

Version: 02

Update: 04/19/2024

## **SurePAGE™ Midi蛋白预制胶使用说明手册**

# 目 录

I	简介 .....	1
II	凝胶选择指导 .....	2
III	电泳槽选择指导 .....	3
IV	SurePAGE™ Midi 蛋白预制胶使用简介 .....	3
V	凝胶染色操作步骤 .....	8
VI	Western Blot 操作步骤 .....	9
VII	常见问题与解决方法 .....	10

## I 简介

金斯瑞SurePAGE™ Midi蛋白预制胶是一款高性能的中型聚丙烯酰胺凝胶，上样孔数分别为20孔和26孔，能满足客户多种蛋白研究需求，是SDS-PAGE和Western Blot的理想选择。该预制胶为Bis-Tris凝胶缓冲体系，比常规的Tris-Glycine体系具有更强的缓冲能力，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™ Midi蛋白预制胶提供4-12%的梯度胶和10%、12%的固定浓度胶，每种浓度的预制胶都有20个点样孔和26个点样孔两种规格。胶板尺寸：长×宽为150×103 mm，凝胶尺寸：长×宽×厚为130×83×1 mm。

### 主要特点：

- 简单易用 — 即开即用，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℃可保存18个月
- 重复性好 — 不同批次预制胶的一致性良好

## 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
M00995	4-12%	20	25 µl	MOPS, MES	Tris-Bicine	20-250 kDa
M00996	4-12%	26	15 µl	MOPS, MES	Tris-Bicine	20-250 kDa
M01106	10%	20	25 µl	MOPS, MES	Tris-Bicine	20-160 kDa
M01107	10%	26	15 µl	MOPS, MES	Tris-Bicine	20-160 kDa
M01110	12%	20	25 µl	MOPS, MES	Tris-Bicine	6.5-120 kDa
M01111	12%	26	15 µl	MOPS, MES	Tris-Bicine	6.5-120 kDa

参考如下凝胶迁移指导图，可以帮助您选择合适的电泳缓冲液进行蛋白电泳：



图 1. 凝胶迁移指导图

### III 电泳槽选择指导

SurePAGE™ Midi蛋白预制胶可兼容以下电泳槽：

GenBox Midi Electrophoresis tank (产品编号: L01001)
GenBox Midi/Mini Electrophoresis tank (产品编号: L01022)
SureLock™ Tandem Midi Gel Tank
XCell4 SureLock™ Midi-Cell

### IV SurePAGE™ Midi 蛋白预制胶使用简介

#### 4.1 电泳缓冲液和电泳槽的准备

- 1) 取一包电泳缓冲液粉末（产品编号：M000138）溶解在 1 L 去离子水中制成 1×电泳缓冲液；
- 2) 从包装袋中取出 SurePAGE™ Midi 蛋白预制胶，撕掉胶板侧面的白色胶带（见图 2）；

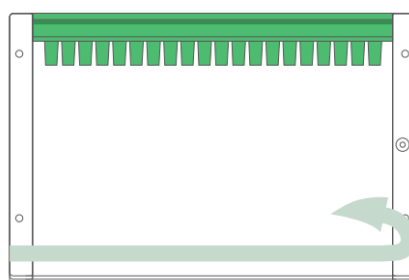


图 2. 撕下胶板侧面胶带

- 3) 双手平稳地将梳子从胶板中推出（见图 3）；

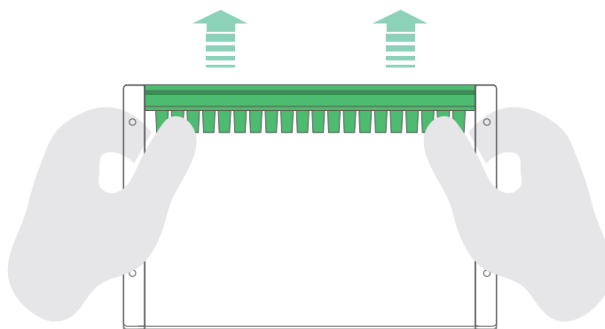


图 3. 将梳子从胶板中推出

- 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：

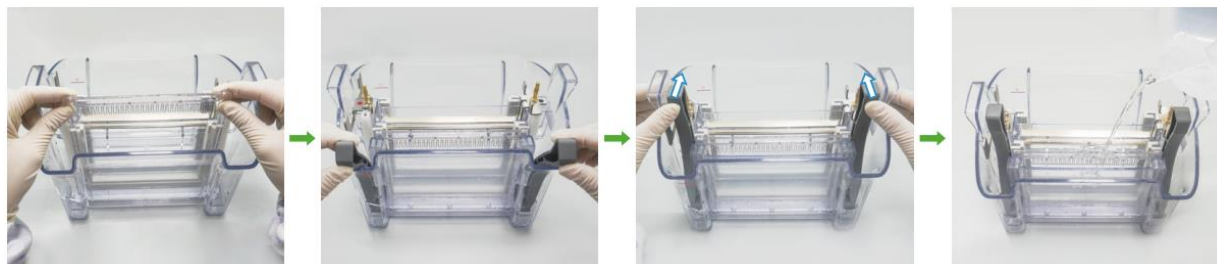


图 4. SurePAGE™ Midi 在 SureLock™ Tandem Midi Gel Tank 中的使用示意图

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凝胶上样孔 5-7 mm, 在外槽中加入适量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 2/3 位置, 且低于内槽液面。(注意: 1. 和 MOPS 电泳缓冲液相比, MES 更适合用于小蛋白的分离; 2.Tris-Glycine 电泳缓冲液与 Midi 预制胶的 Bis-Tris 缓冲体系不兼容, 请不要使用)。

6) 使用注射器或其它工具吸取适量 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。

## 4.2 样品的制备

### 1) SDS-PAGE 凝胶电泳

请参照下表制备电泳样品:

组分	还原 (μl)	非还原 (μl)
蛋白样品	X	X
4X LDS Sample Buffer	2.5	2.5
1M DTT	1	0
去离子水	6.5-X	7.5-X
总体积	10	10
上样前将样品加热至 70-100°C、十分钟, 离心后取上清上样		

常见试剂配方:

#### 4x LDS Sample Buffer

LDS	2%
Glycerol	10%
EDTA	0.51 mM
Tris base	141 mM
Tris HCl	106 mM
Phenol Red	0.175 mM
SERVA Blue G-250	0.22 mM
pH 8.4	

#### 5x Sample Buffer

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

Tris base	60.6 g
MES	97.6 g
SDS	10 g
EDTA	3 g
去离子水	加至1000 mL

### 10x MOPS电泳缓冲液

Tris base	60.6 g
MOPS	104.6 g
SDS	10 g
EDTA	3 g
去离子水	加至 1000 mL

相关产品列表：

产品编号	产品名称	规格
M00138	Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder	1 Box (5/PK)
M00677	MES SDS Running Buffer Powder	1 Box (5/PK)
M00676	4X LDS Sample Buffer	10 mL
MB01015	5X Sample Buffer	5 mL

## 2) 非变性凝胶电泳

SurePAGE™ Midi蛋白预制胶的pH为6.4，凝胶不含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。为了想获得理想的电泳结果，需要您对样品蛋白的结构做分析，并摸索最适的电泳时间和电泳缓冲液的pH。

请参照下表制备电泳样品：

组分	体积 (μl)
蛋白样品	X
5x Sample Buffer (Native) (产品编号: M00726C)	2
去离子水	加至 10 μl
不要加热	

常见试剂配方：

#### 5x Sample Buffer (Native)

甘油	5.0 mL
溴酚蓝	25 mg
Tris base	150 mg
$\beta$ -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 (Native)

Tris base	60.6 g
MES	97.6 g
EDTA	3 g
去离子水	加至1000 mL

#### 10x MOPS电泳缓冲液 (Native)

Tris base	60.6 g
MOPS	104.6 g
EDTA	3 g
去离子水	加至 1000 mL

相关产品列表：

产品编号	产品名称	规格
M00727C	Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder (Native)	1 Box (5/PK)
M00729	MES SDS Running Buffer Powder (Native)	1 Box (5/PK)
M00726C	5X Sample Buffer (Native)	5 mL

注意事项：

金斯瑞提供的电泳缓冲液粉末 (Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder, 产品编号: M00138; MES SDS Running Buffer Powder, 产品编号: M00677) 含有SDS, 所以**不适合**非变性电泳。

### 4.3 电泳过程

#### 1) 蛋白质样品上样和电泳

取10 $\mu$ l上样枪头的尖端垂直插入到上样孔中, 缓慢的将样品注入胶孔中, 能够获得最佳的上样效果, 注意枪头不能戳破胶体, 更不能使胶板变形导致样品漏孔 (见图5)。

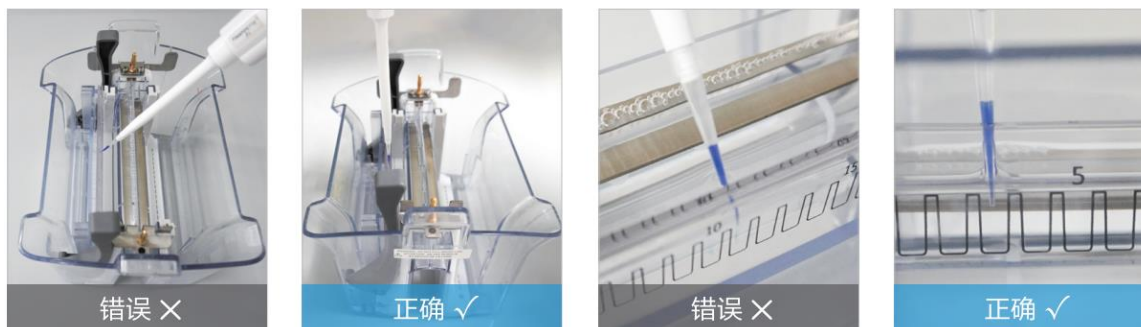


图 5. 上样指导图

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200 V 电压下电泳30-45分钟直至溴酚蓝条带跑到凝胶底部（见表2）。

**表2.** 一块Midi预制胶的电泳参数

电泳缓冲液	电 压	初始电流	结束电流	电泳时间/凝胶*
MOPS	200V	165-205 mA	60-70 mA	37+ min
MES	200V	185-205 mA	100-115 mA	28+ min
*表格中的电泳时间是在金斯瑞实验室进行的25℃条件下的测试结果。				

**!注意事项:**

- 请确保使用兼容的电泳槽，内外槽之间液体的泄漏会导致迁移率变低（详见常见问题）；
- 电泳时间可能会因为电源、凝胶浓度和环境温度的不同而发生变化；
- 为获得最佳电泳效果，您可以将电压调整为160-180 V。

**2) 从胶板中取出凝胶**

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。将撬具或其它合适的工具小心的插入到胶板之间的空隙，缓慢的上下撬动胶板，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（见图6）。

打开胶板后，凝胶可能粘在胶板的任意一侧，将无凝胶的胶板取下，再将带有凝胶的胶板上有胶的一侧浸入水中贴着水面，然后倾斜轻轻提起胶板，凝胶掉入水中后，将凝胶从水中取出进行后续实验。

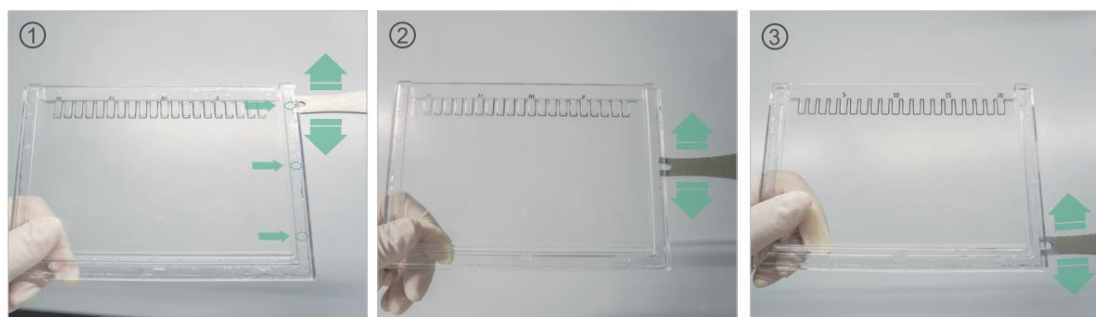


图 6. 胶板打开示意图

**注意事项:**

- 建议佩戴护目镜，以免造成人身伤害；
- 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。

#### 4.4 储存

SurePAGE™ Midi蛋白预制胶储存温度为2-25℃，如果2-8℃保存，可保存18个月。

## V 凝胶染色操作步骤

所有标准SDS染色流程均适用金斯瑞SurePAGE™ Midi蛋白预制胶。如果使用市售染色试剂和设备，请参考制造商提供的使用说明书。

### 5.1 考马斯亮蓝R-250使用微波炉染色:

- 1) 染色液配制: 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) 脱色液配制: 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;
- 5) 注意: 不要让溶液沸腾, 以免造成危险。
- 6) 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;
- 7) 倒掉染色液并用去离子水小心清洗凝胶;
- 8) 倒掉去离子水, 并加入100 mL脱色液;
- 9) 盖上盖子, 放入微波炉中用高热档位加热8分钟;
- 10) 倒掉脱色液, 加入新的脱色液, 重复步骤8;
- 11) 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。

### 5.2 考马斯亮蓝R-250常规染色:

- 1) 染色液配制: 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) 脱色液配制: 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。

### 5.3 凝胶实例

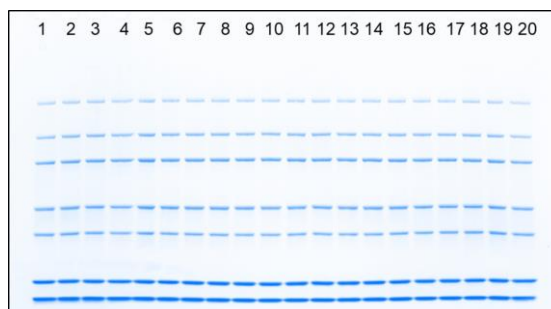


图 7. 蛋白分离效果图

凝胶: SurePAGE™ Midi, Bis-Tris, 4-12%, 20 wells (产品编号: M00995)

上样: 5μl PAGE-MASTER Protein Standard (产品编号: M00516)



## VI Western Blot 操作步骤

### 6.1 转膜

您可以选择使用传统湿转方法或者eBlot™ L2快速湿转仪(产品编号: L00981C)进行蛋白转膜。使用eBlot™ L2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5-15 min即可完成蛋白转印实验。

#### 传统湿转

- 1) 用剪刀剪出与海绵大小相仿的滤纸2张和PVDF膜1张,在PVDF膜一角用铅笔标记;
- 2) 用甲醇活化PVDF膜后,再用转移缓冲液(产品编号: M00139)将滤纸和PVDF膜浸泡;
- 3) 向托盘中加入转移缓冲液,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。对齐后用转印滚轮赶走气泡;
- 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,对齐后用转印滚轮赶走气泡;
- 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,小分子蛋白的可以适当缩短时间;或者恒压30 V, 4℃转膜过夜;或者恒流300 mA, 1小时左右。

### 6.2 封闭及抗体孵育

您可以选择使用传统孵育方法或者Western rapid kit(产品编号: L00884C)进行封闭及抗体孵育。使用Western rapid kit时,请您参考Western rapid kit说明书中的操作步骤进行实验,在转膜完成后,无须单独进行封闭步骤,可直接进行抗体孵育,最快1小时完成抗体孵育。

#### 传统方法

- 1) 关闭电源,打开转膜夹将PVDF膜取出,用去离子水冲洗;
- 2) 将PVDF膜放在封闭液中,摇床上室温封闭1小时;
- 3) 弃去封闭液,用一抗稀释液孵育,摇床上室温孵育2小时或4℃过夜;
- 4) 弃去一抗稀释液,在摇床上,用PBST缓冲液洗涤3\*5min,用二抗稀释液孵育,摇床上室温孵育1小时;
- 5) 弃去二抗稀释液,在摇床上,用PBST缓冲液洗涤4\*5min。

### 6.3 显影曝光

推荐使用ePhoto™直触式成像系统(产品编号: L00797C)实现0.5秒快速成像,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ePhoto™快速成像系统中曝光显影。

## VII 常见问题与解决方法

问题	原因分析	建议
条带变形	上样孔中有气泡或残留的凝胶保存液	在加注电泳缓冲液前后，用注射器吸取电泳缓冲液轻轻冲洗上样孔，直至将气泡吹出
	样品蛋白浓度过高	使用上样缓冲液稀释蛋白样品
条带拖曳、滞孔	样品中含有较大颗粒杂质如细胞碎片、菌体碎片	高速离心后，取上清液用于后续电泳实验
	蛋白样品未充分溶解（如包涵体蛋白）	在样品中额外添加十二烷基硫酸钠硫酸钠（SDS）或使用上样缓冲液稀释样品
蛋白条带前沿变黄	电泳缓冲液重复使用，缓冲性能下降	更换新鲜配制的电泳缓冲液
	缓冲液使用量太少	内槽加满，外槽电泳液加到 2/3 处，防止电泳过程中温度过高
	环境温度太低，电泳时间过长	建议控制室内温度和电泳缓冲液温度在 20-25℃
蛋白分离效果不佳	凝胶浓度不合适	根据凝胶最佳分离范围，选用不同浓度凝胶 对于小分子蛋白的分离，请选用较高浓度的预制胶产品
	样品蛋白量超出凝胶分离能力	适当减少上样量
	样品含盐量过高	使用透析、超滤或稀释的方法降低样品盐浓度，再进行电泳
	电泳体系温度过高	提高电泳缓冲液用量，控制实验环境温度在 20-25℃
	MOPS 电泳缓冲液性能无法达到实验设计要求	使用 MES 电泳缓冲液进行实验（适合 <30kDa 蛋白的分离）
凝胶在转膜时粘在膜上	凝胶浓度低、质地较软，转膜时受热易与转印膜粘连	降低转膜温度，添加冰袋或在低温环境中进行转膜实验
凝胶冷冻后能否继续使用	受冻的凝胶易碎，可能在电泳或染色过程中破裂	不推荐使用
	受冻的凝胶在电泳过程中可能形成气泡，并在中间泳道中出现部分条带扭曲	
电泳时抗体样品在所有泳道中均出现向前弥散	向前弥散表示抗体在凝胶上的迁移过程中被还原，这可能是由于样品缓冲液中加入了抗氧化剂或样品缓冲液加热时发生二硫键重排	确保样品缓冲液中加入了正确浓度的还原剂并且未加入任何抗氧化剂

电泳时发现凝胶中间有气泡，且在中间泳道上有部分条带发生严重扭曲	凝胶受冻	请确保将凝胶保存在 2-25°C，远离冷冻层，检查冰箱设置，确保冰箱工作稳定，避免意外受冻
电泳时间长于正常时间	电泳缓冲液稀释过度	检查缓冲液配方；必要时，重新配制
	凝胶安装不当，电泳槽内槽漏液	确保电泳槽正确安装，密封胶条在原位，且电泳槽的卡夹已锁定
	电压设置过低	设置正确的电压，建议 180~200V 恒压
电泳速度比正常速度快，且分辨率较差	使用的缓冲液浓度过高或错误	检查缓冲液配方；必要时，稀释或重新配制
	电压、电流或功率设置过高	将电源条件降低至推荐范围
每个胶孔中蛋白样品不同，但在多个相邻泳道中看到相同的蛋白条带	上样错误，导致样品残留污染了相邻泳道	1.使用合适的凝胶上样工具将样品加到孔中 2.减少上样体积 3.请勿延迟上样 4.请勿延迟电泳，因为蛋白质会水平扩散；当满孔与空孔相邻时，满孔会随时间的推移而逐渐污染空孔
	电泳缓冲液污染	重新配制电泳液,且彻底清洗电泳槽，重新开始电泳
凝胶泳道中的蛋白条带呈不规则形或波浪形	上样孔中有碎片	上样前检查和冲洗上样孔，保证孔内干净
	样品含盐量高	确保盐浓度不超过 50–100 mM
	电泳缓冲液异常	重新配制新鲜电泳缓冲液
	凝胶异常	更换新的凝胶再次尝试
蛋白电泳时,出现“V”形蛋白质条带	出现“V”形蛋白质条带是因为样品中存在 DNA	在 SDS 增溶步骤后，增加超声处理步骤来剪切 DNA，解决或使问题最小化；或使用超速离心可从样品中去除 DNA

打开电源，凝胶无法开始电泳，电源上也没有电压或电流读数	胶带未撕	检查凝胶底部的胶带是否撕掉
	安装方向错误	确保凝胶安装方向正确，即胶板较高的一面（有印刷字体）面向电泳装置的外侧
	电泳槽内槽漏液	确保电泳槽的内槽加入了足够的缓冲液，可浸没上样孔。若未浸没上样孔，检查是否有泄漏并重新封装
	连接松动	检查电极或电泳槽装置的连接处是否有松动，插紧

**For research use only. Not intended for human or animal clinical trials, therapeutic or diagnostic use.**

生产商：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

Manufacturer: Nanjing GenScript Biotech Co., Ltd. No. 28 Yongxi Road, Jiangning District, Nanjing, Jiangsu, China