

## 實驗二十一 蛋白質電泳膠片製作(For SDS-PAGE)

### 實驗目的

如何製作 SDS-PAGE 的膠片

### 實驗原理

一般來說，膠體蛋白質電泳可簡單分為兩類：Native-Page 和 SDS-Page，這兩者的差異性在於 SDS。因為 SDS 為一種界面活性劑，可以使蛋白質變性，除此之外還可以將蛋白質表面均勻地變成帶負電荷。然而表面的均勻負電荷會改變「泳動率」(泳動率=外加電壓 x 分子靜電荷密度÷分子與介質間的摩擦力)，故原本會影響蛋白質分子的泳動率就只剩下分子量，所以可以利用 SDS-Page 大略估計變性後蛋白質的分子量。然而%的選擇也極為重要，因為不同%的膠體，對於 SDS-Page 中的蛋白質溶液會有不同的分離效果，如果選擇錯誤極有可能出現沒有 BAND 或是蛋白質完全不能通過膠體的情況出現。

### 實驗步驟

#### A.儀器用具

SE260 的製膠系統(包含玻璃片 x2、鋁片 x2、spacer x4、comb x2 和 gel caster)  
錐型瓶

#### B.藥品試劑

ddH<sub>2</sub>O  
1.5M Tris(pH 8.8)  
0.5M Tris(pH 6.8)  
30% Acryl/Bis  
10% SDS  
100% TEMED  
10% APS  
95% EtOH

**C.方法步驟**

1. 先將玻璃片.鋁片.spacer和 comb 用 95%或 100%的 EtOH 清洗乾淨,接用無塵紙擦拭乾淨
2. 將製膠台架設完畢,然而滴入 ddH<sub>2</sub>O 確認膠台是否有架設緊密(以不漏水為準則)
3. 製作 12% Separating gel(見附錄一)
4. 將 12% Separating gel 注入膠台內,約注入 7~8 分滿
5. 取 300  $\mu$ l 的 95% EtOH(或 100%)滴入膠台內,做壓膠動作
6. 蓋上保鮮膜後等待 30~45 分鐘
7. 用 ddH<sub>2</sub>O 清洗膠台,確認 EtOH 被洗淨後
8. 將膠台內的 ddH<sub>2</sub>O 擦乾
9. 製作 4% stacking gel(見附錄一)
10. 將 4% stacking gel 注入膠台內
11. 等待 15~20 分鐘
12. 將 comb 輕輕的拔除後,H<sub>2</sub>O 清洗膠片
13. 把膠片連同鋁片和玻璃片一起保存在通滿 ddH<sub>2</sub>O 的環境中

**問題與討論**

1. 為何玻璃、鋁片、Spacer 和 Comb 要用 95%EtOH 清洗？
2. 如果在注入膠體時產生氣泡要如何解決？氣泡對於往後實驗有何影響？
3. 為何 Separating gel 要注入八分滿，那如果交換腳色換 Stacking gel 有何影響？

**參考資料**

見下頁

Separating gel (45min)		0.75mm x 2 gels			
Final conc.	Stock conc.	7.5%	10%	12%	15%
ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	7.28ml (3.64x2)	6.03ml (3.02x2)	5.03ml (2.52x2)	3.53ml
%Acryl/Bis	30%Acryl/Bis (30%T,2.6%C)	3.75ml	5.00ml	6.00ml (3.00x2)	7.50ml (3.75x2)
0.375M Tris(pH8.8)	1.5M Tris(pH8.8)	3.75ml	3.75ml	3.75ml	3.75ml
0.1%SDS	10%SDS	150μl	150μl	150μl	150μl
<b>0.05%TEMED</b>	<b>100%TEMED</b>	<b>7.5μl</b>			
<b>0.05%APS</b>	<b>10%APS</b>	<b>75μl</b>			
Volume		15.0ml			

Stacking gel (15min)		0.75mm x 2gels
Final conc.	Stock conc	4%
ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	2.98ml
%Acryl/Bis	30%Acryl/Bis	0.67ml
0.125M Tris(pH6.8)	0.5M Tris(pH6.8)	1.25ml
0.1%SDS	10%SDS	50μl
<b>0.1%TEMED</b>	<b>100%TEMED</b>	<b>5μl</b>
<b>0.1%APS</b>	<b>10%APS</b>	<b>50μl</b>
Volume		5ml