



SDS—聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳 (SDS—PAGE)

Sodium **D**odecyl **S**ulfate
Poly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis

杨春燕

厦门大学 生命科学学院

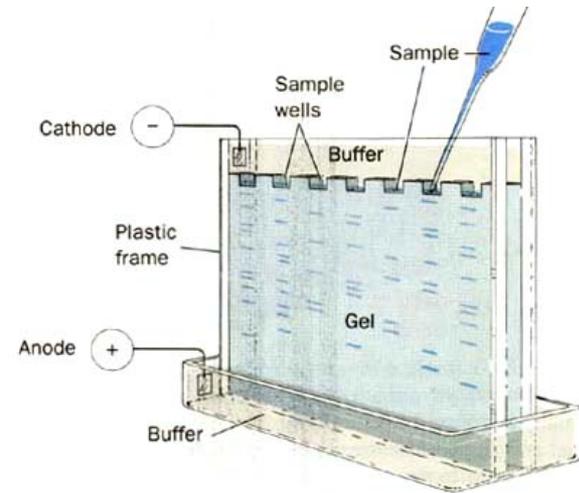
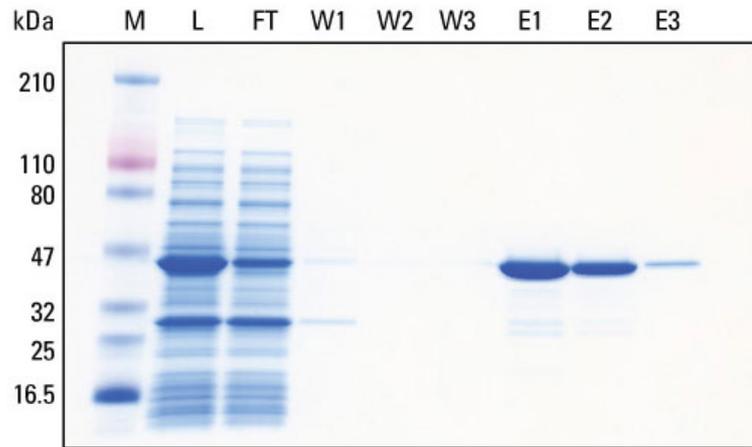
纲要



背景介绍

SDS - PAGE

SDS-PAGE是以**聚丙烯酰胺凝胶**作为支持介质的一种常用**电泳**技术，用于**分离蛋白质**。

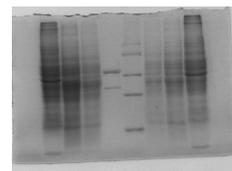
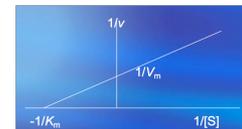
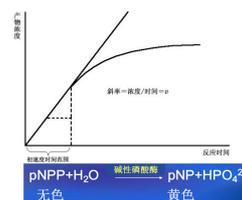


蛋白质的赛跑

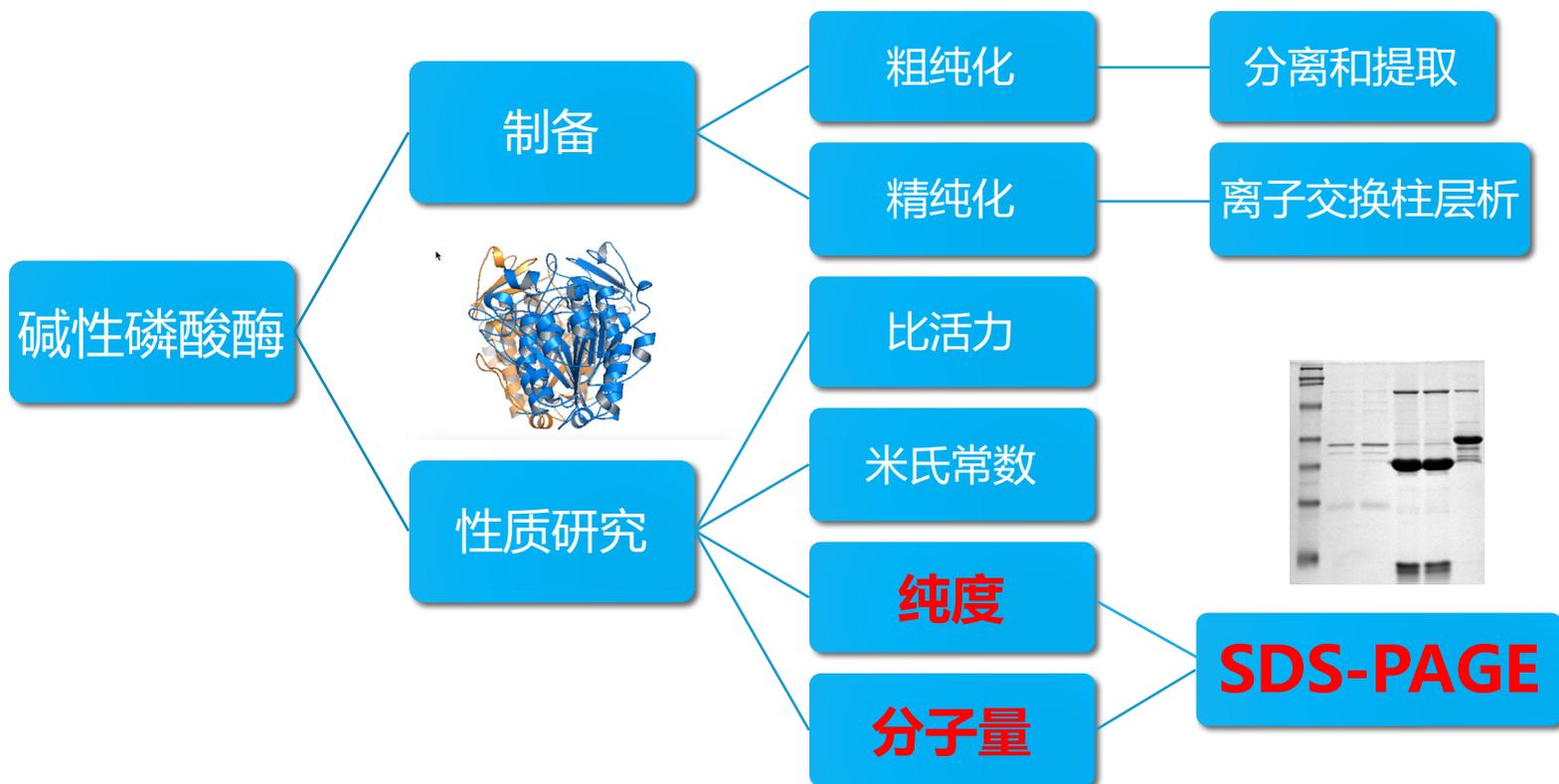


2017/2018 生物化学实验学时安排

周数	内容提要	实验类型	实验时数	实验地点	拔尖班(周三)	普通班(周四周五)
1 (9/20)	绪论 分组、玻璃仪器清洗及试剂配制	讲授	6	5号楼 B-514, 516	石艳 周化民	石艳 周化民、杨春燕
2 (9/27)	学习常用仪器使用 (移液器、离心机、分光光度计 (高锰酸钾测定)等)	综合	5	同上	王勤 左正宏	王勤 刘敏、徐庆妍
4 (10/11)	糖的定量分析	综合	5	同上	刘敏 左正宏	刘敏 石艳、徐庆妍
5 (10/18)	蛋白质的定量分析、 粗脂肪的测定	综合	4+4	同上	周化民 杨春燕	周化民 杨春燕、王勤
6 (10/25)	茶多糖的制备	综合	6	同上	徐庆妍 王勤	徐庆妍 王勤、周化民
7 (11/1)	茶多糖的结构鉴定(配试剂)	综合	6	同上	徐庆妍 石艳	徐庆妍 石艳、杨春燕
8 (11/8)	酶的底物专一性 pH 对酶活性影响 温度对酶活性影响 激活剂与抑制剂对酶活性的影响	综合	5	同上	周化民、 刘敏	周化民 刘敏、石艳
9 (11/15)	氨基酸纸层析 pH 计使用及缓冲液的配制	综合	6	同上	刘敏、 杨春燕	刘敏、 杨春燕、王勤
10 (11/22)	碱性磷酸酶的制备 (pNP 标准曲线制作)	综合	6	同上	王勤 杨春燕	王勤 杨春燕、左正宏
11 (11/29)	碱性磷酸酶比活力测定 碱性磷酸酶米氏常数测定	综合	4+4	同上	石艳 周化民	石艳 周化民、刘敏
12 (12/6)	离子交换柱层析(2-4 人一组)	综合	8	同上	石艳 左正宏、王勤	石艳 左正宏、王勤
13 (12/13)	AKTA 蛋白纯化系统的使用(凝 胶过滤)(2-4 人/组)(拔尖班) SDS-PAGE 分离蛋白质(普通班)	综合	5	同上	杨春燕 刘敏	杨春燕 周化民、刘敏、
14(12/20)	SDS-PAGE 分离蛋白质(自选实 验试剂配制)(拔尖班) AKTA 蛋白纯化系统的使用(6 人 /组),自选实验试剂配制(普通班)	综合	8	同上	杨春燕 周化民、刘敏	杨春燕 刘敏、徐庆妍
15(12/27)	自选实验	综合	8	同上	石艳、王勤	石艳、王勤、周 化民
16(1/3)	学期总结汇报	综合	6	同上	全体	全体



碱性磷酸酶实验模块



实验目的和原理

实验目的

1. 理解电泳技术的基本原理
2. 理解SDS-PAGE检测蛋白质分子量的原理
3. 掌握SDS-PAGE的实验技术及结果分析
4. 以碱性磷酸酶为例，进一步提高分析鉴定蛋白质的思维能力，
建立SDS-PAGE应用的基本概念

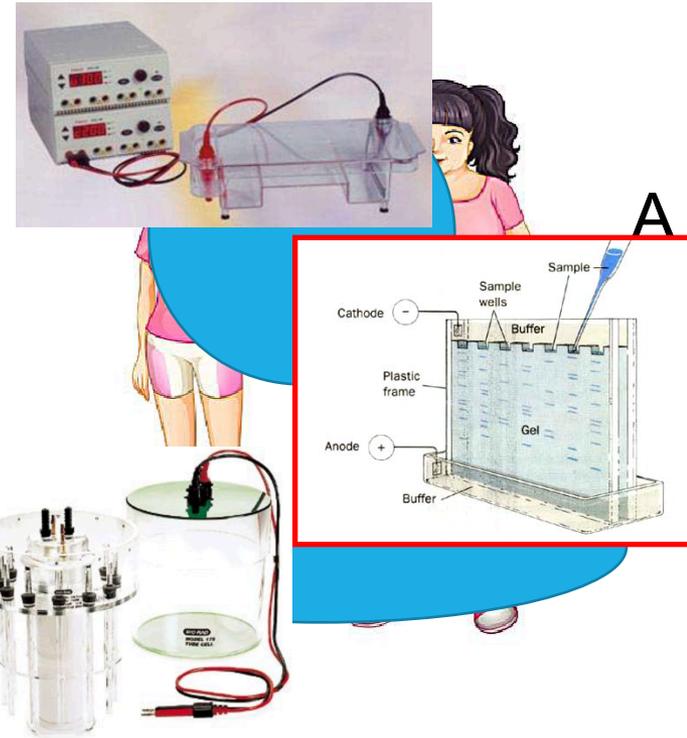
电泳技术的基本原理

● **电泳**：带电粒子在电场中的定向移动。电泳技术就是根据各种**带电粒子**在电场中**迁移速度（泳动率）**的不同而对物质进行分离的一类实验技术。

● **影响迁移速度的因素**

- 内因：
- 1. 净电荷 （电荷多，泳动速度快）
 - 2. 质点大小 （质点大，泳动速度慢）
 - 3. 质点形状 （球形分子比纤维状分子快）

- 外因：
- 1. 电场强度 （电场强度高，泳动速度快）
 - 2. 缓冲液的pH (pH恒定) （影响净电荷）
 - 3. 离子强度[I] 最适:0.02-0.2
 - 4. 电渗：液体对固体支持物的相对移动



SDS - PAGE电泳原理

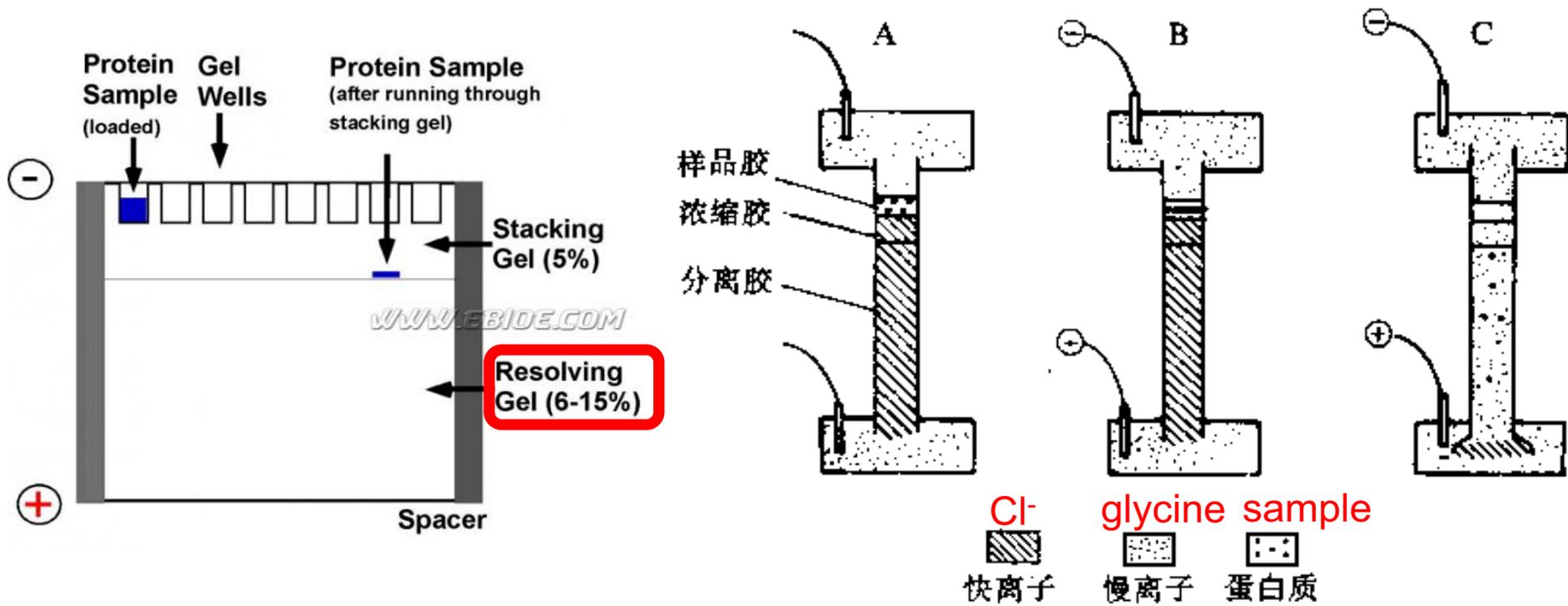
聚丙烯酰胺凝胶是由**丙烯酰胺 (Acr)** 和交联剂**N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺 (Bis)** 在**催化剂 (过硫酸铵)** 和**加速剂 (四甲基乙二胺TEMED)** 作用下, 聚合交联而成的具有网状立体结构的凝胶, 并以此为支持物进行电泳。

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 可根据不同蛋白质分子所**带电荷的差异**及**分子大小**的不同将蛋白质分离成若干条带。

SDS (十二烷基硫酸钠) 与蛋白质结合, 掩盖各种蛋白分子间天然的电荷差异。因此, 各种蛋白质-SDS 复合物在电泳时的迁移速率, 不再受原有电荷和分子形状的影响, **而只与分子大小相关**。

推力: 电荷 (E) 吸引; 阻力: 凝胶 (PAG) 阻碍物质运动

SDS-PAGE示意图



A为电泳前3层凝胶排列顺序，3层胶中均有快离子，慢离子
 B显示电泳开始后，蛋白质样品夹在快、慢离子之间被浓缩成极窄的区带。
 C显示蛋白质样品分离成数个区带。

蛋白质的浓缩效应

在不连续电泳系统中，含有上、下槽缓冲液(running buffer : Tris-Gly , pH8.3)、浓缩胶缓冲液(stackin g el buffer : Tris-HCl , pH6.8)、分离胶缓冲液(seperating gel buffer : Tris-HCl , pH8.8)

浓缩胶 : Cl⁻ (墙) > Pr⁻ > Gly (电中性-消失)

由于Cl⁻很快超过蛋白离子，因此在其后面形成一个电导较低、电位梯度较陡的区域，该区电位梯度最高，这是在电泳过程中形成的**电位梯度的不连续性**，导致蛋白质和Gly⁻离子加快移动，结果使蛋白质在进入分离胶之前，快、慢离子之间浓缩成一薄层，有利于提高电泳的分辨率。

分子筛效应

蛋白质离子进入分离胶后，其pH 升高，使Gly 解离成负离子的效应增加；同时因凝胶的浓度升高，蛋白质的泳动受到影响，迁移率急剧下降。

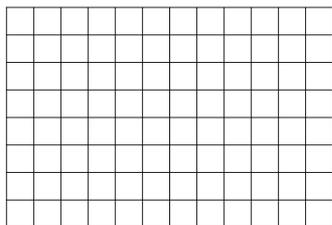
分离胶：Cl⁻ > Gly⁻ > Pr⁻

高电压梯度不复存在，蛋白质便在一个较均一的pH 和电压梯度环境中，按其分子的大小移动。

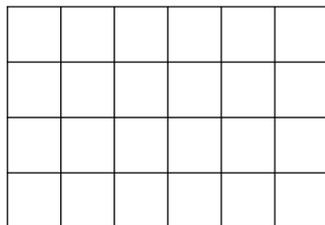
凝胶浓度的选择

凝胶浓度越大，孔径越小

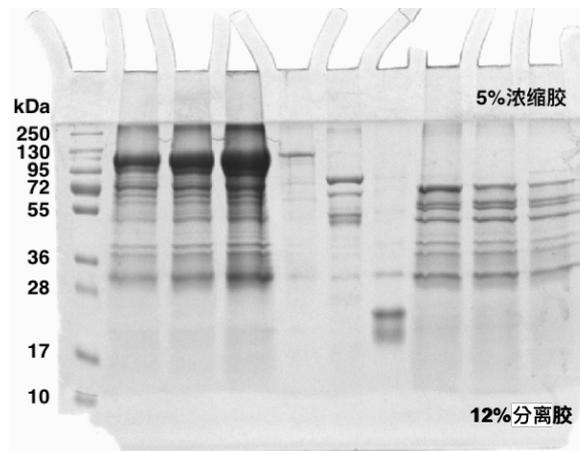
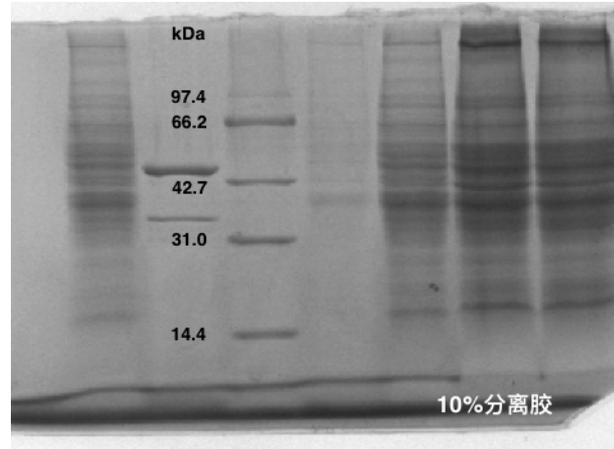
15%胶



10%胶



SDS-PAGE分离胶浓度	最佳分离范围
6%胶	50-150kD
8%胶	30-90kD
10%胶	20-80kD
12%胶	12-60kD
15%胶	10-40kD



实验仪器、试剂和材料

1. 仪器

玻璃板，垂直板电泳槽，电泳仪，移液器，微量进样器，微波炉

2. 试剂

2.1 样品处理相关试剂

样品缓冲液/上样缓冲液 (2*SDS 样品缓冲液)

2.2 SDS-PAGE电泳相关试剂

分离胶缓冲液(3.0 M pH 8.9 Tris-HCl缓冲液)

浓缩胶缓冲液(0.5 M pH6.7 Tris-HCl缓冲液)

凝胶贮液(30 % Acr - 0.8 %Bis)

10%过硫酸铵(APS)

TEMED

Tris-Glycine电极缓冲液(pH 8.3)

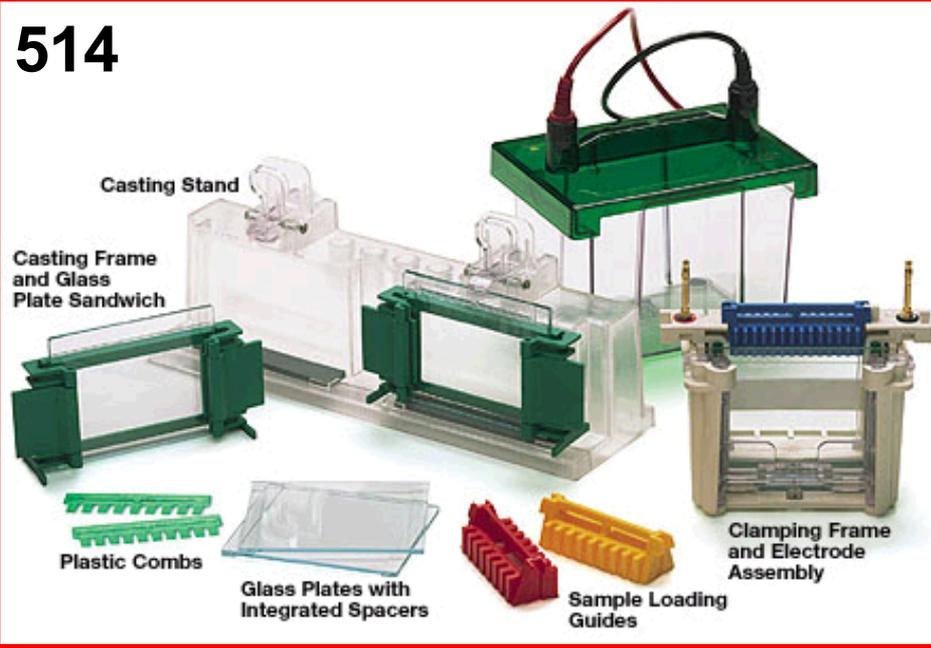
2.3 考马斯亮蓝染色系统

染色液，脱色液

3. 材料（蛋白质样品）

碱性磷酸酶各步纯化酶样

514



516



垂直板电泳槽配件



垂直槽隔条玻璃片



垂直槽短玻璃片



垂直槽制胶支架



垂直槽制胶固定架



垂直槽样品梳子-10孔



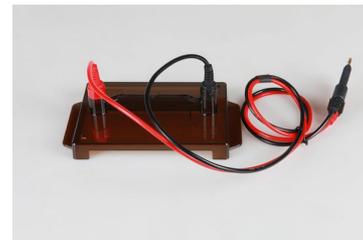
垂直槽电极架



垂直槽槽内固定架



槽底壳



槽盖



剥胶铲



垂直槽玻璃
替代塑料片



垂直槽加样孔

实验流程

SDS-PAGE实验流程

制胶



处理样品



上样



SDS-PAGE电泳



剥胶、染色与脱色



结果保存与分析

装板

配胶

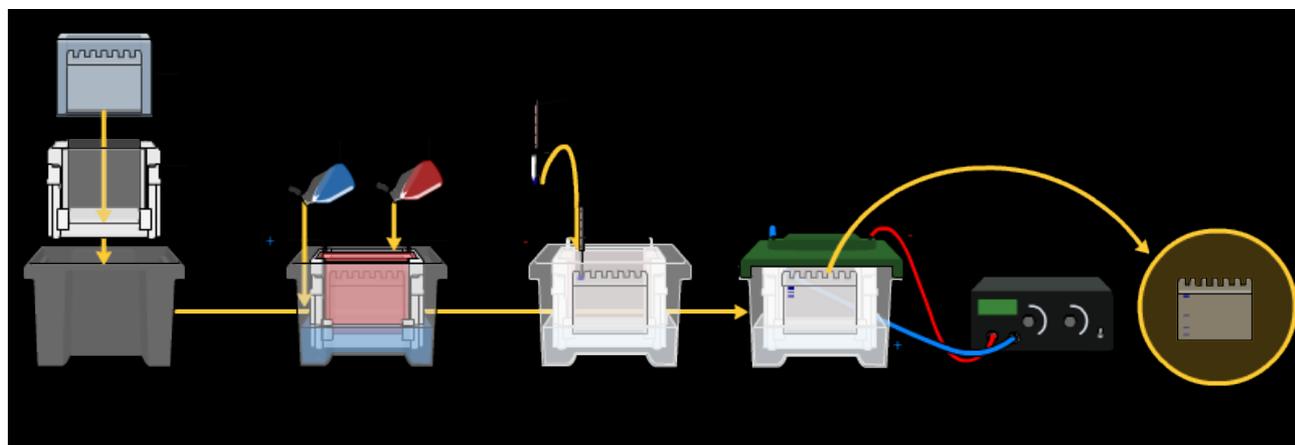
制备凝胶板



取蛋白样品

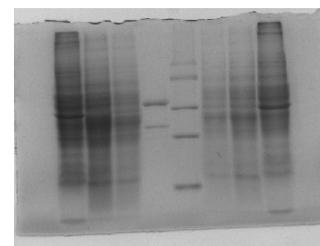
加入样品缓冲液

煮沸



凝胶成像/扫描

结果分析



实验步骤

1. 装板（每组制备一块凝胶板）

将短玻璃片和隔条玻璃片洗干净，重叠放入制胶支架中，夹紧后安装在制胶固定架上，固定好电泳板。注意安装要平衡、紧密，不漏胶。

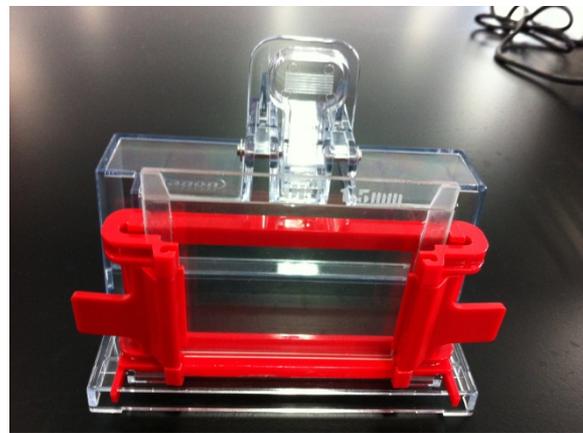
❖ 注意制胶支架的放置方向



❖ 注意防漏

短玻璃片和隔条玻璃片的下沿对齐

确认制胶固定架上有海绵条



2. 配胶

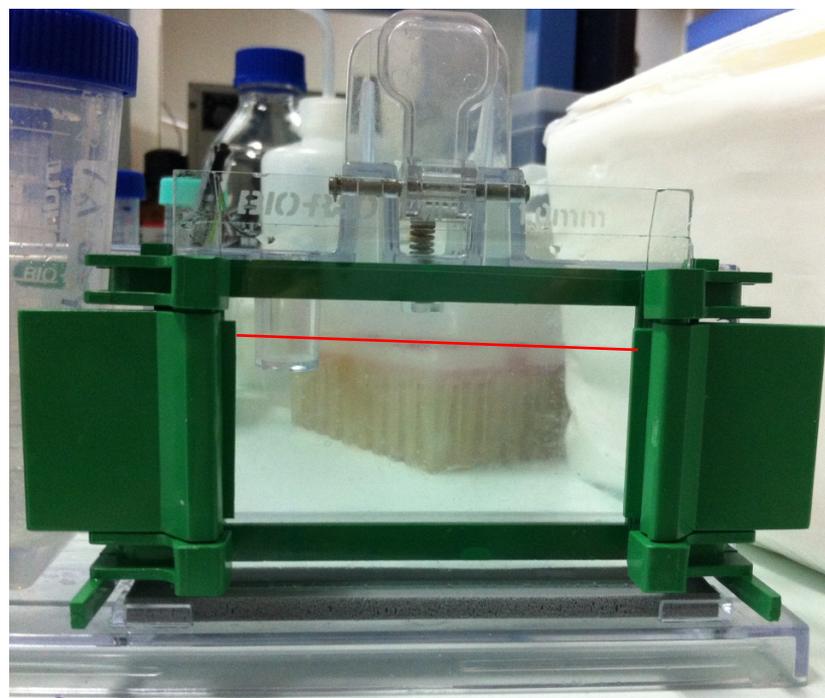
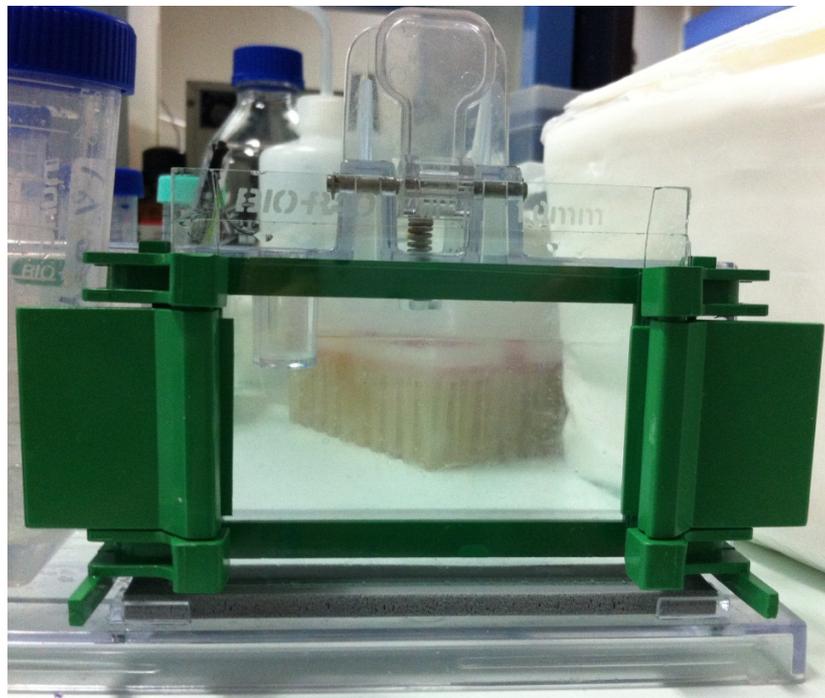
本实验采用不连续体系，分离胶浓度**10%**，浓缩胶浓度为**5%**，具体操作见下表：

试剂名称	配制10 mL 10%分离胶 所需试剂用量 (mL)	配制5 mL 5%浓缩胶 所需试剂用量 (mL)
重蒸水	5.22	3.445
凝胶贮液(30 % Acr - 0.8 %Bis)	3.33	0.83
分离胶缓冲液 (pH 8.9 Tris-HCl)	1.25	—
浓缩胶缓冲液 (pH 6.7 Tris-HCl)	—	0.625
10%SDS	0.1	0.05
10%过硫酸铵	0.15	0.1
10%TEMED	0.05	0.025

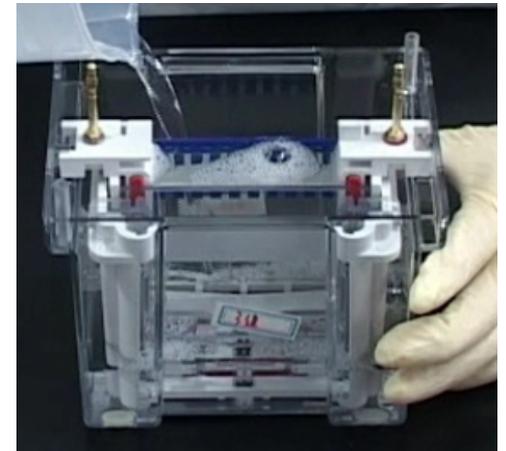
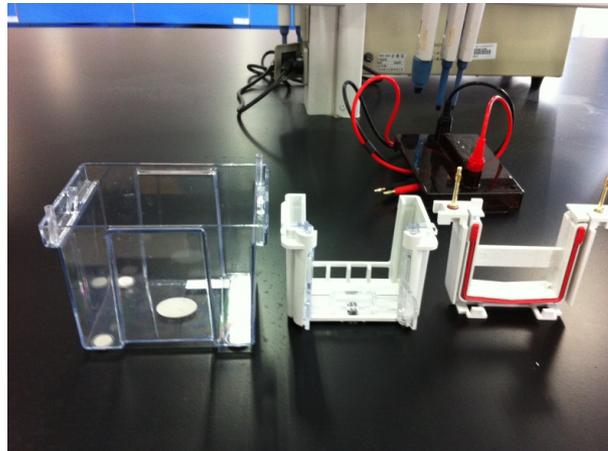
- ❖ **10%过硫酸铵**老师统一加，灌胶前加入
- ❖ **混匀**后才能灌胶，避免凝胶不均匀（烧杯中混匀）

3. 制备凝胶板

- (1) 将**混合均匀**后的分离胶溶液，迅速加至长、短玻璃板间的窄缝内，加胶高度距样品模板梳齿下缘约1 cm。**用1 ml 移液器在凝胶表面沿短玻璃板边缘轻轻加一层水。**用于隔绝空气，使胶面平整。
- (2) 约20min丙烯酰胺完全聚合，则可看到水与凝固的胶面有折射率不同的界线，倒去水，用滤纸条吸去多余的水（玻璃板外）。



- (3) 往浓缩胶溶液中加入10%过硫酸铵，将**混合均匀**后的浓缩胶溶液，迅速加到分离胶上方，加满，**轻轻**插入样品梳子，静置 20 min 左右，等待浓缩胶聚合凝固（烧杯中混匀）。
- (4) 将凝胶板从制胶固定架和制胶支架中取出。安装到电泳槽上，加入电极缓冲液，**内槽加满，外槽加至电极架中间白条处**，小心拔掉梳子，清理点样孔并清除凝胶板底部的气泡，即可上样。



- ❖ **轻插样品梳**，以防未凝固的胶液溅出
- ❖ **样品梳子方向**要分清，正面有字，背面平的，插梳子时背面贴着隔条玻璃板，正面朝外
- ❖ **先加电泳缓冲液**，后上样

4. 蛋白样品的准备

1) 加入上样缓冲液 (2X样品缓冲液 : 蛋白 = 1:1 , 体积比)

样品缓冲液组分 :

SDS : 使蛋白变性 , 带上均一负电荷

β -巯基乙醇 : 还原剂 , 破坏二硫键 , 打破蛋白高级结构

甘油 (蔗糖) : 帮助将样品沉入上样孔内

溴酚蓝电泳指示染料 : (bromophenoblue)

2) 煮沸3min

促进还原剂破坏二硫键 , 促进SDS和蛋白结合

4. 样品处理

- 1) 30 μ l 蛋白样品 + 30 μ l 2*上样缓冲液
- 2) 涡旋仪震荡混匀
- 3) 干式恒温器100度加热3 min

上样顺序：

1. 粗提碱性磷酸酶 (样品1)
 2. 35%硫酸铵上清液 (样品2)
 3. 透析后的粗酶液 (样品3)
 4. 纯化后的碱性磷酸酶 (样品4)
 5. 纯化后的碱性磷酸酶 (样品5)

 6. 商品化碱性磷酸酶
 7. 5 μ l 标准分子量对照 (molecular weight marker) , 彩虹marker
- ❖ 除marker外，其余样品上样量均为20 μ l





25 g 牛筋
匀浆液

加入 50 mL 预先冷却的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 含 0.1 mol/L NaCl), 于高速组织捣碎机匀浆 1 min, 于冰箱 4°C 放置 1 h 左右进行抽提。 (两组一起)

室温或冷冻离心, 4000 r/m 20 min, 收集离心上清液, 并量体积。 (留 3 mL 上清液, 待测酶的比活力。)

缓慢加入研磨细粉的固体硫酸铵至 0.35 饱和度 (100 mL 加入 20.9 g), 不断搅拌溶解, 置冰箱静置 1 h 左右。

冷冻离心, 4500 r/m 20 min, 收集离心上清液, 并量体积。 (留 3 mL 上清液, 待测酶的比活力。)

0.35 饱和硫酸铵上清液

加入固体研磨成细粉的硫酸铵至 0.70 饱和度 (100 mL 加入 23.8 g)。缓慢加入, 不断搅拌溶解, 置冰箱静置 1-2 h。

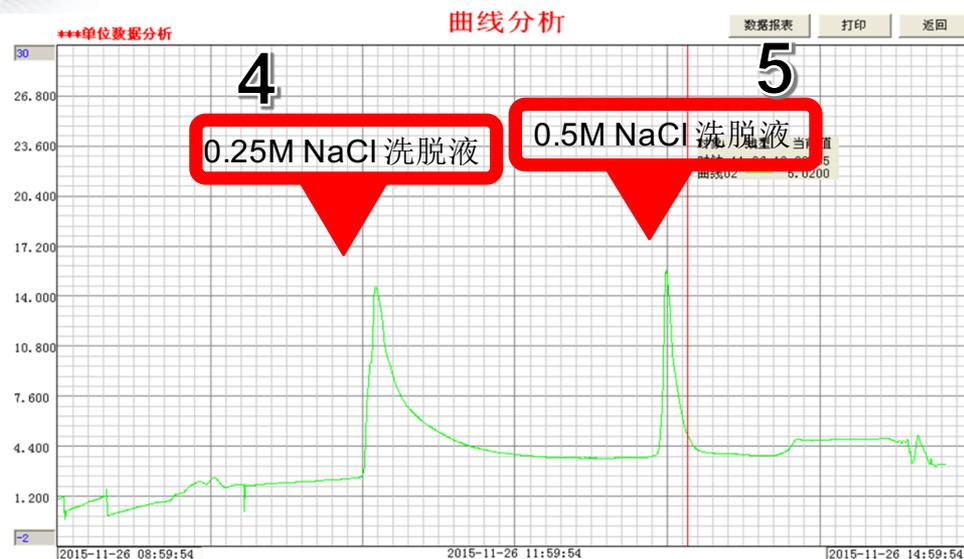
冷冻离心, 4500 r/m 20 min, 收集沉淀物。

溶于 5 mL 含 0.1 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.5。装入透析袋, 对 0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.5 缓冲液透析平衡, 至无 SO_4^{2-} 被检测出为止。冷冻离心, 25000 r/m 30 min, 收集离心上清液, 并量体积。

粗酶液

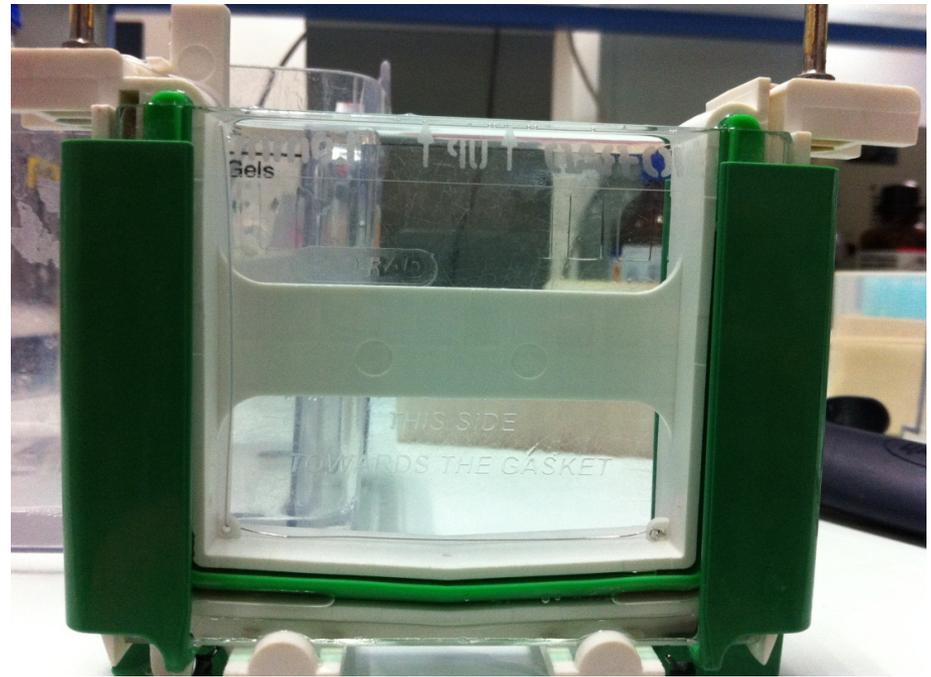
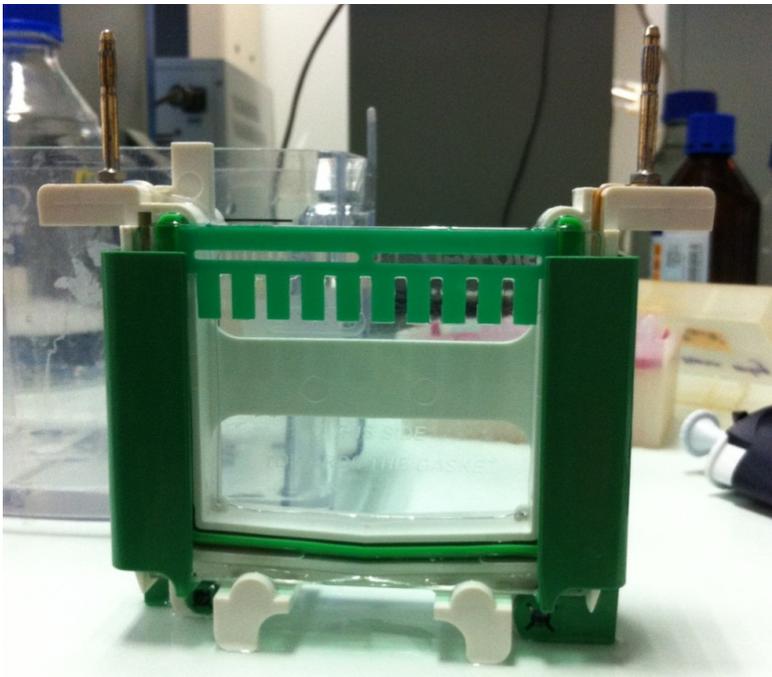
离子交换柱层析
洗脱液
4-5

蛋白样品 1-5



5. 加样（每组一块板）

取20 μ l样品，微量进样器（移液枪），小心地将样品加到凝胶凹形样品槽底部，由于样品溶解液中含有比重较大的蔗糖或甘油，因此样品溶解液会自动沉降在凝胶表形成样品层。待所有凹形样品槽内都加了样品，即可开始电泳。



6. 电泳

盖上槽盖，连接直流稳压电泳仪 (正负极切勿接错)，打开电泳仪开关，开始时将电压调至80 V。待样品进入分离胶后，将电压调至120 V。当溴酚蓝染料迁移至距离硅胶框下缘时，停止电泳，关电源。取下凝胶板，用塑料剥胶铲轻轻将玻璃板撬开移去，在胶板一端切除一角作为标记，将胶板移至大培养皿中染色。

7. 固定和染色

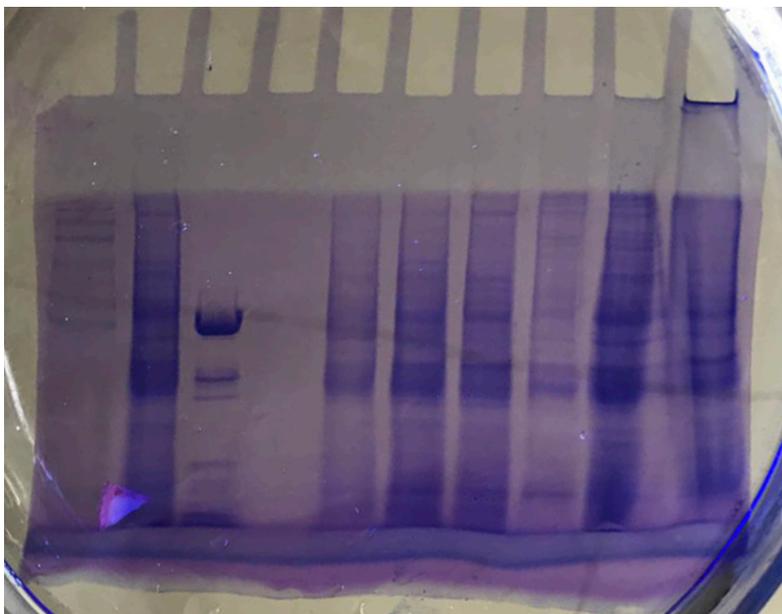
倒入染色液，没过胶块，微波炉略微加热(中火30s)，置脱色摇床染10 min。

8. 脱色

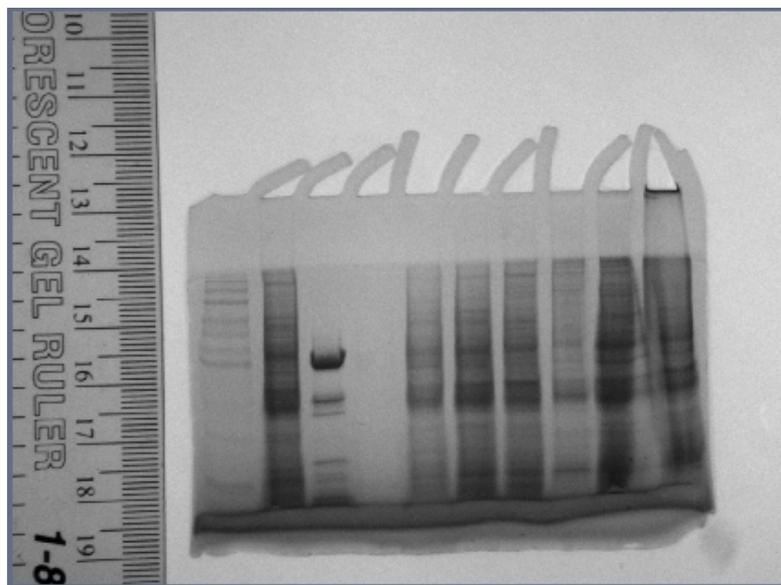
染色液回收，然后自来水漂洗一次，去掉残留的染色液，加入脱色液，没过胶块，置于脱色摇床脱色20min以上，变蓝的脱色液回收至废液桶中，换干净的脱色液，静置于抽屉中继续脱色，直到背景蓝色褪去，蛋白条带可见。

9. 凝胶成像：第二天扫胶(513室的凝胶成像系统)

实验结果

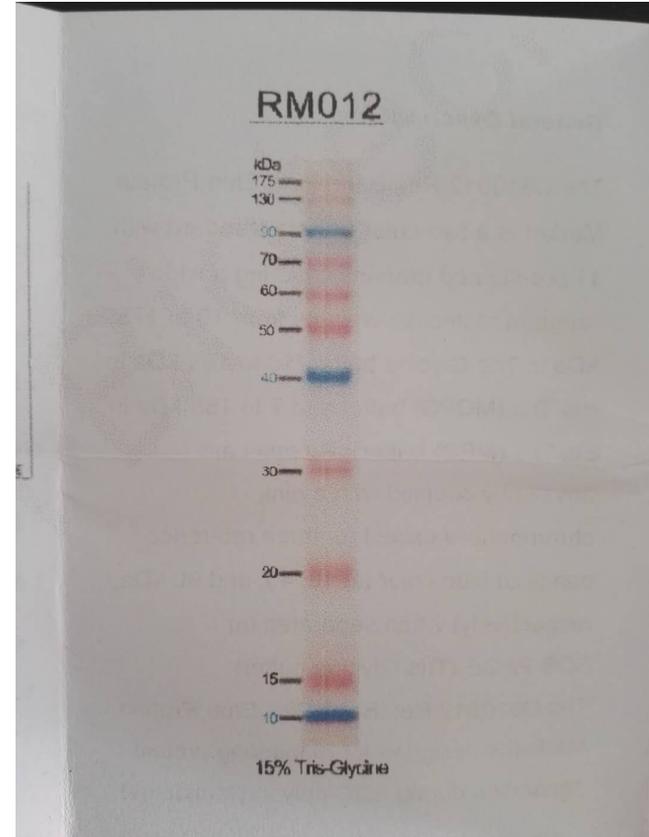
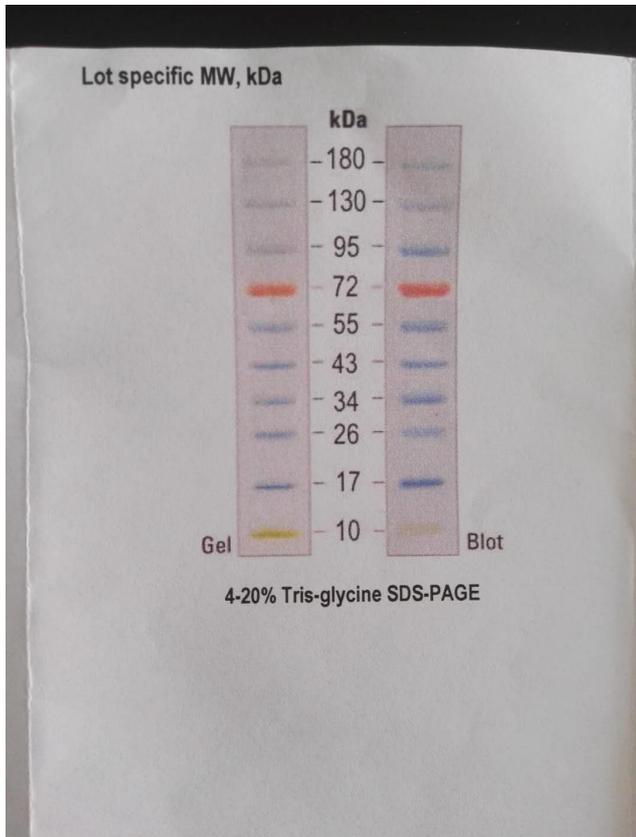


考马斯亮蓝染色结果



凝胶成像

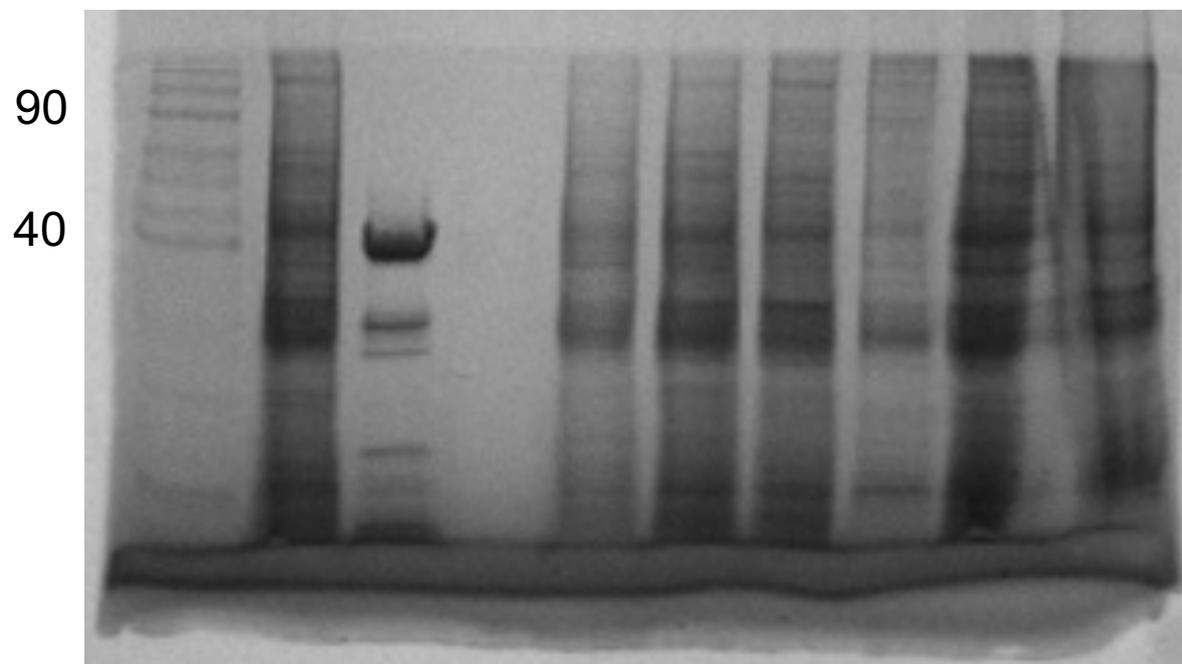
SDS-PAGE测定蛋白质分子量



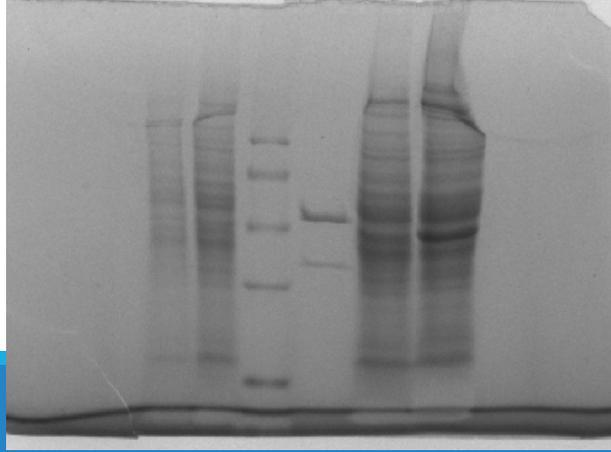
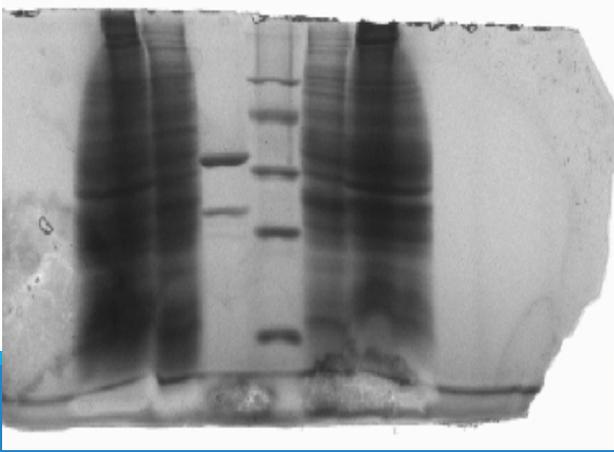
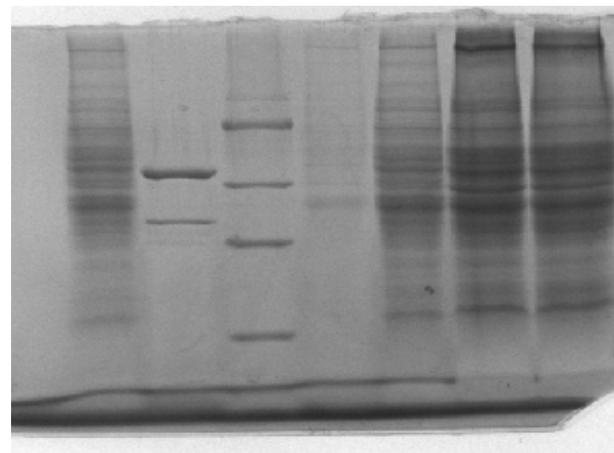
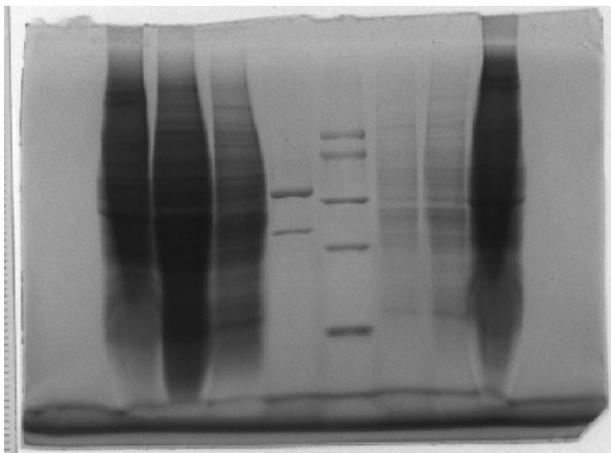
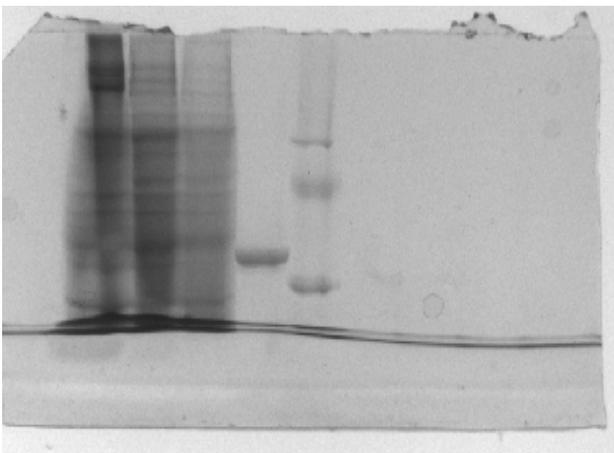
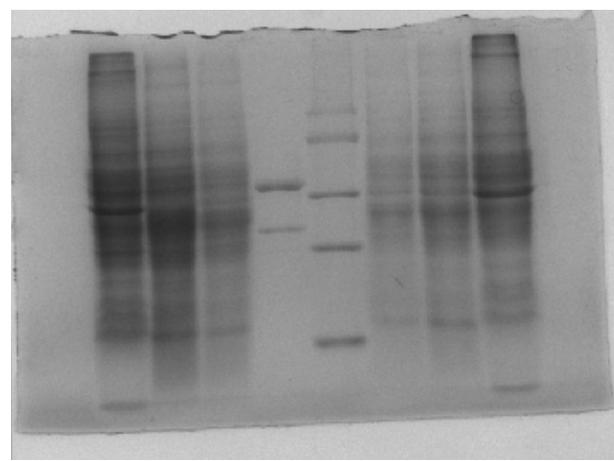
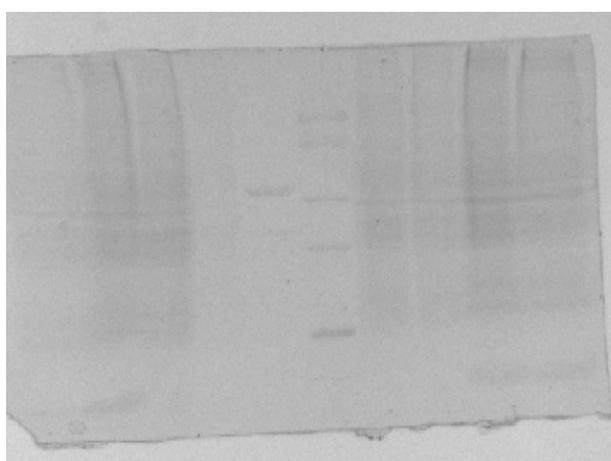
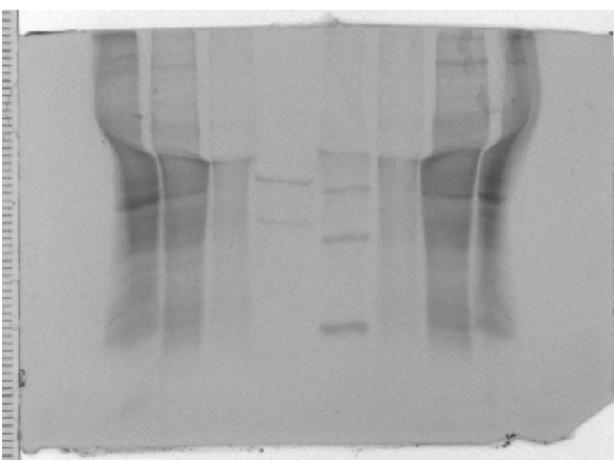
已知分子量的Marker蛋白的电泳图谱

结果处理

kDa 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1. Marker
2. DEAE 含0.25M NaCl缓冲液洗脱峰（16组）
3. 商品酶（大肠杆菌来源）
4. DEAE 含0.5M NaCl缓冲液洗脱峰（16组）
5. DEAE 含0.25M NaCl缓冲液洗脱峰 1
6. DEAE 含0.25M NaCl缓冲液洗脱峰 2
7. DEAE 含0.25M NaCl缓冲液洗脱峰 3
8. DEAE 淋洗峰
9. 粗酶（透析上清）
10. 0.35饱和度硫酸铵上清

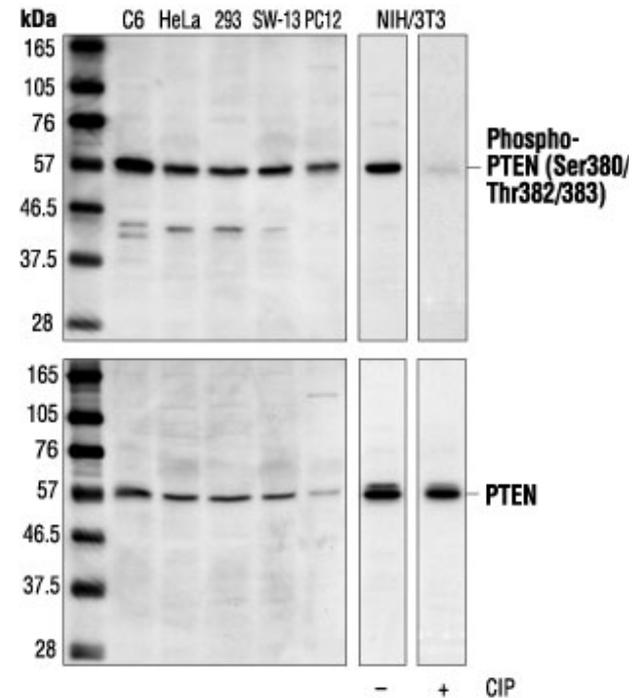
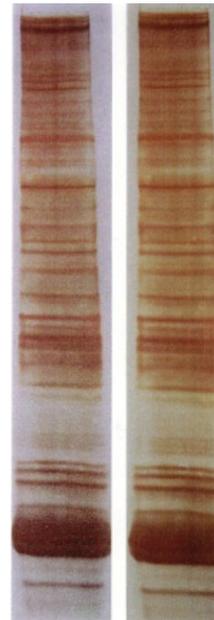
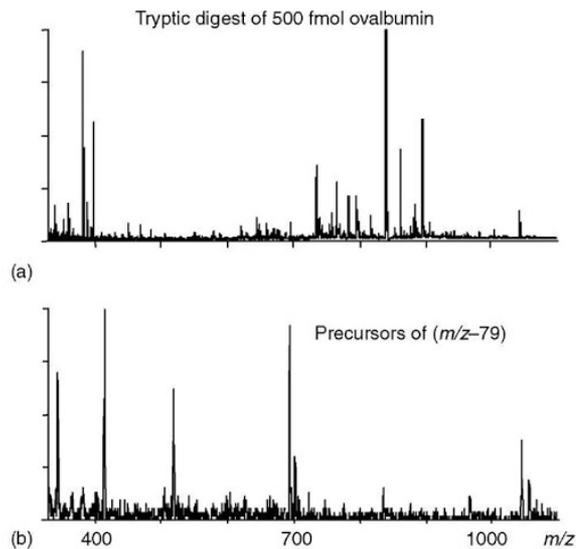
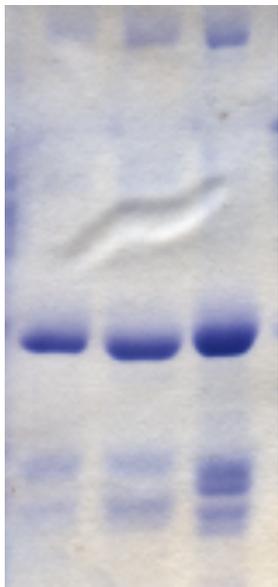


注意事项

- ❖ Ac-bis 凝固前有毒，戴手套小心操作。
- ❖ 装板时，保证密封性，避免漏胶。
- ❖ 取出梳子要两端同时用力，防止胶孔变形。
- ❖ 加样时，注意微量进样器不要碰破胶面。
- ❖ 将电泳板安装到电泳槽上后，要除去凝胶底部的气泡和多余琼脂。
- ❖ 拆板要小心，避免破坏凝胶和玻璃板。
- ❖ 染色液加热要适度。

电泳完毕后的检测

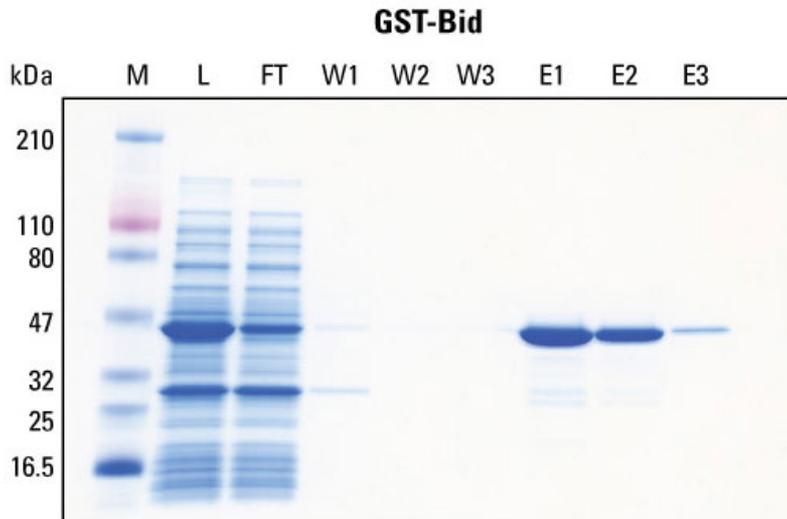
1. 考马斯亮蓝染色 (R250)
2. 银染
3. western blot
4. 质谱分析



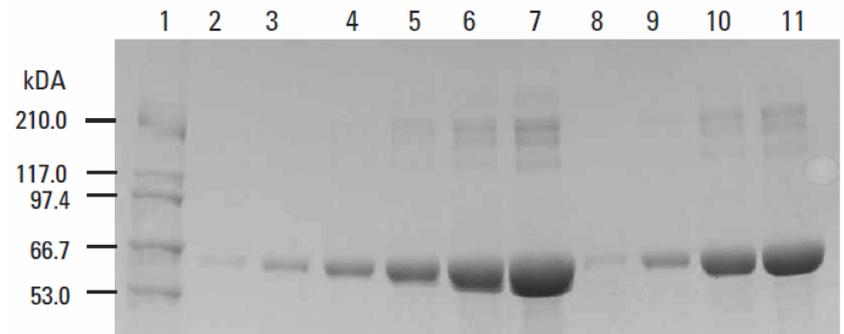
SDS-PAGE的应用

1. 蛋白质纯度分析
2. 蛋白质分子量的测定：根据迁移率大小测定蛋白质亚基的分子量
3. 蛋白质定量分析
4. 蛋白的鉴定
5. 免疫印迹的第一步
6. 蛋白质修饰的鉴定

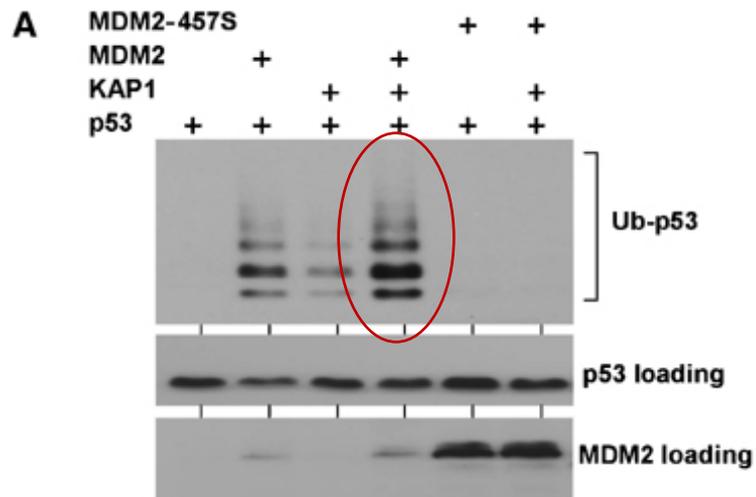
纯度、分子量测定



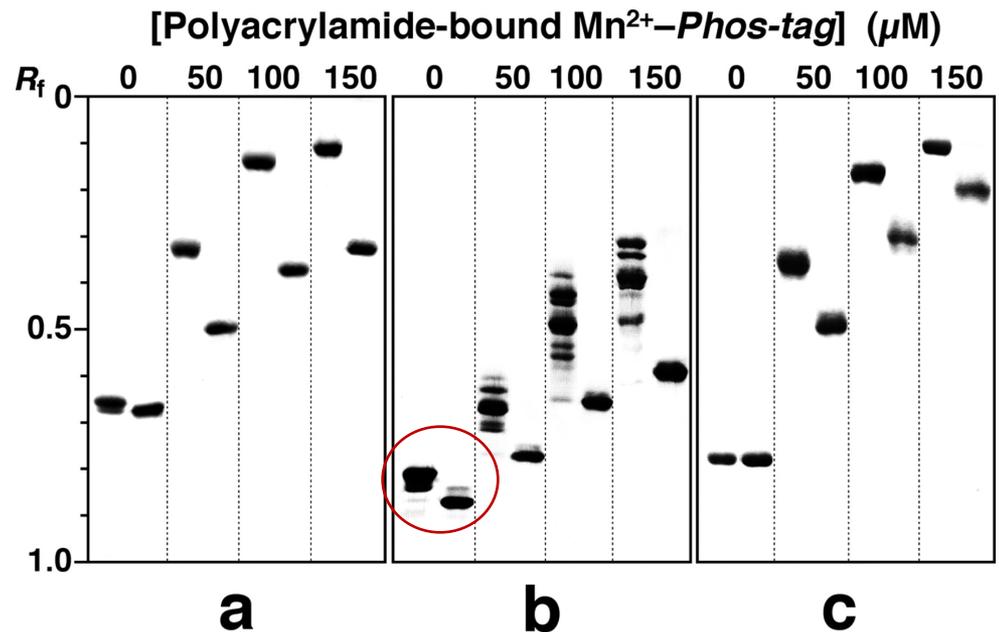
定量分析



PTM: ubiquitination



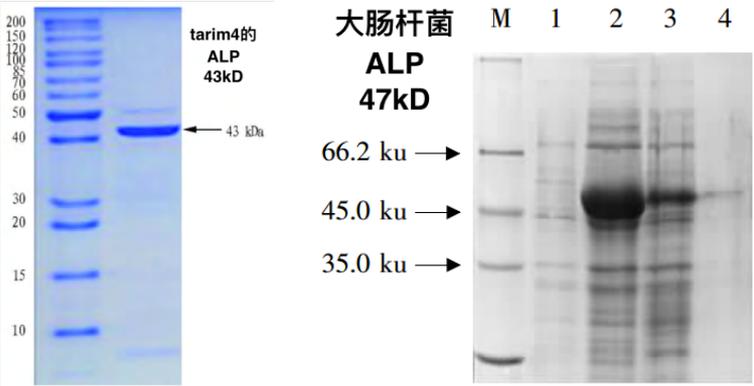
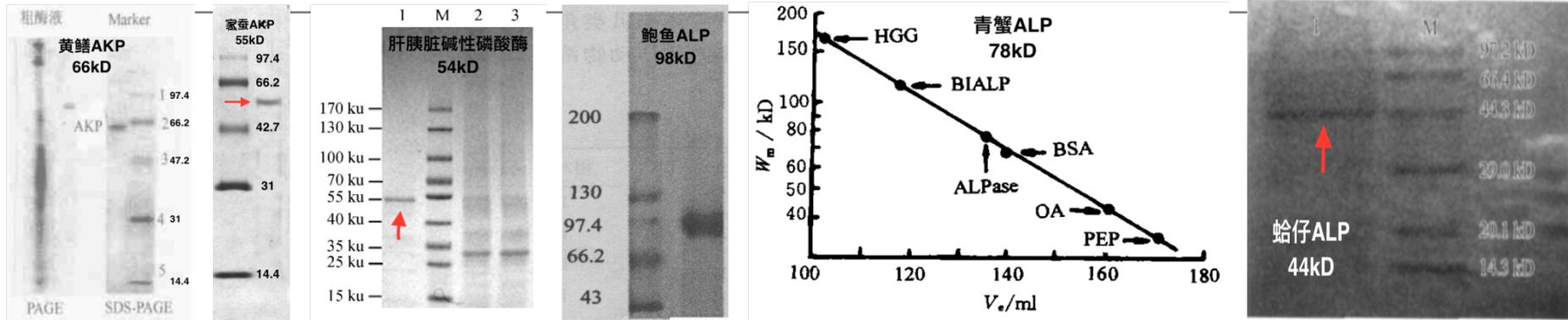
PTM: phosphorylation



思考题

1. 为什么要在样品中加少许溴酚兰和一定浓度的甘油溶液？甘油及溴酚兰的作用分别是什么？
2. 简述SDS-PAGE测定分子量的原理
3. 是否所有的蛋白质用SDS-PAGE方法测到的分子量都完全可靠？
4. 试比较各样品蛋白质谱带的差异，并说明原因。
5. SDS-PAGE结果有不同的蛋白条带，每条条带是否只代表一种蛋白质？
6. 请写出12%的聚丙烯酰胺凝胶的配方。

思考：本学期实验所分离提取的牡蛎碱性磷酸酶的**分子量**



不同物种来源的碱性磷酸酶分子量不同

牡蛎碱性磷酸酶分子量 ???

思考：本学期实验所分离提取的牡蛎碱性磷酸酶的分子量

Items: 1 to 20 of 23 Selected: 19

Showing Current, Replaced and Discontinued Items.

<< First < Prev Page 1 of 2 Next > Last >>

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
LOC105318062 ID: 105318062	alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme-like [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10014131
LOC105330261 ID: 105330261	alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme-like [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10005702
LOC105341299 ID: 105341299	alkaline phosphatase-like [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10006640
LOC105330146 ID: 105330146	alkaline phosphatase-like [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10010132
LOC105330143 ID: 105330143	alkaline phosphatase-like [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10010131
LOC105318064 ID: 105318064	alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme-like [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10014130
LOC105318059 ID: 105318059	alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme-like [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10014128
LOC105333269 ID: 105333269	alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme-like [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10014047
L687_RS27655 ID: 23840616	alkaline phosphatase [<i>Microbacterium maritipicum</i> MF109]		L687_RS27655, L687_13865
M636_15495 ID: 16892582	alkaline phosphatase [<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O1:K33 str. CDC_K4557] ⚠ discontinued	Chromosome I, NC_021848.1 (1559589..1561262, complement)	M636_15495
M636_11100 ID: 16891707	alkaline phosphatase [<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O1:K33 str. CDC_K4557] ⚠ discontinued	Chromosome I, NC_021848.1 (611149..612726, complement)	M636_11100
M636_02115 ID: 16890582	alkaline phosphatase [<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O1:K33 str. CDC_K4557] ⚠ discontinued	Chromosome II, NC_021822.1 (435388..437157, complement)	M636_02115
M636_04750 ID: 16890325	alkaline phosphatase [<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O1:K33 str. CDC_K4557] ⚠ discontinued	Chromosome II, NC_021822.1 (1046809..1048098, complement)	M636_04750
LOC105325681 ID: 105325681	uncharacterized LOC105325681 [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10021145
LOC105343249 ID: 105343249	uncharacterized LOC105343249 [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10017927
LOC105320594 ID: 105320594	uncharacterized LOC105320594 [<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster)]		CGI_10025890

PREDICTED: alkaline phosphatase-like isoform X1 [*Crassostrea gigas*]

NCBI Reference Sequence: XP_011413259.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS XP_011413259 528 aa linear INV 27-FEB-2015

PREDICTED: uncharacterized protein LOC105329788 [*Crassostrea gigas*]

NCBI Reference Sequence: XP_011429507.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS XP_011429507 598 aa linear INV 27-FEB-2015

PREDICTED: uncharacterized protein LOC105329167 [*Crassostrea gigas*]

NCBI Reference Sequence: XP_011428651.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS XP_011428651 458 aa linear INV 27-FEB-2015

PREDICTED: alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme-like isoform X1 [*Crassostrea gigas*]

NCBI Reference Sequence: XP_011430173.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS XP_011430173 514 aa linear INV 27-FEB-2015

PREDICTED: uncharacterized protein LOC105321820 [*Crassostrea gigas*]

NCBI Reference Sequence: XP_011418575.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS XP_011418575 474 aa linear INV 27-FEB-2015

PREDICTED: uncharacterized protein LOC105325681 isoform X2 [*Crassostrea gigas*]

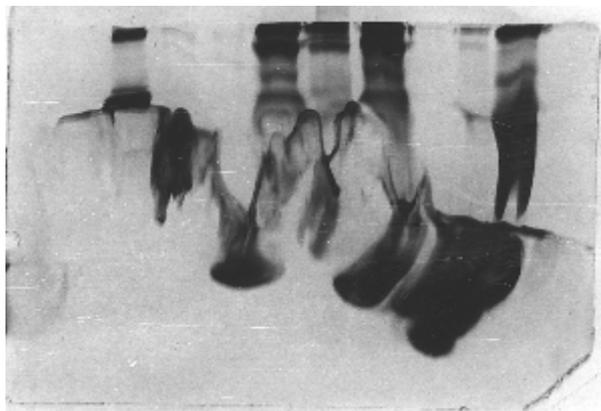
NCBI Reference Sequence: XP_011423646.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS XP_011423646 713 aa linear INV 27-FEB-2015

SDS-PAGE “hall of shame”

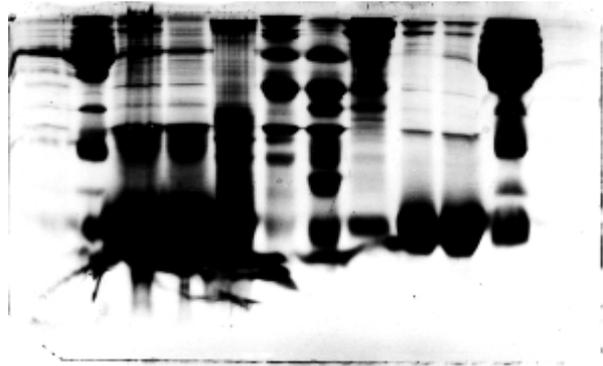


症状1——涂抹痕迹（smears）

涂抹痕迹——例1

涂抹痕迹可能由于多种原因引起，但是最常见的原因是聚丙烯酰胺凝胶倒胶的不均匀或者上样量过大。

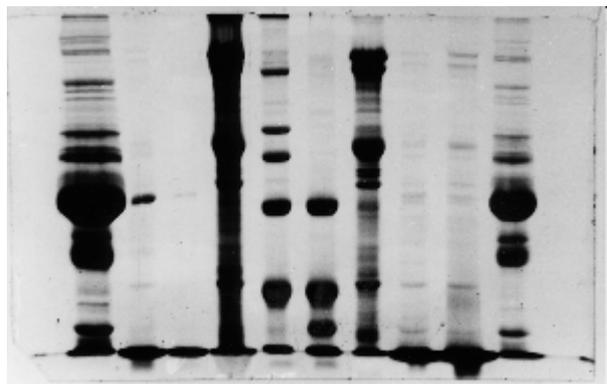
这块胶倒胶不正确，在上部胶倒入制胶槽之前就已经发生聚合。首先倒入的胶聚合发生的太快了。与其重新倒胶，不如停止倒胶重新准备新的聚丙烯酰胺混合液，然后将新的胶倒入旧胶的上方。但是显然这种连接不是非常牢固。（我推荐重新倒胶，制胶很关键，如果你后续还要做blot，胶没有跑好浪费太多了！）



涂抹痕迹——例2

这块胶每孔上样量过大。大多数的泳道还是能分清条带，但是在3、4道涂抹痕迹非常明显。这些泳道的样品主要含有一种蛋白（血红蛋白的亚基），与9、10道一样。但是，3、4道的样品低估了红细胞裂解物和红细胞胞浆组分中的蛋白含量。这些组分包含了过多的蛋白以至于样品需要稀释后才能进行蛋白含量测定。但是这名学生却忘记了这个样品已经稀释过了，因此造成了蛋白浓度的低估。（严重的失误啊！）

小型胶每孔的蛋白样品的量为20-40微克，取决于所需的分辨率和混合液中包含的多肽数目。但是，如果是一个纯化样品上样，一个带包含了20-40微克蛋白，那么其结果肯定也是一团糟！

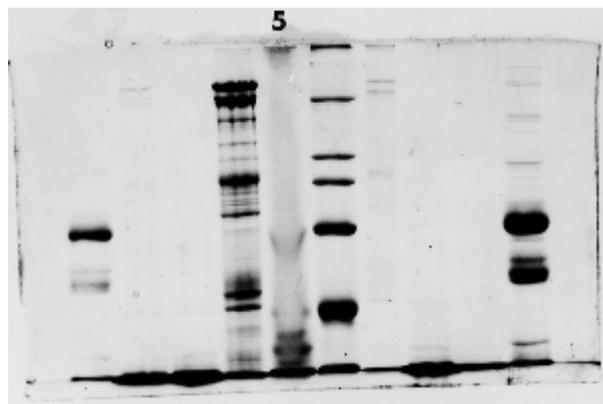


涂抹痕迹——例4

涂抹痕迹可能常见于用非连续胶跑膜相关蛋白这类脂质含量丰富的样品。在非连续PAGE中，样品蛋白基于两个因素而被超浓缩。首先，当样品从非限制性的积层胶移动至限制速度的分离胶时迁移速率陡然下降。其次，也是最重要的，PH变化造成蛋白样品电泳速率的改变，导致样品突然停滞。一个高约半厘米左右的样品被压缩成为一个仅为数微米厚的薄层条带，局部蛋白浓度急剧增加。

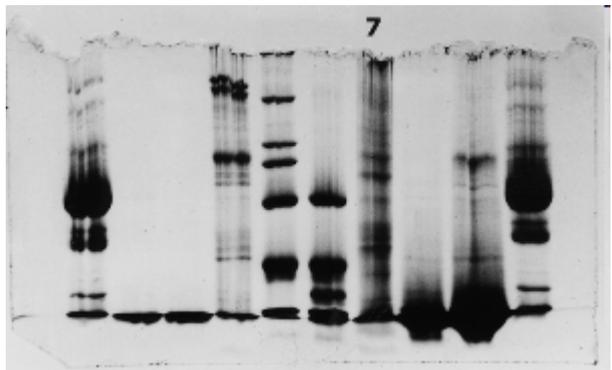
胞膜相关蛋白一般于较低浓度是沉淀，因此泳道的顶部通常有一条神色的条带含有沉淀的蛋白。当电泳进行时沉淀的蛋白重新溶解然后持续进入凝胶，因此造成了一个持续性的较深的不可分辨的背景。许多膜相关蛋白的凝胶图像都显示同样的特征。

上图中4、7道的蛋白样品虽然含有相同的蛋白量，但是第4道的样品中含有的膜蛋白的量超过了凝胶的分辨能力，造成了很深的涂抹痕迹。



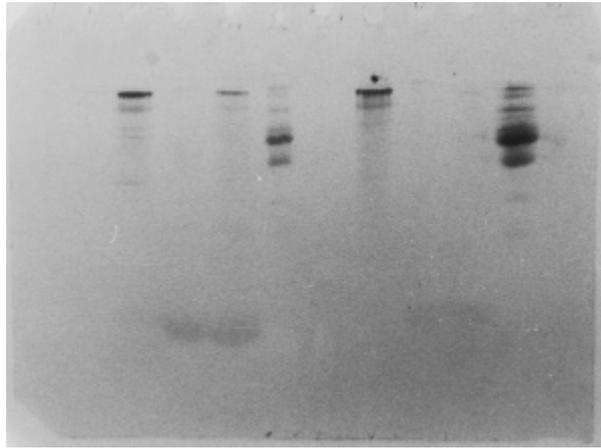
症状2——条纹拖尾
条纹拖尾——例1

这个不是非常严重，有条纹拖尾的泳道（图中左边第5道）也是可以用的。条纹的出现是由于一部分膜组分中的高浓度蛋白在跑积层胶过程中析出然后在很短的时间里又回到溶液中。由于分离胶表面存在轻度的缺陷（可能是在倒积层胶之前分离胶干了一些），造成整个泳道的蛋白浓度的不一致，使得出现这种条纹拖尾症状，而不是一致的很深的背景。



条纹拖尾——例3

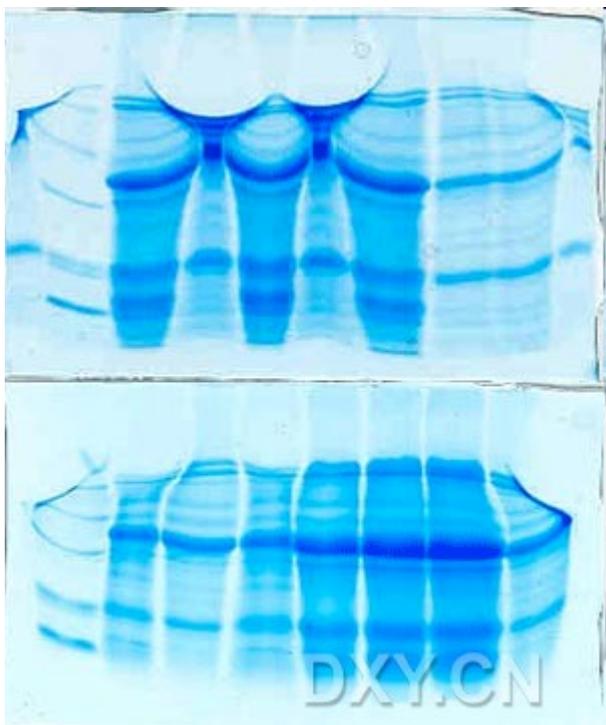
这块胶就非常难看了。原因在于分离胶倒完之后没有用水或者异丙醇压胶，导致分离胶上缘非常粗糙，就像你看到的一样。当样品堆积在凹凸不平的分界线时，位于凹陷部位的蛋白由于不能适当的浓缩就析出来了。然后再跑胶过程中逐渐溶解造成了条纹拖尾症状。



条带过浅——例4

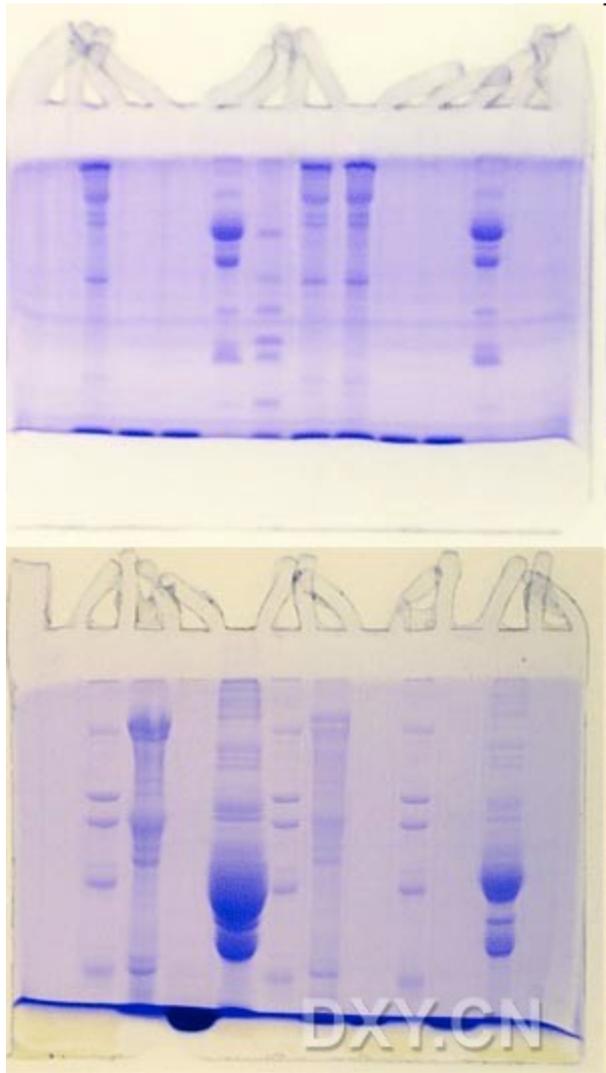
这是你可能遇到的问题中比较让人沮丧的。我们可以说你是非常仔细的，把每件事都做得倾向于完美，跑胶直到溴酚蓝前沿非常平直的落在胶的最底部。你用去离子水冲洗凝胶，然后将其置于摇床震荡。在这天稍晚些时候你发现你忘了将凝胶放到染色缸里面。第二天染色结果就是上面的样子了。

注意分子量较小的蛋白从胶上弥散较快，而较大分子量的蛋白弥散很慢而能被染色。染色和脱色液中的酸化甲醇是非常必要的，它可以固定蛋白阻止其从聚丙烯酰胺基质上弥散。



这两块胶由E. Morales Rayas提供。一种可能的解释是可能这两次跑胶时在加样与实际跑胶之间间隔时间太长。第一块胶中间的几个泳道出现了增宽和压缩交替的形式，而第二块胶的条带则向凝胶边缘扩散。

当蛋白样品加入上样孔后即开始弥散到积层胶，同时向垂直和两侧发生（在没有电场的情况下蛋白弥散的方向是随机的，因此上样后必须尽快开始电泳）。较小分子量的蛋白弥散速度快于大分子量的蛋白。如果蛋白横向扩散就会影响邻近泳道的电场，特别是邻近的泳道蛋白含量更高时。但是如果所有的样品组成相似并序贯上样，弥散造成的影响就不是这么重要。但是仍然会造成条带的失真。



显然在实验室中用塑料瓶大量储存Tris-甘氨酸电极缓冲工作液并不是好主意。我们看不见缓冲液中的霉菌，但是它确实存在其中。注意脱色后这块胶的指示剂下方都呈透明的颜色，而胶的背景却仍然呈蓝色，说明霉菌蛋白在整个电泳过程中已经渗透到凝胶之中。