



IPG 胶条 使用说明

版本：20140508

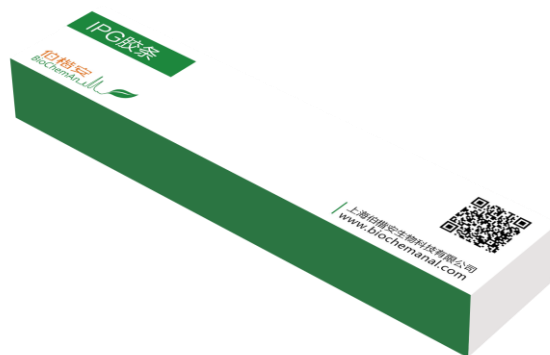
上海伯楷安生物科技有限公司
Shanghai BioChemAn Biotechnology Co.,Ltd.

一、产品介绍

本公司隆重推出各种类型高速高分辨 IPG 预制胶条，主要用于经典二维蛋白质电泳。

主要特点：

- 聚焦时间缩短：高速 IPG 预制胶条比同类产品聚焦时间缩短 1/3。
- 全面兼容：可以与众多公司的电泳装置联用。
- 重复可靠：精确的灌注程序保证不同批次的 pH 梯度的重现性。
- 重现性好：每盒包装含 12 根胶条，均来自同一批产品。
- 规格齐全：胶条品种多，规格全，基本覆盖了实验中常用的 pH 范围和长度范围。
- 保质期长：-20℃ 保存 12 个月。



(图 1)



(图 2)

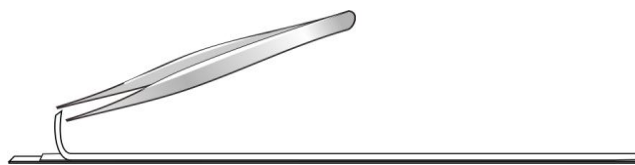
二、使用说明

操作步骤

第一向，等电聚焦水化上样

1. 本操作步骤采取被动水化方式或主动方式加样。
2. 从冰箱中取-20℃冷冻保存的合适的水化上样缓冲液（不含DTT，不含载体两性电解质）一管（1 ml/管），置室温溶解。
3. 从冰箱取出 -20℃ 冷冻保存的 IPG 预制胶条，于室温放置 10 分钟。在小管中加入 0.01 g DTT，与胶条对应PH值范围的40%两性电解质，充分混匀。按照水化上样缓冲液:蛋白质样品 = 4:1（体积比）配制上样液并充分混匀。
4. 沿着聚焦盘或水化盘中槽的边缘至左而右线性加入样品。注意：在槽两端各 1 cm 左右不要加样，样品分布一定要均匀连贯，不要产生气泡。否则会影响到胶条中蛋白质的分布。

5. 用镊子轻轻去除 IPG 胶条上的保护层（图3）。



（图3）

6. 分清正负极，轻轻将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘或水化盘中样品溶液上，使得胶条的标记端对应于聚焦盘的正极，确保胶条与电极紧密接触。注意：不要使样品溶液弄到胶条背面的塑料支撑膜上，这样的溶液不会被胶条吸收；不使胶条下面的溶液产生气泡。如果已经产生气泡，用镊子轻轻地提起胶条的一端，上下移动胶条，直到气泡被赶出胶条以外。
7. 作为防止缓冲液蒸发的预防措施，矿物油必须缓缓地加在每个槽内，确保完全的覆盖住每一根胶条。

等电聚焦程序设置

1. 7 cm胶条：

S1 250 V	线性	30分钟
S2 500 V	快速	30分钟
S3 4000 V	线性	3小时
S4 4000 V	快速	20000 Volt Hr
S5 500 V	快速	任意时间
2. 11 cm胶条：

S1 250 V	线性	30分钟
S2 500 V	快速	30分钟
S3 8000 V	线性	4小时
S4 8000 V	快速	40000 Volt Hr
S5 500 V	快速	任意时间
3. 13 cm胶条：

S1 250 V	线性	30分钟
S2 500 V	快速	30分钟
S3 8500 V	线性	4小时
S4 8500 V	快速	40000 Volt Hr
S5 500 V	快速	任意时间
4. 17 cm胶条：

S1 250 V	线性	30分钟
S2 1000 V	快速	60分钟
S3 10000 V	线性	5小时
S4 10000 V	快速	60000 Volt Hr
S5 500 V	快速	任意时间
5. 18 cm胶条：

S1 250 V	线性	30分钟
S2 1000 V	快速	60分钟

- S3 10000 V 线性 5小时
 S4 10000 V 快速 60000 Volt Hr
 S5 500 V 快速 任意时间
6. 24 cm胶条:
- S1 250 V 线性 30分钟
 S2 1000 V 快速 2小时
 S3 10000 V 线性 5小时
 S4 10000 V 快速 80000 Volt Hr
 S5 500 V 快速 任意时间

选择所放置的胶条数。

设置每根胶条的极限电流（50 μ A/根）。

设置等电聚焦时的温度（17 $^{\circ}$ C）。

聚焦结束的胶条，立即进行平衡和第二向 SDS-PAGE 电泳，否则应将胶条置于样品水化盘中，-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。

三、注意事项

1. 配制好的尿素储液必须马上使用，或用 mixed-bed 离子交换树脂，清除长时间放置时尿素溶液中形成的氰酸盐，预防蛋白质的甲酰化。
2. 将水化上样缓冲液分装后再储存于-20 $^{\circ}$ C。使用时，只需解冻需要量，其余继续储存。水化上样缓冲液一旦解冻后则不能再冷冻。
3. 将水化上样缓冲液加入蛋白样品中，最终溶液中尿素的浓度需 ≥ 6.5 M。
4. 下表显示的是通常推荐使用的双向电泳第一向蛋白上样量。因为样品和样品之间存在差异，所以这种上样量仅提供参考。

IPG胶条长度	分析型的上样量 (银或SYPRO Ruby染色)	制备型的上样量 (考马斯亮蓝染色)
7 cm	10-100 μ g蛋白	200-500 μ g蛋白
11 cm	50-200 μ g蛋白	250-1000 μ g蛋白
13 cm	60-210 μ g蛋白	260-1200 μ g蛋白
17 cm	100-300 μ g蛋白	1-3 mg蛋白
18 cm	100-300 μ g蛋白	1-3 mg蛋白
24 cm	120-350 μ g蛋白	1.2-3.5 mg蛋白

5. 戴上手套用镊子去除 IPG 胶条上的保护层。将IEF胶条仔细的置于溶胀缓冲液上，胶面朝下，确保整个胶面都能被浸湿。
6. 样品溶液的上样体积见下表。这样就可以使胶条溶胀至它们原来的厚度（0.5 mm）。胶条最少需要经过 10 小时以上的溶胀。即使看上去所有的缓冲液都已经被吸收，也一定要确保胶条在槽中溶胀充分的时间。只有在IPG凝胶的孔径已经溶胀充分后，才可以吸收大分子量蛋白质，否则大分子量蛋白质无法进入胶条。

IPG胶条长度	上样体积
7 cm	125-250 μ l
11 cm	185-370 μ l
13 cm	200-400 μ l

17 cm	300-600 μ l
18 cm	320-620 μ l
24 cm	420-800 μ l

- 如果在IEF过程中，聚焦盘中还有很多的溶液没有被吸收，留在胶条的外面，这样就会在胶条的表面形成并联的电流通路，而在这层溶液中蛋白质不会被聚焦。这就会导致蛋白的丢失或是图像拖尾。为了减少形成并联电流通路的可能性，可以先将胶条在溶胀盒中进行溶胀，在转移过程中要用湿润的滤纸仔细地胶条上吸干多余的液体，然后再将溶胀好的胶条转移到聚焦盘中。
- 在样品溶液中加入痕量的溴酚蓝对观察溶胀过程很有帮助。在覆盖矿物油之前，可以让胶条先吸收30 min的液体。IPG 胶条上一定要覆盖矿物油，否则缓冲液会蒸发，使得溶液浓缩，导致尿素沉淀。作为防止缓冲液蒸发的预防措施，矿物油必须缓缓地加在每个槽内，确保完全的覆盖住每一根胶条。
- 下面的表格给出了建议使用的IPG胶条运行的总volt-hours。不同样品需要的volt-hours不同,下表仅提供参考。当聚焦过程无法达到最高电压时，只要最后能达到总的volt-hours，且7 cm胶条电压不低于3000伏，11 cm胶条电压不低于5000伏，17 cm胶条电压不低于7000伏，也能对样品进行充分的聚焦，24 cm胶条电压不低于8500伏，也能对样品进行充分的聚焦。

IPG胶条长度	最高电压	建议的Volt-Hours
7 cm	8,000 V	8,000-20,000V-hr
11 cm	8,000 V	20,000-40,000V-hr
13 cm	10,000 V	20,000-40,000V-hr
17 cm	10,000 V	30,000-60,000V-hr
18 cm	10,000 V	30,000-60,000V-hr
24 cm	10,000 V	60,000-80,000V-hr

- 处理 IPG 胶条时，一定要始终带着手套、口罩和帽子，预防角蛋白和唾液蛋白污染。
- 水化上样缓冲液的成分由不同的样品决定，配方见“（附录）IPG水化缓冲液配方”。
- 所有包含尿素的溶液加热温度不得超过 30 $^{\circ}$ C，否则会发生蛋白氨甲酰化。引起蛋白质pI值的偏移。
- 主动水化过程，会帮助大分子量的蛋白质进入胶条，但会丢失部分小分子量蛋白。
- 当样品中含盐量较高时，建议先做脱盐处理，避免IEF聚焦电泳失败，减少不必要的浪费。当样品中含盐量很少时，可以选用快速升压，并做限流处理（30-50 μ A）。
- 虽然仪器中每根胶条的极限电流可以设为 99 μ A/根。但一般 IPG 胶条的运行电流不超过 50 μ A/根。
- 如需要添加盐桥，可以在聚焦盘或水化盘的两端电极处搭上盐桥，这可以帮助除盐。但需注意的是，盐桥必须是湿润的但水不能太多，必要时需用滤纸吸去多余的水分。保持盐桥与电极的紧密接触。
- 如需要主动水化脱盐，程序设置中的除盐步骤，可根据具体情况进行设置，如果样品中含盐量较高可设置多步除盐，并加长除盐时间。但这种方法只能除去很少量的盐离子，所以最好是在上样前，对样品进行除盐处理。

四、附录

IPG水化缓冲液配方

水化上样缓冲液 (I)

尿素	8 M	4.805 g
CHAPS	4%	0.4 g
DTT	65 mM	0.098 g (现加)
载体两性电解质	0.2%(w/v)	50 μ l (40%) (现加)
溴酚蓝	0.001%	10 μ l (1% 溴酚蓝, 选加)
超纯水		定容至 10 ml

分装成 10 小管, 每小管 1 ml, -20°C 冰箱保存。

水化上样缓冲液 (II)

尿素	7 M	4.2 g
硫脲	2 M	1.52 g
CHAPS	4%	0.4 g
DTT	65 mM	0.098 g (现加)
载体两性电解质	0.2%(w/v)	50 μ l (40%) (现加)
溴酚蓝	0.001%	10 μ l (1% 溴酚蓝, 选加)
超纯水		定容至 10 ml

分装成 10 小管, 每小管 1 ml, -20°C 冰箱保存。

水化上样缓冲液 (III)

尿素	5 M	3.0 g
硫脲	2 M	1.52 g
CHAPS	2%	0.2 g
SB 3-10	2%	0.2 g
DTT	65 mM	0.098 g (现加)
载体两性电解质	0.2%(w/v)	50 μ l (40%) (现加)
溴酚蓝	0.001%	10 μ l (1% 溴酚蓝, 选加)
超纯水		定容至 10 ml

分装成 10 小管, 每小管 1 ml, -20°C 冰箱保存。

上海伯楷安生物科技有限公司

地址：上海市闵行区金都路 4299 号 4 号楼

邮编：201108

网址：www.biochemanal.com

Email:sales@biochemanal.com

全国统一客服电话：400 920 0190