

SurePAGE™ 10×8 预制胶

版本: 06272017

I	简介	1
II	凝胶选择指导.....	2
III	兼容的电泳槽.....	3
IV	预制胶使用简介.....	4
V	凝胶染色.....	10
VI	Western Blot 操作步骤.....	11
VII	Dot Blot 操作步骤.....	12
VIII	凝胶实例.....	13
IX	问题分析及解决方法.....	14
X	相关产品和订购信息.....	15

I. 简介

金斯瑞 SurePAGE 预制胶是Express Plus 的升级产品，它是一款高性能的小型聚丙烯酰胺凝胶，能满足客户上样量大的需求。其独特的胶板设计可以提高条带分辨率，改善样品在上样孔里的分布状态，使得条带更加均匀。该预制胶为Bis-Tris 凝胶缓冲系统，比常规的 Tris-Glycine 系统具有更强的缓冲能力，于pH6.4 的弱酸性条件下灌注，能够更好地减少聚丙烯酰胺的降解，提高凝胶稳定性。

SurePAGE 预制胶不含有 SDS，依赖于采用合适的电泳缓冲液和相应试剂，是 SDS-PAGE 和非变性凝胶电泳的理想材料。依赖特有的灌注技术可以保证预制胶批次间稳定性和条带分布一致性。SurePAGE 预制胶配套使用 Tris-MOPS 或 Tris-MES 电泳缓冲液，能够实现高效、可靠地分离蛋白质，便于后续染色或转膜检测。

SurePAGE 预制胶提供不同浓度的梯度胶和固定浓度胶。梯度胶的浓度包括4-20%、4-12% 和8-16%；固定浓度胶包括8%、10%和12%。每种浓度的预制胶都有10个点样孔、12个点样孔和15个点样孔三种规格。胶板尺寸：长×宽×高为100 × 80 × 4.7 mm；凝胶尺寸：长×宽×厚为80×70×1 mm。

主要特点:

- **上样量大** — 最大上样量可达80 µl, 高于其他公司同类产品
- **简单易用** — 特殊上样口设计，使用普通10 µl 移液枪头快速上样
- **高分辨率** — 蛋白条带分离更为清晰和均一
- **超长保质期** — 2-8 °C可保存12个月
- **兼容性胶板设计** — 适合大多数小型电泳槽
- **重复性高** — 不同批次预制胶的一致性高
- **物美价廉** — 节约实验成本

II. 凝胶选择指导

表1. 凝胶选择指导

产品编号	丙烯酰胺浓度	孔数	上样孔体积	电泳缓冲液	转移缓冲液	分离范围
M00661	8%	10	80 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	180-20 kDa
M00664	10%	10	80 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	160-20 kDa
M00667	12%	10	80 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	120-6.5 kDa
M00655	4-20%	10	80 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	250-10 kDa
M00658	8-16%	10	80 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	160-10 kDa
M00652	4-12%	10	80 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	250-20 kDa
M00662	8%	12	60 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	180-20 kDa
M00665	10%	12	60 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	160-20 kDa
M00668	12%	12	60 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	120-6.5 kDa
M00656	4-20%	12	60 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	250-10 kDa
M00659	8-16%	12	60 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	160-10 kDa
M00653	4-12%	12	60 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	250-20 kDa
M00663	8%	15	40 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	180-20 kDa
M00666	10%	15	40 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	160-20 kDa
M00669	12%	15	40 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	120-6.5 kDa
M00657	4-20%	15	40 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	250-10 kDa
M00660	8-16%	15	40 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	160-10 kDa
M00654	4-12%	15	40 μ l	MOPS, MES	Tris-Bicine	250-20 kDa

下图的蛋白迁移表可以帮助您选择合适的凝胶进行蛋白电泳

表2. 蛋白电泳迁移表

8-16%	4-20%	4-12%	8%	10%	12%
270 KD	270 KD	270 KD	270 KD	270 KD	270 KD
175 KD	175 KD	175 KD	175 KD	175 KD	175 KD
130 KD	130 KD	130 KD	130 KD	130 KD	130 KD
95 KD	95 KD	95 KD	95 KD	95 KD	95 KD
80 KD	80 KD	80 KD	80 KD	80 KD	80 KD
65 KD	65 KD	65 KD	65 KD	65 KD	65 KD
50 KD	50 KD	50 KD	50 KD	50 KD	50 KD
40 KD	40 KD	40 KD	40 KD	40 KD	40 KD
35 KD	35 KD	35 KD	35 KD	35 KD	35 KD
30 KD	30 KD	30 KD	30 KD	30 KD	30 KD
20 KD	20 KD	20 KD	20 KD	20 KD	20 KD
15 KD	15 KD	15 KD	15 KD	15 KD	15 KD
10 KD	10 KD	10 KD	10 KD	10 KD	10 KD
5 KD	5 KD	5 KD	5 KD	5 KD	5 KD

III. 可兼容电泳槽

SurePAGE 预制胶可兼容以下电泳槽：

- 六一、天能
- GradiGel Mini 4-Cell
- IBI Universal Protein System
- EC 4-Cell
- Hoefer Mighty Small (SE 260/SE 250)
- Daiichi|Mini 2-Gel&6-Gel
- Bio-Rad Mini-PROTEANII&3
- Invitrogen Novex XCell I, II, & Surelock (须与金斯瑞特供的挡板一起使用)

IV. SurePAGE 预制胶的使用简介

A. 电泳缓冲液和电泳槽的准备

1. 取一包电泳缓冲液粉末 (Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder, 产品编号: M00138) 溶解在 1 L 的去离子水中制成 1×电泳缓冲液。
2. 将 SurePAGE 预制胶从包装袋中取出, 撕掉胶板底部的胶带 (见图 1)。

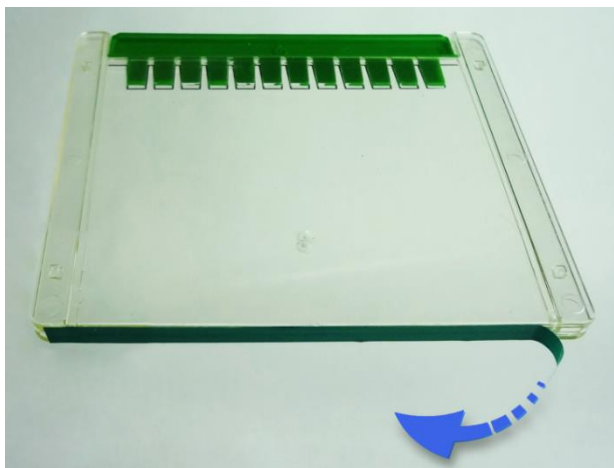


图 1. 撕下胶板底部胶带

3. 平稳地将梳子从胶板中推出 (见图 2)。

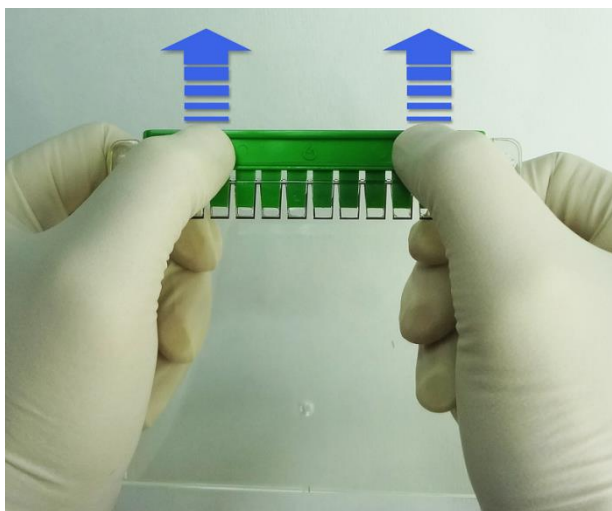


图 2. 将梳子从胶板中推出

4. 将胶板放入凝胶电泳装置中。
请参阅电泳装置制造商的使用说明。

Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System 电泳槽的使用注意事项: 将电泳槽内框架的绿色硅橡胶密封条取出, 然后将其平坦的一面朝外并重新插回内框架的凹槽中 (见图3)。



图3. SurePAGE 预制胶在Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System 电泳槽中的使用

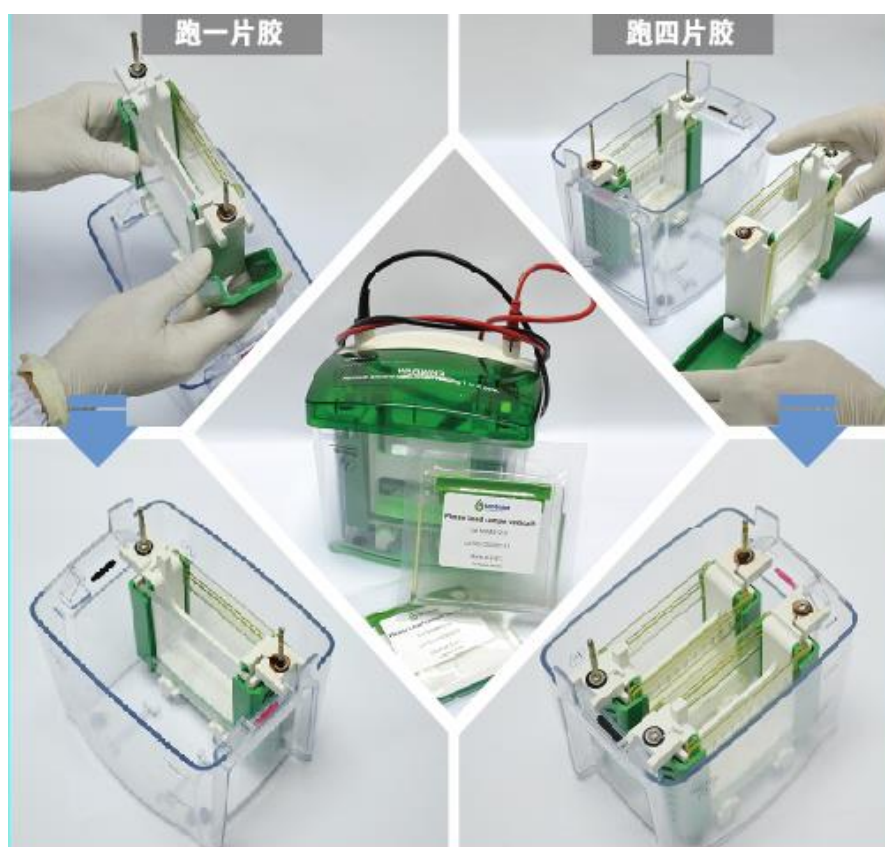


图 4. SurePAGE 预制胶在 Bio-Rad 电泳槽的使用

5. 在电泳槽的内槽中倒入足够的 1× MOPS 或 MES 电泳缓冲液使其覆盖上样孔 5-7 mm，在外槽中加入相同的电泳缓冲液以确保适当的冷却。为了获得最好的效果，外槽的缓冲液需要加到与内槽持平的位置或稍低，但不可漫过胶板（**注意：1. 相对于 MOPS 电泳缓冲液来说，MES 更适合用于小蛋白的分离；2. Tris-Glycine 电泳缓冲液与 SurePAGE 预制胶的 Bis-Tris 缓冲系统不兼容，请不要使用。**）
6. 使用注射器或其他工具吸取适量 1× 的电泳缓冲液，将上样孔轻轻冲洗干净，去除气泡和残留的储存缓冲液。

B. 样品的制备

SDS-PAGE凝胶电泳

5x Loading Buffer配方

SDS	1.0 g
甘油	5.0 ml
溴酚蓝	25 mg
Tris base	150 mg
β-巯基乙醇	1.0 ml
去离子水 (使用 8 M NaOH或8 M HCl调 pH 至6.8)	加至10 ml

10x MES 电泳缓冲液配方:

Tris base	60.6 g
MES	97.6 g
SDS	10 g
EDTA	3 g
去离子水 (使用8 M NaOH或8 M HCl调pH至7.3)	加至1000 ml

10x MOPS 电泳缓冲液配方:

Tris base	60.6 g
MOPS	104.6 g
SDS	10 g
EDTA	3 g
去离子水 (使用8 M NaOH或8 M HCl调pH至7.3)	加至 1000 ml

样品处理：

蛋白样品	x μl
蛋白样品缓冲液 (5x)	2 μl
去离子水	加至 10 μl

上样前将样品加热至100℃，十分钟。

1. 非变性PAGE凝胶电泳

SurePAGE 预制胶的pH为6.4, SurePAGE 不含SDS 可用于酸性蛋白($pI < 6.4$)的非变性电泳,但不能用于碱性蛋白的非变性电泳。要想获得理想的电泳结果,需要您对样品蛋白的结构做分析,对电泳时间和电泳缓冲液的pH做一个摸索。

5x sample buffer:

甘油	5.0 ml
溴酚蓝	25 mg
Tris base	150 mg
去离子水 (使用8 M NaOH 或8 M HCl 调pH至6.8)	加至 10 ml

1x MES 电泳缓冲液配方:

Tris base	6.06 g
MES	9.76 g
EDTA	0.3 g
去离子水 (使用8 M NaOH 或8 M HCl 调pH 至7.3)	加至1000 ml

10x MOPS 电泳缓冲液配方:

Tris base	60.6 g
MOPS	104.6 g
EDTA	3.0 g
去离子水	加至1000 ml

注意事项: 金斯瑞提供的电泳缓冲液粉末 (Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder , 目录号 : M00138) 含有SDS , 所以**不适合**非变性电泳。

样品处理

样品	x μ l
蛋白样品缓冲液(5x)	2 μ l
去离子水	加至10 μ l

不要加热。

2. 电泳过程

蛋白质样品上样

让上样枪头的尖端垂直插入到上样孔中能够获得最佳的上样效果，枪头不能戳破胶体，更不能使胶板变形导致样品漏孔（见图5）。



图 5. 上样方法

注意事项：最佳上样量必须通过实验来确定，样品过量会导致条带的拖尾和失真。加入过量的含自由状态碳水化合物的蛋白，可能会导致条带变形或者蛋白无法穿入胶中（见故障诊断）。

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），在140 V 电压下电泳45-55分钟直至溴酚蓝条带跑到凝胶底部（见表3）。

表3. 一块SurePAGE 预制胶的电泳参数

电压	开始电流	结束电流	电泳时间*
140 V	75-100 mA	30-50 mA	45-55 分钟
*凝胶的电泳时间取决于实验室的温度，这些电泳时间是依据实验室中20℃的MOPS、MES缓冲液得来的			

重要注意事项：

- ◇ 确保使用兼容的电泳槽，内外槽之间液体的泄漏会导致低迁移率（见故障诊断）。
- ◇ 电泳时间可能会改变，取决于电源和凝胶浓度。

3. 从胶板中取出凝胶（见图6）

- 电泳结束后，根据电泳槽制造商的使用说明从电泳槽中取出预制胶。
- 通过镊具或其他合适的工具小心的插入到胶板之间的空隙。
- 用镊具慢慢地上下撬动胶板，重复上述操作，撬动上、中、下三个不同的位置，直至胶板两侧被完全分开。注意小心并最好佩戴护目镜，以免发生人身伤害。
- 打开之后，凝胶可能粘在胶板的任意一侧，将无凝胶的胶板取下，将有凝胶的胶板上有胶一侧浸入水中贴着水面，胶板倾斜轻轻提起，凝胶掉入水中后，将凝胶从水中取出进行染色（使用后的胶板和梳子请以医疗垃圾或实验废弃物处置，不可投入生活垃圾桶中）。

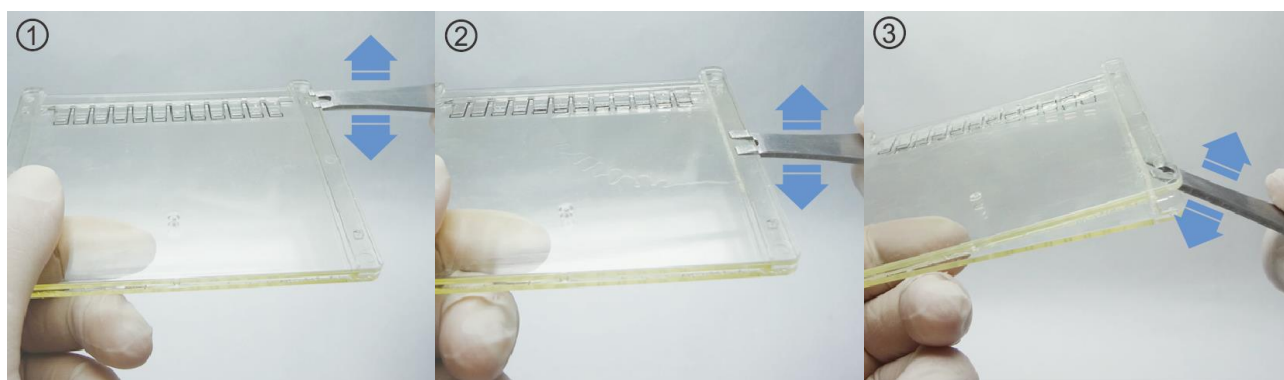


图6. 打开胶板取出凝胶

C. 储存

SurePAGE 预制胶储存温度为2-25℃，如果2-8℃保存，可保存12个月。

V. 凝胶染色

所有标准SDS染色流程均适用金斯瑞SurePAGE 预制胶。当使用市售染色剂和设备，请参考说明书。

A. 考马斯亮蓝 R-250 使用微波炉染色:

- 1) 配制染色液: 在40% 乙醇和10% 醋酸溶液中溶解终浓度为0.1% (W/V) 的考马斯亮蓝R-250。
- 2) 配制脱色液: 将终浓度为10% (V/V) 乙醇、7.5% (V/V) 醋酸溶解在一起。
- 3) 电泳完成后, 撬开胶板取出凝胶, 然后放入装有100 ml 染色液的染色容器中。
- 4) 盖上容器盖子并放入微波炉中用高热档位加热8分钟。为了避免危险, 请注意不要让溶液沸腾。
- 5) 从微波炉中取出染色容器, 放在脱色摇床上常温轻摇5分钟。
- 6) 倒掉染色液并用去离子水小心清洗凝胶。
- 7) 倒掉去离子水, 并加入100 ml 脱色液。
- 8) 盖上盖子, 放入微波炉中用高热档位加热8分钟。
- 9) 倒掉脱色液, 加入新的脱色液, 重复步骤8。
- 10) 从微波炉中取出, 放在脱色摇床上常温轻轻震荡至背景清晰。

B. 考马斯亮蓝 R-250 常规 染色:

- 1) 配制染色液: 在40%乙醇和10%醋酸溶液中溶解终浓度为0.1% (W/V) 的考马斯亮蓝R-250。
- 2) 配制脱色液: 将终浓度为10% (V/V) 乙醇、7.5% (V/V) 醋酸溶解在一起。
- 3) 电泳完成后, 撬开胶板取出凝胶, 然后放入装有100 ml 染色液的染色容器中。
- 4) 放于摇床上轻摇1小时。
- 5) 倒掉染色液并用去离子水小心清洗凝胶。
- 6) 倒掉去离子水, 并加入100 ml 脱色液。
- 7) 放于摇床上轻摇1小时。
- 8) 更换新鲜脱色液, 继续放于摇床上脱色1小时。
- 9) 重复步骤7、8一次。
- 10) 更换新鲜脱色液, 放于摇床上过夜脱色至次日背景清晰。

C. eStain 染色设备 (产品编号 : L00657C)

金斯瑞 eStain™ L1 蛋白快速染色系统采用金斯瑞专利染色技术, 非常适合SurePAGE 系列预制胶的染色脱色实验。条带清晰, 重复性好, 10分钟轻松完成。详情请见官方网站产品页面。

VI. Western Blot 操作步骤

1. 转膜

您可以选择传统湿转或者 eBlot 快速湿转仪(产品编号: L00686)来进行蛋白转膜。

A. 传统湿转

- 1) 用剪刀剪出与海绵大小相仿的滤纸 1 张和 PVDF 膜 1 张, 在 PVDF 膜一角用铅标记。
- 2) 用甲醇活化 PVDF 膜后, 再用转移缓冲液 (M00139) 将滤纸和 PVDF 膜浸泡。
- 3) 向托盘中加入转移缓冲液 (产品编号: M00139), 放入海绵、PVDF 膜、滤纸和转膜夹。
- 4) 转膜夹的黑色板上先铺一块海绵, 再铺滤纸和凝胶。对齐后用玻璃棒赶净气泡。
- 5) 用微量移液器取少量转移缓冲液放在凝胶后铺上 PVDF 膜, 再铺滤纸和海绵。对齐后用玻璃棒赶净气泡。
- 6) 将转膜夹夹紧固定后, 黑面对黑面放入转膜固定装置中。
- 7) 将转膜固定装置和装有冰块的冰盒放在转膜槽中。用转移缓冲液注满转移槽。
- 8) 接通电源, 一般恒压 100 V-110 V, 1 小时左右; 小分子量的可以适当缩短时间; 或者恒压 30 V, 4°C 转膜过夜; 或者恒流 300 mA, 1 小时左右。

B. eBlot 快速湿转仪

使用 eBlot 快速湿转仪时, 请您参考快速湿转仪说明书中的操作步骤进行实验, 只需 9-15 min 即可完成蛋白转膜实验。

2. 封闭及抗体孵育

您可以选择传统方法或者 ONE-HOUR Western blot 试剂盒来进行封闭及抗体孵育。

A. 传统方法

操作步骤如下:

- 1) 关闭电源, 打开转膜夹将 PVDF 膜取出, 用双蒸水冲洗。
- 2) 将 PVDF 膜放在封闭液中, 摇床上 37°C 封闭 1 小时。
- 3) 弃去封闭液, 用 PBST 缓冲液洗涤, 用一抗工作液孵育, 摇床上 37°C 孵育 1 小时。
- 4) 弃去一抗工作液, 用 PBST 缓冲液洗涤, 用二抗工作液孵育, 摇床上 37°C 孵育 1 小时。
- 5) 弃去二抗工作液, 用 PBST 缓冲液洗涤。摇床上洗膜 4 次, 每次 5 分钟。

B. ONE-HOUR Western Blot 试剂盒

关于操作步骤, 请您参考 ONE-HOUR Western blot 试剂盒说明书中的步骤进行实验。

3. 显影曝光

操作步骤如下：

- 1) 用平板纸吸去膜上残余液体，将 PVDF 膜平放。
- 2) 用微量移液器取等体积的 ECL 试剂中的 A 液和 B 液放在 EP 管中恢复至室温。
- 3) 混合后均匀地加到膜上，避光反应 30-60 秒。
- 4) 弃去 ECL 混合液置于暗盒中曝光显影，曝光时间控制在 30 秒左右。

VII. Dot Blot 操作步骤

操作步骤如下：

- 1) 用 PBS 缓冲液配制 5 ng, 2.5 ng, 1.25 ng, 0.625 ng, 0.3125 ng 和 0 ng His 标签蛋白，放在 EP 管中。
- 2) 用微量移液器将 2 μ l 的不同浓度 His 标签蛋白点到膜上。
- 3) 将点样后的膜放在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 30 分钟。
- 4) 将膜放在封闭液中，摇床上 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 分钟。
- 5) 弃去封闭液，用 PBST 缓冲液洗涤，用一抗工作液孵育，摇床上 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- 6) 弃去一抗工作液，用 PBST 缓冲液洗涤，用二抗工作液孵育，摇床上 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- 7) 弃去二抗工作液，用 PBST 缓冲液洗涤。摇床上洗膜 4 次，每次 5 分钟。
- 8) 用平板纸吸去膜上残余液体，将膜平放。
- 9) 用微量移液器取等体积的 ECL 试剂中的 A 液和 B 液放在 EP 管中恢复至室温。
- 10) 混合后均匀地加到膜上，避光反应 30-60 秒。
- 11) 弃去 ECL 混合液置于暗盒中曝光显影，曝光时间控制在 30 秒左右。

表4. Western/Dot Blot缓冲液配方

配方名称	配方内容
封闭液	5 g 脱脂奶粉，100 ml PBS
PBS 缓冲液	3.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.26 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,8.5 g NaCl ,加 ddH ₂ O 至 1 L。
PBST 缓冲液	0.5 ml 吐温-20，1000 ml PBS

VIII. 凝胶实例

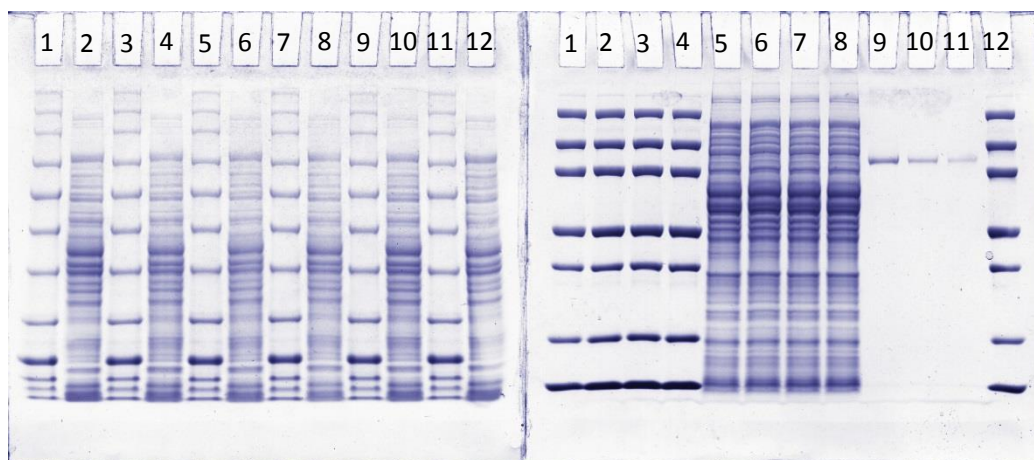


图7. 4-12% Bis-Tris, 10x8 SurePAGE 预制胶蛋白分离效果图

12孔4-12% SurePAGE 预制胶(L)与12孔4-12% SurePAGE 预制胶(R)蛋白分离效果图，选用eStain 蛋白染色系统 (R-250)进行染色。

(L):

泳道1, 3, 5, 7, 9, 11: 4 μ l Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245KDa) (P7712S) ;

泳道2, 4, 6, 8, 10, 12: 6 μ l *E.coli* 细胞裂解液。

(R):

泳道1, 2, 3, 4, 12: 4 μ l GenScript PAGE-MASTER Protein Standard (for SDS-PAGE) (M00516) ;

泳道5, 6, 7, 8: 6 μ l *E.coli* 细胞裂解液 ;

泳道9, 10, 11: 50 ng, 25 ng, 12.5 ng BSA。

IX. 问题分析及解决方法

问题	可能原因	解决方法
条带弯曲	上样孔或者凝胶与胶板间存在气泡	以注射器或者其他工具用电泳缓冲液冲刷上样孔
条带拖尾	样本难溶或者含有弱电解质（如碳水化合物）	在SDS存在下加热样品，离心后取上清液上样
条带分辨率低	胶浓度错误	参照蛋白质迁移表选择合适凝胶
	上样量过载	减少上样量，单孔总蛋白量不超过50 µg
	电泳缓冲液不足，无法降温	外槽的电泳缓冲液增加至与上样孔底部大致齐平，以改善散热
样品条带在凝胶中扩散状	样品含盐类过多	采用透析或者超滤除盐
溴酚蓝前沿变黄	电泳缓冲液从变形、损坏的胶板渗入	选用合适的电泳槽，确认胶板是否破损
	pH 值下降	用去离子水重新配置电泳缓冲液
电泳时间过长	胶带未撕	撕掉胶板下方胶带
	电泳条件有误	使用固定电压和自动电流，如：140V恒压条件进行电泳
溴酚蓝前沿附近条带模糊或条带与预期不符	凝胶中离子干扰（分析小分子蛋白时容易出现）	使用MES电泳缓冲液
		电泳更长时间或者忽略
电压无法达到设定值	电泳时内外槽漏液	使用合适的电泳槽
	样品中其他盐类干扰	使用透析或超滤除盐
凝胶与胶板间出现大量气泡	电泳缓冲液过热	4°C时电泳
		在外槽添加更多的电泳缓冲液
蛋白上样量达不到样品孔的最大体积	上样不够仔细或太快	需比较慢且小心地上样

X. 相关产品和订购信息

产品	产品编号
5x Sample Buffer	MB01015
Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder	M00138
Transfer Buffer Powder	M00139
Smart Advanced Broad-Range Protein Standard	M00441
Smart Dual Color Pre-Stained Protein Standard	M00442
Smart Multi Color Pre-Stained Protein Standard	M00443
Protein Marker for Fluorescent Western Blotting	M00124
High Range EasyWestern Protein Standard	M00276
PAGE-MASTER Protein Standard (for SDS-PAGE)	M00516
PAGE-MASTER Protein Standard Plus	MM1397-500
WB-MASTER Protein Standard	M00521
eStain™ L1 蛋白染色仪	L00657C
THE™ His Tag Antibody, mAb, Mouse	A00186-100
MonoRab™ DYKDDDDK Tag Antibody, mAb, Rabbit	A01868-40
Mouse Anti-Rabbit IgG Antibody (M205) [HRP], mAb	A01827-200
eBlot™ L1 快速湿转仪	L00686
ONE-HOUR™ Western Standard Kit (Mouse)	L00205

南京金斯瑞生物科技有限公司

江苏省南京市江宁区科学园雍熙路28号

订购电话：400-025-8686-5810或025-58897288-5810

Email: product@genscript.comWeb: <http://www.genscript.com.cn>**For Research Use Only**