



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

Tris-Acetate-PAGE凝胶配制试剂盒(大分子量蛋白用)

产品编号	产品名称	包装
P0534S	Tris-Acetate-PAGE凝胶配制试剂盒(大分子量蛋白用)	30-50gels

产品简介:

- 碧云天生产的Tris-Acetate-PAGE凝胶配制试剂盒(大分子量蛋白用) (Tris-Acetate-PAGE Gel Preparation Kit for High Molecular Weight Protein), 提供了配制Tris-Acetate-PAGE凝胶所需的各种试剂, 用户只需自备制胶器具和蒸馏水, 即可配制不同浓度的Tris-Acetate-PAGE凝胶(即聚丙烯酰胺凝胶)。Tris-Acetate-PAGE凝胶主要用于大分子量蛋白(40-500kDa)的检测。
- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)技术广泛用于蛋白质、核酸及蛋白质-核酸复合物的分离纯化、检测、鉴定、分子量分析等实验, 是生命科学中最基本的实验技术之一。常见的Western印迹(Western blot)检测就是基于PAGE的。Glycine-SDS-PAGE (也被称为Laemmli-SDS-PAGE, 基于Tris-Glycine缓冲系统)和Tricine-SDS-PAGE (基于Tris-Tricine缓冲系统)是广泛应用的将蛋白质按照分子量大小分离的方法[1]。Tricine-SDS-PAGE可以很好地分离小于30kDa的蛋白质, 而Glycine-SDS-PAGE被建议用于大于30kDa的蛋白。不同体系分离蛋白质的特性与Glycine和Tricine的pKa值有关, 不同大小的蛋白质在不同的缓冲体系中拥有不同的电泳迁移率, 且特定范围内的蛋白质分辨率较高。因此, 如果需要分离大分子量蛋白, 就需要选择合适的电泳系统[2]。同时, 也建议使用从上至下丙烯酰胺浓度升高的梯度胶[3]。目前研究中常用Tris-Acetate凝胶系统分离大分子量蛋白。在Tris-Acetate凝胶系统中, Acetate(-)来自凝胶缓冲液, 相较于系统中其它的阴离子, Acetate(-)对阳极具有极高的亲和力, 因此可作为前导离子(Leading ion)。凝胶缓冲液中含有Tris(+)和Acetate(-), pH为7.0, 使凝胶具有很高的分辨率。电泳缓冲液中含Tris(+), Tricine(-)和十二烷基硫酸盐(Dodecylsulfate, DS), 其中Tricine(-)作为尾随离子(Tailing ion)。电泳缓冲液pH约为8.24, 减少了蛋白修饰干扰, 使条带更锐利。对高分子量蛋白进行电泳分离的实际检测结果也表明, Tris-Acetate凝胶分离效果好、灵敏度高、分辨率佳。此外, Tris-Acetate凝胶也被报道可以作为一种稳定的、经济高效的研究蛋白质寡聚化的工具, 仅使用单一凝胶即可提供出色的蛋白质寡聚化研究结果[4]。
- 本试剂盒提供的Gel Buffer使用中性pH的Tris-Acetate缓冲液制备, 不含SDS, 既可用于变性蛋白电泳, 也可用于非变性蛋白电泳[5]。推荐使用碧云天专门为Tris-Acetate凝胶系统研制的配套电泳液: 对于变性蛋白电泳, 推荐使用BeyoGel™ Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X) (P0749); 对于非变性蛋白电泳, 推荐使用非变性PAGE电泳液(Tris-Gly, Powder) (P0014F/P0014G)。电泳后可以使用Tris-Glycine缓冲系统的转膜液进行转膜, 但需降低转膜液中乙醇或甲醇浓度(至5%), 推荐使用Western转膜液(P0021A或P0021B)。
- 本试剂盒约可配制30-50块常规大小的Tris-Acetate-PAGE凝胶。具体可以配制的凝胶数量和凝胶的厚薄以及凝胶的大小有关。如果配备梯度胶制备器, 也可用于梯度胶的配制。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0534S-1	40% Acr-Bis (37.5:1)	50ml
P0534S-2	Gel Buffer (15X)	35ml
P0534S-3	凝胶聚合催化剂	0.5g
P0534S-4	TEMED Substitute	0.5ml
—	说明书	1份

保存条件:

4°C保存, 一年有效。40% Acr-Bis (37.5:1)、Gel Buffer (15X)和TEMED Substitute须避光保存。凝胶聚合催化剂也可以室温保存。凝胶聚合催化剂用蒸馏水配制成10%溶液后, 分装成小管-20°C保存, 通常半年内有效。

注意事项:

- 凝胶聚合催化剂用水配制成10%溶液后, 应当分装成小管-20°C保存。同时应尽量减少室温存放时间, 以防失效。
- TEMED Substitute易挥发, 使用后请盖紧瓶盖。另外凝胶凝聚的速度和温度及光照关系密切, 可通过适当调节凝胶聚合催化剂和TEMED Substitute的用量, 控制在不同的室内环境下凝胶凝聚的速度。
- TEMED Substitute易燃, 有腐蚀性, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或腐蚀其他物品。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 准备倒胶的模具。可以使用常规的制备蛋白电泳胶的模具, 如碧云天的MiniProGel™蛋白制胶与电泳系统(E6001/E6005)或其它适当模具。最好选择可以灌制较薄胶的模具(如0.75mm厚度), 以便于干胶等后续操作。为得到更好的结果, 可以选择可灌制较大Tris-Acetate-PAGE凝胶的模具。制胶前必须把制胶模具冲洗干净, 需特别注意不能有SDS残留。
2. 10%凝胶聚合催化剂的配制: 例如称取0.1g凝胶聚合催化剂, 用蒸馏水溶解, 并定容至1ml, 即为10%凝胶聚合催化剂。
3. 7%浓度的固定浓度胶配制方法:

- a. 常用蛋白电泳胶的模具(胶板宽度为10厘米)所需下层胶和上层胶体积(下层胶按6厘米高度计算, 上层胶按1.5厘米高度计算, 均含约0.3ml的冗余量)参见下表。

Gel Thickness	Volume of Resolving Gel	Volume of Stacking Gel
0.75mm	4.0ml	1.0ml
1.0mm	5.4ml	1.5ml
1.5mm	8.0ml	2.0ml

注: 下层胶体积已包含适量冗余, 请勿全部用于灌制下层胶, 以免灌胶时上层胶高度不够。

- b. 根据下表配制Tris-Acetate-PAGE的分离胶(即下层胶):

成分	配制不同体积Tris-Acetate-PAGE分离胶所需各成分的体积(毫升)					
7%胶	5	10	20	30	40	50
Ultrapure water	3.74	7.48	15.01	22.54	30.02	37.39
Gel Buffer (15X)	0.33	0.67	1.33	2.00	2.67	3.33
40% Acr-Bis (37.5:1)	0.88	1.75	3.50	5.25	7.00	8.75
10%凝胶聚合催化剂	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50
TEMED Substitute	0.003	0.006	0.009	0.012	0.018	0.03

注: 常用的固定胶浓度为7%, 其它浓度的分离胶, 可自行计算各成分的体积。

- c. 根据下表配制Tris-Acetate-PAGE的浓缩胶(也称堆积胶、积层胶或上层胶):

成分	配制不同体积Tris-Acetate-PAGE浓缩胶所需各成分的体积(毫升)					
4%胶	2	3	4	6	8	10
Ultrapure water	1.64	2.47	3.29	4.93	6.58	8.22
Gel Buffer (15X)	0.13	0.20	0.27	0.40	0.53	0.67
40% Acr-Bis (37.5:1)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.8	1.0
10%凝胶聚合催化剂	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
TEMED Substitute	0.002	0.003	0.004	0.006	0.008	0.01

注1: 按照上述顺序依次加入各种试剂, 加入TEMED Substitute前先混匀, 加入TEMED Substitute后立即混匀, 并马上加入到制胶的模具中。避免产生气泡, 并加上梳齿。如果发现非常容易形成气泡, 可以把一块制胶的玻璃板进行硅烷化处理。

注2: 通常10-30分钟内胶会凝固。具体的凝固时间和温度及光照有关, 上表中10%凝胶聚合催化剂和TEMED Substitute的正常推荐用量是室温为25°C时的推荐用量。为达到与25°C时相近的凝固时间, 当室温低于25°C时, 可以适当增加10%凝胶聚合催化剂和TEMED Substitute的用量, 例如20°C时建议使用正常推荐用量的1.5倍, 15°C时建议使用正常推荐用量的2倍。

注3: 浓缩胶中可加入适量蓝色、红色或黄色PAGE上层胶染料(500X, 无迁移)(P0710/P0712/P0715)便于上样。

4. 3-8%或3-15%浓度的梯度胶配制方法(须自备梯度胶制备器, 如果没有梯度胶制备器可以使用两个恒流泵配合磁力搅拌器实现梯度胶的配制):

- a. 配制3%、8%或15%的Tris-Acetate-PAGE凝胶(3%为7ml, 8%或15%为4ml, 即按照一片1.5mm厚胶的规格进行配制):

胶浓度	3%	8%	15%
总体积	7ml	4ml	4ml
Ultrapure water	5.95ml	2.9ml	2.21ml
Gel Buffer (15X)	0.47ml	0.27ml	0.27ml
40% Acr-Bis (37.5:1)	0.53ml	0.8ml	1.5ml
10%凝胶聚合催化剂	0.04ml	0.02ml	0.02ml
TEMED Substitute	0.008ml	0.005ml	0.005ml

- b. 将3%的低浓度胶和8%或15%的高浓度胶各4ml加入梯度胶制备器相应的位置中, 并缓慢、完全注入制胶模具中, 注意不能有气泡产生。

- c. 将剩余的3ml 3%的低浓度胶缓慢注入制胶模具中, 在梯度胶上方形成浓缩胶层。

- d. 缓慢插入梳子。

5. 具体的电泳步骤如下。

- a. 样品准备:

(a) 变性电泳: 根据实验需求按照下表配制上样体系, 70°C加热10分钟, 以充分变性蛋白。

Reagent	Reduced Sample	Non-reduced Sample
Sample	x μ l	x μ l
BeyoGel™ LDS Sample Buffer (4X) (P0731)	2.5 μ l	2.5 μ l
BeyoGel™ Sample Reducing Agent (10X) (P0733)	1 μ l	-
ddH ₂ O	(6.5-x) μ l	(7.5-x) μ l
Total Volume	10μl	10μl

- (b) 非变性电泳: 将样品和非变性非还原性蛋白上样缓冲液(5X) (P0016N)按4:1混合, 例如8 μ l样品和2 μ l上样缓冲液(5X)。无须加热变性。
- b. 将按照本试剂盒使用说明配制好的凝胶固定在电泳槽中, 平稳、缓慢地拔出梳子。
- c. 配制电泳缓冲液。对于变性蛋白电泳, 推荐使用BeyoGel™ Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X) (P0749); 对于非变性蛋白电泳, 推荐使用非变性PAGE电泳液(Tris-Gly, Powder) (P0014F/P0014G)。
- (a) **变性蛋白电泳缓冲液(Tris-Acetate SDS Running Buffer) (1X):** 50mM Tricine, 50mM Tris Base, 0.1% SDS, pH8.2-8.3。
- (b) **非变性蛋白电泳缓冲液(Tris-Glycine Native Running Buffer) (1X):** 25mM Tris Base, 192mM Glycine, pH8.3。
- d. 内槽加满电泳液, 外槽加入电泳液没过电泳槽底部的阳极即可。电泳槽推荐使用碧云天的MiniProGel™蛋白制胶与电泳系统(E6001/E6005)。
- e. 上样: 将10微升吸头或BeyoGold™凝胶电泳上样吸头(FTIP205/FTIP206/FTIP208/FTIP209)的尖端垂直方向轻轻插入到上样孔中即可上样, 枪头避免戳破凝胶, 更不能使胶板变形导致样品泄漏。推荐使用碧云天大分子量的BeyoColor™彩色预染蛋白分子量标准(25-300kD) (P0779)。
- 注: 最佳上样量须通过实验来确定, 样品过量较易导致条带拖尾和信号过强。
- f. 将电泳槽盖子盖好, 并将电源线插头插入电泳仪电源插孔(红对红, 黑对黑)。进行变性电泳时, 一般在150V电压, 电泳50-70分钟左右即可; 进行非变性电泳时, 一般在150V电压, 电泳90-180分钟左右即可。当溴酚蓝条带电泳至凝胶近底部或实验预定的位置即停止电泳。如果需获得更加平整和锐利的条带, 可以把电压调整为100-150V, 此时电泳时间需要适当延长。实际电泳时间与电泳液质量、凝胶数量等因素有关系, 需自行适当调整。电泳电源推荐使用碧云天的BeyoPower™中电流电源(300V/600mA/100W) (E6080)或BeyoPower™高电流电源(300V/2000mA/200W) (E6085)。
- g. 转膜: 电泳结束后可使用Tris-Glycine缓冲系统的Western转膜液(P0021A或P0021B)、BeyoGel™ Transfer Buffer (for Bis-Tris Gels) (P0753/P0755)、或其它转膜液(如: 25mM Bicine, 25mM Bis-Tris (free base), 1mM EDTA, pH7.2)进行转膜。转膜电源推荐使用碧云天的BeyoPower™高电流电源(300V/2000mA/200W) (E6085), 转膜推荐使用碧云天的MiniBlot™蛋白转膜系统(E6050)或MiniBlot™蛋白转膜转移芯(E6053)。详细的Western操作可以参考碧云天的相关网页: <http://www.beyotime.com/support/western.htm>。
- 注1: 乙醇或甲醇会使大分子蛋白很容易沉淀。可通过减少转膜液中的乙醇或甲醇百分比(至5%)来避免这种情况发生。为了进一步确保蛋白质不会沉淀, 可添加SDS至终浓度为0.1%。SDS向蛋白添加均匀的负电荷, 使得它们更容易从凝胶转移到膜上。
- 注2: 通常湿转时120V恒定电压转膜60-90分钟, 为达到更好的转膜效果, 可以根据预制胶上残留的预染marker及印迹膜上的预染marker确定转膜效率, 并对转膜条件进行适当调整。

参考文献:

1. Maizel JV. Trends Biochem Sci. 2000. 25(12):590-2.
2. Schagger H. Nat Protoc. 2006. 1(1):16-22.
3. Casas-Terradellas E, Garcia-Gonzalo FR, Hadjebi O, Bartrons R, Ventura F, et al. Electrophoresis. 2006. 27(20):3935-8.
4. Cubillos-Rojas M, Schneider T, Sánchez-Tena S, Bartrons R, Ventura F, et al. Anal Bioanal Chem. 2016. 408(6):1715-9.
5. Cubillos-Rojas M, Amair-Pinedo F, Tato I, Bartrons R, et al. Methods Mol Biol. 2019. 1855:269-277.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P0534S	Tris-Acetate-PAGE凝胶配制试剂盒(大分子量蛋白用)	30-50gels
P0535S	BeyoGel™大分子量蛋白预制胶(Tris-Acetate, 7%, 10孔)	10块
P0536S	BeyoGel™大分子量蛋白预制胶(Tris-Acetate, 7%, 15孔)	10块
P0538S	BeyoGel™大分子量蛋白预制胶(Tris-Acetate, 3-8%, 10孔)	10块
P0539S	BeyoGel™大分子量蛋白预制胶(Tris-Acetate, 3-8%, 15孔)	10块
P0731	BeyoGel™ LDS Sample Buffer (4X)	2ml/10ml
P0749	BeyoGel™ Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X)	100ml/500ml
P0753	BeyoGel™ Transfer Buffer (20X, for Bis-Tris Gels)	100ml/500ml
P0755	BeyoGel™ Transfer Buffer (Powder, for Bis-Tris Gels)	1L/10L