在着错综复杂的相互关系，并最终使得不同分子分离成各自独立的条带。

因此，在电泳中必须考虑的变量是：胶孔大小、缓冲体系以及分子特性。

#### 凝胶孔径大小

胶孔是由聚丙烯酰胺与甲叉-双丙烯酰胺交联形成网络结构而成。这一结构具有分子筛作用。胶孔的大小决定于所用丙烯酰胺单体的浓度（%T）。方便起见，我们用（%T）来表现聚丙烯酰胺凝胶。%T指所有单体包括交联剂的重量百分比，它给出了凝胶的相对孔径。一般来说，T%越大，凝胶的孔径越小。

%T 以下列等式计算：

$$\%T = \frac{\text{丙烯酰胺克数} + \text{甲叉-双丙烯酰胺克数}}{\text{总体积 (ml)}} \times 100\%$$

%C 是指交联剂单体在总的单体中的百分数，C%以下列公式计算：

$$\%C = \frac{\text{甲叉-双丙烯酰胺克数}}{\text{丙烯酰胺克数} + \text{甲叉-双丙烯酰胺克数}} \times 100\%$$

2.67% C 是常用的分离胶中交联剂的浓度

凝胶可以被制成整个胶板同一浓度或成梯度%T 两种形式，典型的单一浓度胶为 7.5% 到 20%；梯度胶为 4-15%或 10-20%。

为优化分离条件而确定的总单体浓度归结于优化%T。最佳的%T 将随感兴趣分子的分子量的不同而变化。经验上把提供最佳分辨率的孔径大小以相对迁移率（Rf）值在 0.55 - 0.6 之间时为准。Rf 值对于特定蛋白可以按如下计算：

$$Rf = \frac{\text{感兴趣蛋白的迁移距离}}{\text{离子前沿的迁移距离}}$$

#### 凝胶缓冲体系

缓冲体系决定所要的功率并影响分离，它由在凝胶中和运行缓冲液中的缓冲剂组成，又连续和不连续的两种缓冲体系。

#### 连续缓冲体系

在连续缓冲体系中，凝胶和电极溶液里有相同 PH 值的缓冲离子。凝胶通常被制成同一 %T，样品被直接加入到胶的一部分中并在那里开始被分离。带宽部分取决于加样的高度，所以，为得到最佳分离效果，样品需被浓缩并减少上样体积。

## 不连续缓冲体系

不连续缓冲体系在凝胶和电极溶液中具有不同的缓冲离子。在凝胶和电极溶液中使用不同的缓冲剂，并在分离胶前加入浓缩胶，可以使样品在被分离前被压缩成极窄的条带。每种蛋白可以被很好的溶解和分离。不连续缓冲体系最初被设计用于分离非变性或天然蛋白；应用最广泛的非连续缓冲体系是 Laemmli 的 SDS-PAGE 缓冲体系。这一体系的表达式包含在第四章第 1 节中。

### 3.2 SDS-PAGE (Laemmli) 缓冲液体系

Laemmli 的缓冲体系是在缓冲剂中混合有 SDS 的不连续缓冲体系。该体系中蛋白在含有十二烷基磺酸钠 (SDS) 和硫醇还原剂，如 2-巯基乙醇的溶液中被加热变性。最终变性多肽呈现棒状结构并具有统一的预期分子量相对应的质-荷比。蛋白质被依据分子量的不同而分离，此方法对测定分子量非常有用。

### 3.3 Native PAGE

Native PAGE 是一种分离生物活性蛋白的方法。与 SDS-PAGE 相反，蛋白质的迁移率在 native PAGE 中与它的大小和电荷均有关。没有一种电泳缓冲液系统可以很好的纯化所有天然蛋白，在 native PAGE 系统中分离蛋白的关键参数是蛋白质的等电点 (pI) 和溶液的 pH 值。

#### pH 和 pI 值

电泳溶液的 pH 值必须在感兴趣蛋白的稳定性和生物活性所允许的范围之内。此外，缓冲液 pH 还必须为感兴趣蛋白提供足够的电荷以使其在凝胶中移动。pH 值的变化会影响感兴趣蛋白电荷的多少和分子大小（流体力学体积）从而影响迁移率。例如，缓冲液 pH 高于蛋白质 pI 时，蛋白会带有负电荷并向正极移动。相反地，缓冲液 pH 低于蛋白质 pI 时，蛋白会带有正电荷并向负极移动。而当缓冲液 pH 等于蛋白质 pI 时，蛋白会没有净电荷并向在电场中静止不动。

蛋白的迁移被溶液的 pH 值极好的改动。pH 值接近 pI 的缓冲液提供很好的分辨率，然而电泳时间会较长。相反，pH 值远离 pI 的缓冲液会使蛋白迁移很快，但分辨率会被折衷。pH 值的选择须在分辨率与速度之间寻求平衡。

#### 怎样选择 native PAGE 系统

##### 1. 不连续缓冲体系 (Omstein-Davis)

这个不连续缓冲体系是第一个经验证的非变性胶缓冲体系；详细方法提供在第四章第 2 节中。不连续系统的优势在于由浓缩胶浓缩稀释的蛋白样品。然而，浓缩现象同样可以由蛋白聚合和溶解干扰引起。如果蛋白聚合现象存在则必须采用连续缓冲系统。

注：在 Omstein-Davis 系统的凝胶中 pH 值达到 9.5，这将会超出一些蛋白的稳定性范围，引起变性。此外，感兴趣蛋白的 pI 也可能会太接近或高出此 pH 值，这将会造成蛋白带电太少或带正电，进而减少甚至阻止向正极的迁移。可供选择的非连续系统被描述于 Chrambach 和 Jovin 的文章中。

注：在选择缓冲体系前了解清楚感兴趣蛋白的 pI 是非常必须的。

## 2. 连续缓冲体系

当浓缩引起蛋白聚合时不连续系统不能使用，此时就需要一个连续缓冲体系。在连续系统中，上、下电极和凝胶使用相同缓冲液。由于浓缩胶不存在，蛋白迁移条带的宽度至少等同于上样宽度。因此，样品体积应尽量减少。在连续系统中蛋白的迁移受 pH 的支配大于丙烯酰胺凝胶的筛分作用，所以，6%的凝胶浓度被认为适合大多数的应用。对于较大蛋白，可能会用到 4%或 5%的凝胶。McLellon 描述了 pH3.8-10.2 的多种不同的连续缓冲体系，详细方案在第四章第 3 节中提供。

## 第四章 试剂准备和储液配制

### 4.1 每块凝胶的体积

下列体积为灌制一块凝胶板所用，不同的应用，如有无梳子、有无浓缩胶，会使数据有所变化。

胶厚度 (mm)	体积 (ml)
0.5	2.8
0.75	4.2
1.0	5.6
1.5	8.4

**Note:** 10 ml 单体溶液足够做两块任何厚度的浓缩胶。

### 4.2 SDS-PAGE (Laemmli) 缓冲液体系

#### 储液和缓冲液

#### 1. 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (30% T, 2.67% C)

87.6 克 丙烯酰胺 (29.2g/100ml)  
2.4 克 甲叉双丙烯酰胺 (0.8g/100ml)

用去离子水配制 300 毫升，过滤，4℃下避光储存。最长不超过 30 天。

#### 2. 10% (w/v) SDS

在 90 毫升水中加入 10 克 SDS，缓慢搅拌直至完全溶解。以去离子水定容 100 毫升。

#### 3. 1.5 M Tris-HCl, pH8.8

27.23 g Tris base (18.15 g/100 ml)  
80 ml 去离子水

用 6 N HCl 调至 pH8.8，以去离子水定容至 150 毫升。4℃下储存。

#### 4. 0.5 M Tris-HCl, pH6.8

6 g Tris base  
60 ml 去离子水

用 6 N HCl 调至 pH6.8，以去离子水定容至 100 毫升。4℃下储存。

5. 样品缓冲液 (SDS 还原缓冲液)

3.55 ml	去离子水
1.25 ml	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
2.5 ml	甘油
2.0 ml	10% (w/v) SDS
0.2 ml	0.5% (w/v) 溴酚蓝
9.5 ml	总体积

室温下储存, 使用时在950微升样品缓冲液中加入50微升 $\beta$ -巯基乙醇, 以最少1: 2的倍数将样品稀释后, 在95℃下加热4分钟。

6. 10 X 电极 (运行) 缓冲液, pH8.3 配制 1L

30.3 g	Tris base
144.0 g	甘氨酸
10.0 g	SDS

以去离子水溶解并定容至1000毫升, 不用调节pH, 4℃下储存。如果有沉淀出现, 则于使用前在室温下复温。

使用: 以450毫升去离子水稀释50毫升10X储液, 使用前充分混匀。

7. 10% (w/v) APS 新鲜配制

100 mg	过硫酸铵
溶解于 1 毫升去离子水中	

凝胶配方 (10 毫升)

1. 混合除 TEMED 及 10%APS 外的所有试剂来制备凝胶单体溶液。溶液脱气 15 分钟

% Gel	DDI H <sub>2</sub> O (ml)	30% Degassed Acrylamide/Bis (ml)	Gel Buffer* (ml)	10% w/v SDS (ml)
4%	6.1	1.3	2.5	0.1
5%	5.7	1.7	2.5	0.1
6%	5.4	2.0	2.5	0.1
7%	5.1	2.3	2.5	0.1
7.5%	4.9	2.5	2.5	0.1
8%	4.7	2.7	2.5	0.1
9%	4.4	3.0	2.5	0.1
10%	4.1	3.3	2.5	0.1
11%	3.7	3.7	2.5	0.1
12%	3.4	4.0	2.5	0.1
13%	3.1	4.3	2.5	0.1
14%	2.7	4.7	2.5	0.1
15%	2.4	5.0	2.5	0.1
16%	2.1	5.3	2.5	0.1
17%	1.7	5.7	2.5	0.1

\* 分离胶缓冲液 - 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

\* 浓缩胶缓冲液 - 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

2. 灌胶之前立即加入：（在 10 毫升单体溶液中）

分离胶： 50 微升 10%APS 和 5 微升 TEMED  
浓缩胶： 50 微升 10%APS 和 10 微升 TEMED  
摇匀，立即使用

注：以 10 毫升溶液配方为基础，配置其它所需体积的凝胶溶液，10%APS 和 TEMED 的量也需要相应增加。

提示：催化剂的溶度对于凝胶聚合非常重要！厚边现象和胶孔形状不完整往往由它引起。

#### 4.3 不连续 Native PAGE (Ornstein-Davis)

##### 储液和缓冲液

1. 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (30% T, 2.67% C)

87.6 克 丙烯酰胺 (29.2g/100ml)  
2.4 克 甲叉双丙烯酰胺 (0.8g/100ml)

用去离子水配制 300 毫升，过滤，4℃下避光储存。最长不超过 30 天。

2. 1.5 M Tris-HCl, pH8.8

27.23 g Tris base (18.15 g/100 ml)  
80 ml 去离子水

用 6 N HCl 调至 pH8.8，以去离子水定容至 150 毫升。4℃下储存。

3. 0.5 M Tris-HCl, pH6.8

6 g Tris base  
60 ml 去离子水

用 6 N HCl 调至 pH6.8，以去离子水定容至 100 毫升。4℃下储存。

4. 样品缓冲液 (SDS 还原缓冲液)

5.55 ml 去离子水  
1.25 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8  
3.0 ml 甘油  
0.2 ml 0.5% (w/v) 溴酚蓝  
10.0 ml 总体积

室温下储存，以最少 1: 2 的倍数将样品稀释后，在 95℃下加热 4 分钟。

5. 10 X 电极 (运行) 缓冲液, pH8.3 配制 1L

30.3 g Tris base (15 g/L)  
144.1 g 甘氨酸 (72 g/L)

以去离子水溶解并定容至 1000 毫升，不用调节 pH，4℃下储存。

使用：以 9000 毫升去离子水稀释 100 毫升 10X 储液，混匀，用于电泳运行。

## 6. 10% (w/v) APS 新鲜配制

100 mg 过硫酸铵  
溶解于 1 毫升去离子水中

### 凝胶配方 (10 毫升)

1. 混合除 TEMED 及 10%APS 外的所有试剂来制备凝胶单体溶液。溶液脱气 15 分钟

% Gel	DDI H <sub>2</sub> O (ml)	30% Degassed Acrylamide/Bis (ml)	Gel Buffer* (ml)
4%	6.2	1.3	2.5
5%	5.8	1.7	2.5
6%	5.5	2.0	2.5
7%	5.2	2.3	2.5
7.5%	5.0	2.5	2.5
8%	4.8	2.7	2.5
9%	4.5	3.0	2.5
10%	4.2	3.3	2.5
11%	3.8	3.7	2.5
12%	3.5	4.0	2.5
13%	3.2	4.3	2.5
14%	2.8	4.7	2.5
15%	2.5	5.0	2.5
16%	2.2	5.3	2.5
17%	1.8	5.7	2.5

\* 分离胶缓冲液 – 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

\* 浓缩胶缓冲液 – 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

2. 灌胶之前立即加入: (在 10 毫升单体溶液中)

分离胶: 50 微升 10%APS 和 5 微升 TEMED  
浓缩胶: 50 微升 10%APS 和 10 微升 TEMED  
摇匀, 立即使用

注: 以 10 毫升溶液配方为基础, 配置其它所需体积的凝胶溶液, 10%APS 和 TEMED 的量也需要相应增加。

提示: 催化剂的溶度对于凝胶聚合非常重要! 厚边现象和胶孔形状不完整往往由它引起。

## 4.4 连续 Native PAGE

### 储液和缓冲液

#### 1. 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (30% T, 2.67% C)

87.6 克	丙烯酰胺	(29.2g/100ml)
2.4 克	甲叉双丙烯酰胺	(0.8g/100ml)

用去离子水配制 300 毫升, 过滤, 4℃下避光储存。最长不超过 30 天。

#### 2. 样品缓冲液

1.0 ml	电泳缓冲液
3.0 ml	甘油
0.2 ml	0.5% (w/v) 溴酚蓝
5.8 ml	去离子水
10.0 ml	总体积

#### 3. 连续系统缓冲液 (McLellan)

McLellan 介绍了多种不同的缓冲液体系, pH 范围从 3.8 到 10.2。利用下表配制 5X 连续非变性系统 PAGE 电泳缓冲液。将酸碱化合物加入 1L 去离子水中, 不要调节 pH 值! 如果 pH 值超出标称值范围, 须抛弃缓冲液重新配制。

pH	碱性化合物	5x Solution	酸性化合物	5x Solution
3.8	$\beta$ -Alanine (MW 89.09)	13.36 g/L	Lactic Acid 85% solution	7.45 ml/L
4.4	$\beta$ -Alanine (MW 89.09)	35.64 g/L	Acetic Acid 17.4 M	11.5 ml/L
4.8	GABA (MW 103.1)	41.24 g/L	Acetic Acid 17.4 M	5.75 ml/L
6.1	Histidine (MW 155.2)	23.28 g/L	MES (MW 195.2)	29.5 g/L
6.6	Histidine (MW 155.2)	19.4 g/L	MOPS (MW 209.3)	31.4 g/L
7.4	Imidazole (MW 68.08)	14.64 g/L	HEPES (MW 238.33)	41.7 g/L
8.1	Tris (MW 121.14)	19.38 g/L	EPPS (MW 252.2)	37.85 g/L
8.7	Tris (MW 121.14)	30.29 g/L	Boric Acid (MW 61.83)	7.73 g/L
9.4	Tris (MW 121.14)	36.34 g/L	CAPS (MW 221.3)	44.26 g/L
10.2	Ammonia (14.8 M)	12.5 ml/L	CAPS (MW 221.3)	22.13 g/L

以 800 毫升去离子水稀释 200 毫升 5X 缓冲液，制成 1L 电泳缓冲液。最终浓度为：

pH	碱性化合物	酸性化合物
3.8	30 mM $\beta$ -Alanine	20 mM Lactic Acid
4.4	80 mM $\beta$ -Alanine	40 mM Acetic Acid
4.8	80 mM GABA	20 mM Acetic Acid
6.1	30 mM Histidine	30 mM MES
6.6	25 mM Histidine	30 mM MOPS
7.4	43 mM Imidazole	35 mM HEPES
8.1	32 mM Tris	30 mM EPPS
8.7	50 mM Tris	25 mM Boric Acid
9.4	60 mM Tris	40 mM CAPS
10.2	37 mM Ammonia	20 mM CAPS

凝胶配方（10 毫升）

1. 混合除 TEMED 及 10%APS 外的所有试剂来制备凝胶单体溶液。溶液脱气 15 分钟

Percent Gel	DDI H <sub>2</sub> O (ml)	30% Degassed Acrylamide/Bis (ml)	Continuous Buffer (ml)
4%	6.7	1.3	2.0
5%	6.3	1.7	2.0
6%	6.05	2.0	2.0

注：以10毫升溶液配方为基础，配置其它所需体积的凝胶溶液。

2. 灌胶之前立即加入：（在 10 毫升单体溶液中）

50 微升 10%APS 和 10 微升 TEMED  
摇匀，立即使用

注：pH 值低于 6 时，TEMED 的催化效率会降低。需增加 5 倍的 TEMED 浓度在 pH4-6 的凝胶中使之聚合。

## 第五章 参考书目

- Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, Nature, 227, 680–685 (1970)
- Ornstein, L and Davis, B J, Anal. NY Acad. Sci., 121, 321 (1964)
- Chrambach, A and Jovin, T M, Electrophoresis, 4, 190–204 (1983)
- McLellan T, Anal Biochem, 126, 94–99 (1982)

## 第六章 日常维护

Mini P-4 缓冲液槽及上盖, 电极芯、  
共用组件、制胶架及框

使用后用蒸馏水彻底冲洗

玻璃板及电泳梳子

以实验室清洁剂清洗后用蒸馏水彻底冲洗干净。带边条玻璃板在强碱溶液, 如 >100 mM NaOH, 中浸泡不能超过 24 小时; 在玻璃洗液中浸泡不能超过 2 小时。长时间的浸泡将会破坏边条粘合的完整性。

为延长边条粘合的寿命, 须避免在碱性清洗液中浸泡超过 5 天。

## 第七章 故障排除

问题	原因	解决方案
1. “微笑现象” -- 胶两端条带向上弯曲	a. 胶板中央温度 高于两端	a. 缓冲液没有混合均匀或上极槽中的缓冲液太浓--重新配制缓冲液, 确保混合均匀, 特别是当稀释 5X 或 10X 储液时。
	b. 功率条件过大	b. 将设定电压从 200V 改为 150 V; 或将下极缓冲液添加至短玻璃板上沿以下 1 cm 之内。
2. 蛋白垂直拖尾	a. 样品过量	a. 稀释样品, 选择性清除有影响蛋白, 或者减小 25% 电压弱化拖尾。
	b. 样品沉淀	b. 在加入 SDS 样品缓冲液前离心样品, 或减小凝胶的 %T。
		c. SDS 对蛋白的比例须足够, 以使蛋白表面被 SDS 覆盖。该比例一般为 1.4:1, 但某些膜蛋白可能需要更多的 SDS。
3. 条带横向散布	a. 电泳未开始前 样品已扩散	a. 尽量减少从上样到开始电泳的时间。
	b. 样品离子强度 低于凝胶	b. 在样品中使用与凝胶或浓缩胶相同的缓冲液。
4. 条带扭曲或歪斜	a. 胶孔聚合失败	a. 灌胶前将浓缩胶彻底脱气。增加 25% 过硫酸铵和 TEMED 的浓度。对于浓缩胶和低 %T 的胶, 可以维持 APS 浓度不变而加倍 TEMED 浓度。

- |                             |                                      |   |
|-----------------------------|--------------------------------------|---|
|                             | b. 样品含有盐分                            | b. 透析除盐或用脱盐柱除盐。                                   |
|                             | c. 凝胶接触面不均匀                          | c. 降低聚合度，小心覆盖凝胶表面。                                |
| 5. 泳道在胶底部收缩                 | a. 样品离子浓度高于周围凝胶                      | a. 将邻近的几个样品脱盐。                                    |
| 6. 电泳时间明显延长                 | a. 电泳缓冲液过浓                           | a. 检查缓冲液配方，需要的话将其稀释。                              |
|                             | b. 样品盐分过多                            | b. 样品脱盐   |
| 7. 电泳跑得太快                   | a. 电泳或下极缓冲液过稀。                       | a. 检查缓冲液配方，需要的话将其浓缩。                              |
|                             | b. 电压设定过高                            | b. 降低 25%-58% 的设定电压。                              |
| 8. 应该是单一蛋白却出现两条带 (SDS-PAGE) | a. 该蛋白的一部分可能在电泳过程中被再氧化；或在电泳前没有被完全还原。 | a. 重新配制样品缓冲液；增加缓冲液中 2-巯基乙醇的浓度；把 DTT 换成 BME。       |
| 9. 条带比预期的少，且染料前沿有很重的带       | a. 蛋白质迁移到染料前沿                        | a. 增加分离胶的 %T*。                                    |
|                             | b. 蛋白降解                              | b. 使用蛋白酶抑制剂，如 PMSF                                |
| 10. 上极槽漏液                   | a. 上极槽液体过满                           | a. 保持上极液面在带边条玻璃板上沿之下。                             |
|                             | b. 组装不合适                             | b. 保证 U 型密封垫干净无缺口，保证短玻璃板在 U 型密封垫的缺口之下而不是之上。       |
| 11. 手工灌胶时漏液                 | a. 玻璃板有缺口                            | a. 确保玻璃板无缺口                                       |
|                             | b. 带边条玻璃板和短玻璃板没有水平                   | b. 确保玻璃板排列正确                                      |
|                             | c. 制胶架垫脏了、有裂纹或磨损                     | c. 清洗制胶架垫；更换破损的制胶架垫。                              |
| 12. 胶孔底部成型差                 | a. 催化剂构成错误                           | a. 配制新鲜催化剂溶液；或在浓缩胶中增加催化剂浓度为 0.06%APS 和 0.12%TEMED |
| 13. 灌胶框的压力凸轮很难闭合或有噪音        | a. 压力凸轮的枢轴有粉末残留                      | a. 在每次使用前清洗或擦去粉末残留物。                              |

\* 聚丙烯酰胺凝胶有两个特征参数：

$$1) \text{ 总凝胶单体浓度 \%T} = \frac{\text{丙烯酰胺 (g)} + \text{甲叉双丙烯酰胺 (g)}}{\text{溶液总体积 (ml)}} \times 100\%$$

$$2) \text{ 交联剂浓度 \%C} = \frac{\text{甲叉双丙烯酰胺 (g)}}{\text{丙烯酰胺 (g)} + \text{甲叉双丙烯酰胺 (g)}} \times 100\%$$

## 第八章 产品信息与配件

货号	产品描述
MP-8000	Mini P-4 小型垂直电泳系统, 0.75 mm, 包括: Mini P-4 型 4 块胶电泳槽, 制胶架 x2, 夹胶框 x4, 厚玻板 (带边条) x5, 短玻板 x5, 胶铲 x2, 10 孔 0.75 mm 电泳梳 x5, 操作手册
MP-8001	Mini P-4 小型垂直电泳系统, 1.0 mm, 包括: Mini P-4 型 4 块胶电泳槽, 制胶架 x2, 夹胶框 x4, 厚玻板 (带边条) x5, 短玻板 x5, 胶铲 x2, 10 孔 1.0 mm 电泳梳 x5, 操作手册
MP-8002	Mini P-4 小型垂直电泳两块胶系统, 0.75 mm, 包括: Mini P-4 型两块胶电泳槽, 制胶架, 夹胶框 x2, 厚玻板 (带边条) x5, 短玻板 x5, 胶铲 x2, 10 孔 0.75 mm 电泳梳 x5, 操作手册
MP-8003	Mini P-4 小型垂直电泳两块胶系统, 1.0 mm, 包括: Mini P-4 型两块胶电泳槽, 制胶架, 夹胶框 x2, 厚玻板 (带边条) x5, 短玻板 x5, 胶铲 x2, 10 孔 1.0 mm 电泳梳 x5, 操作手册
MP-1100	短玻板, 5 片/盒
MP-1101	厚玻板, 带 0.75 mm 边条, 5 片/盒
MP-1102	厚玻板, 带 1.0 mm 边条, 5 片/盒
MP-1103	厚玻板, 带 1.5 mm 边条, 5 片/盒
MP-1200	电泳梳, 0.75 mm, 10 孔, 5 个/包
MP-1201	电泳梳, 1.0 mm, 10 孔, 5 个/包
MP-1201	电泳梳, 1.5 mm, 10 孔, 5 个/包
MP-3030	Mini-TBC 小型转移电泳槽, 包括: Mini P-4 小型电泳槽上盖和下槽, Mini-TBC 小型 转移电泳芯, 三明治夹 x2, 冰盒, 使用手册
MP-3035	Mini-TBC 小型转移芯, 包括: Mini-TBC 小型转移电泳芯, 三明治夹 x2, 冰盒, 使用手册
推荐电源:	
PP-1150	Power B 基础型电泳电源, 300V / 400mA / 75W

## 第九章 质量保证

Mini P-4 型电泳槽为用户提供为期一年的质量保证。凡由产品的原料及制作工艺造成的产品缺陷，在产品的质量保证期内我公司均负责免费维修或更换。如有下列情况发生，则产品不在质量保证范围之内：

1. 由不正确的操作引起的损坏。
2. 由非我公司指定维修人员的维修改造引起的损坏。
3. 以外的错误使用造成损坏
4. 由于不可抗因素造成的损坏
5. 一般性易损部件，如：铂金丝、玻璃板、橡胶垫等。
6. 使用有机溶剂造成的损坏。

质保信息：

产品型号： \_\_\_\_\_

货号： \_\_\_\_\_

到货时间： \_\_\_\_\_

产品序列号： \_\_\_\_\_

发票号： \_\_\_\_\_

合同号： \_\_\_\_\_



**北京凯元信瑞仪器有限公司**

地址：北京市宣武区宣武门外大街 28 号富卓大厦 B 座 605  
电话：010-63015080 或 63019969 传真：010-63015596

邮政编码：100052  
网址：<http://www.kysino.cn>