

SDS-PAGE 电泳的常见问题解析 (FAQ)

1. 关于凝胶的一些问题

1. 胶的凝结不好，例如有花纹特别是浓度高的胶在冬天温度较低的情况下，在分离胶的下部有波浪样的花纹，凝胶不均匀。解决方法：加大 TEMED 和过硫酸胺的量，使其凝结速度加快。同时洗干净玻璃板，防止有残留的胶干结在玻璃板上。
2. 胶不凝，解决方法：温度较低时加大 TEMED 和过硫酸胺的量，过硫酸胺必须新鲜配制。如若还是不行重新配制一下缓冲溶液。
3. 胶易碎，例如浓度较高的胶在染色和脱色过程以及扫描过程中破裂。解决方法：首先在上述过程中一定要动作轻缓，其次在室温较高的情况下可以适当减少 TEMED 和过硫酸胺的量。
4. 电泳完后胶上有很多长条纹的杂带，解决方法：建议电泳缓冲液不要回收利用。配制胶的溶液一定要纯。

2. 凝胶时间不对

通常胶在 30 分钟到 1 小时内凝。如果凝的太慢，可能是 TEMED，AP 剂量不够。如果凝的太快，可能是 AP 和 TEMED 用量过多，此时胶太硬易裂，电泳时易烧胶。

3. 浓缩胶与分离胶断裂、板间有气泡对电泳的影响

前者主要原因是拔梳子用力不均匀或过猛所致；后者是由于在解除制胶的夹子后，板未压紧而致空气进入引起的，一般对电泳结果不会有太大的影响。

4. 样品的处理

根据样品分离目的不同，主要有三种处理方法：还原 SDS 处理、非还原 SDS 处理、带有烷基化作用的还原 SDS 处理。

1. 还原 SDS 处理：在上样 buffer 中加入 SDS 和 DTT (或 Beta 巯基乙醇) 后，形成 SDS 与蛋白相结合的分

子。

2. 带有烷基化作用的还原 SDS 处理：碘乙酰胺的烷基化作用可以很好的保护 SH 基团，得到较窄的谱带；另碘乙酰胺可捕集过量的 DTT，而防止纹理现象的产生。100uL 样品缓冲液中加入 10uL20%的碘乙酰胺，并在 25°C下保藏 30min。
3. 非还原 SDS 处理：生理体液、血清、尿素等样品，一般只用 1%SDS 沸水中煮 3min，未加还原剂，因而蛋白折叠未被破坏，不可作为测定分子量来使用。

5. 条带两边翘起中间凹下的原因 (∩)

在较厚的凝胶中，由于凝胶不均匀冷却，中间部分凝固不好。

电泳系统温度偏高。

处理办法：待其充分凝固再作后续实验。

6. 条带两边向下中间鼓起的原因 (∪)

一般原因是两板之间的底部间隙气泡未排除干净，或聚合不完全。

处理办法：可在两板间加入适量缓冲液，以排除气泡。

7. 条带偏斜

原因：电极不平衡或者加样位置偏斜。

8. 条带两边扩散

原因：加样量过多。

9. 电泳的条带过粗

电泳中条带很粗是常见的事，主要是浓缩胶的原因。

处理办法：适当增加浓缩胶的长度；保证浓缩胶贮液的 pH 正确；适当降低电压。

10. 目的蛋白质条带模糊

1. 电泳凝胶浓度选择不当。
2. 低于 10Kd 的小分子蛋白质要用 Tricine 胶。

3. 靠近前沿的电泳带分辨率不佳。根据分子量与凝胶孔径的关系，选择适当浓度的凝胶。
4. 蛋白质样品水解。注意除去蛋白质样品的内源性的水解酶，不要反复冻融。
5. 电泳时间过长或过短。溴酚蓝达到分离胶的底部即应该关闭电泳电源。
6. 缓冲溶液、SDS 都要新鲜配制。
7. 避免加样过多，提高分辨率。小体积样品可给出窄带，加样体积根据样品浓度和凝胶厚度灵活掌握。一般上样体积为 10-15 μ L (即 2-10 μ g 蛋白质)。
8. 加热变性后的蛋白质样品要放置到室温即电泳，不要久放，因为蛋白质的二硫键在高温下可能是会断开，但是暴露于空气中温度降低会重新形成二硫键，而且可能在过久放置过程中蛋白质可能会再折叠，更不要扔到冰箱里保存。

11. “鬼带”的出现及处理

“鬼带”就是在跑构象复杂的蛋白质大分子时，在泳道顶端出现一些未知条带或在加样孔底部生成沉淀，这主要是因为还原剂在加热的过程中被氧化失活，使解离的蛋白质分子重新折叠和亚基重新缔合，由于其分子量通常要比目标条带大，所以会生成未知条带或沉淀。

处理办法：在加热煮沸后，再添加适量的 DTT 或 Beta 巯基乙醇，以补充不足的还原剂；或可加适量 EDTA 来阻止还原剂的氧化。

12. 拖尾现象

主要是样品溶解效果不佳或分离胶浓度过大引起的。

处理办法：加样前离心；选择适当的样品缓冲液，加适量样品促溶剂；电泳缓冲液时间过长，重新配制；降低凝胶浓度。

13. 纹理现象

主要是样品不溶性颗粒引起的。

处理办法：加样前离心；加适量样品促溶剂。

14. 溴酚蓝不能起到指示作用

我们在实验中有时会出现溴酚蓝已跑出板底，但蛋白质却还未跑下来的现象。

主要原因：缓冲液和分离胶的浓度过高。

处理办法：更换正确 pH 值的 Buffer；降低分离胶的浓度。

15. 甘氨酸在电极缓冲液中的作用

SDS-PAGE 中样品液和浓缩胶选 TRIS/HCL 缓冲液, 电极液选 TRIS/甘氨酸, 电泳开始后, HCL 解离成氯离子, 甘氨酸解离出少量的甘氨酸根离子。蛋白质带负电荷, 因此一起向正极移动, 其中氯离子最快, 甘氨酸根离子最慢, 蛋白居中。电泳开始时氯离子泳动率最大, 超过蛋白, 因此在后面形成低电导区, 而电场强度与低电导区成反比, 因而产生较高的电场强度, 使蛋白和甘氨酸根离子迅速移动, 形成以稳定的界面, 使蛋白聚集在移动界面附近, 浓缩成一中间层。

16. 电泳电压很高但电流很低

现象：电压 50v 以上, 可电流却在 5mA 以下。

主要原因：电泳槽没有正确装配, 电流未形成通路。包括：内外槽装反；外槽液过少等。

处理办法：正确装配电泳槽即可。

17. 如何提高 SDS-PAGE 电泳分辨率

使聚丙烯酰胺的充分聚合, 可以提高凝胶的分辨率。

建议做法：待凝胶在室温凝固后, 可在室温下放置一段时间使用。忌即配即用或冰箱放置, 前者易导致凝固不充分, 后者可导致 SDS 结晶。

18. 电泳时间比正常要长

可能是因为凝胶缓冲系统和电极缓冲系统地 PH 选择错误, 即缓冲系统地 PH 和被分离物质的等电点差别太小, 或缓冲系统的离子强度太高。

19. 配胶缓冲液系统在电泳中的影响

缓冲液在电泳过程中的主要作用是维持合适的 pH。电泳时正极与负极都会发生电解反应, 正极发生的是氧化反应, 负极发生的是还原反应, 长时间的电泳将使正极变酸, 负极变碱。缓冲液可以维持溶液两极的 pH 保持基本不变。在浓缩胶中, pH 环境呈弱酸性, 因此甘氨酸解离很少, 泳动效率低; 而 CL 离子却很高, 两者之间形成导

电性较低的区域，蛋白分子就介于二者之间泳动并聚集到一起，浓缩为一狭窄的区域。所以，pH 对整个反应体系的影响是至关重要的，实验中在排除其他因素之后仍不能很好解决问题的情况，应首要考虑该因素。

更多蛋白表达系统的技术难点可参考[蛋白表达专题](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB® 单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

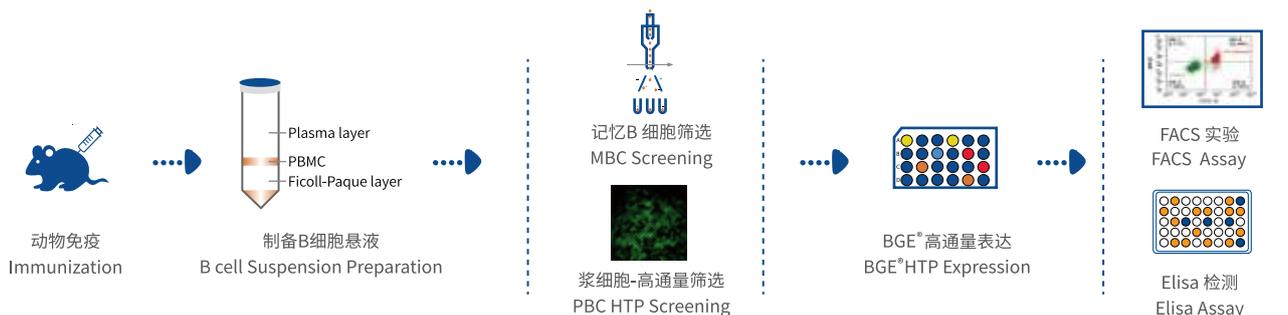
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

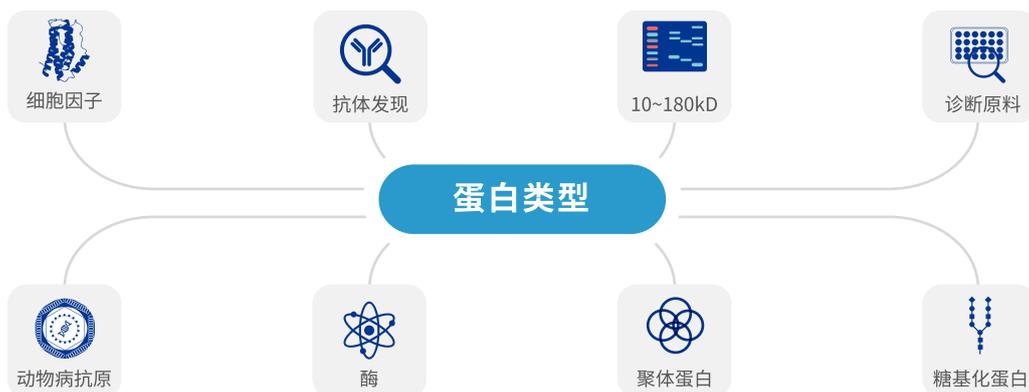


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

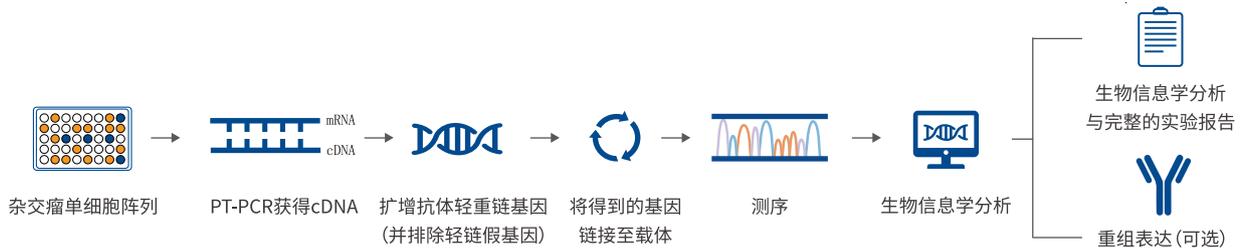
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



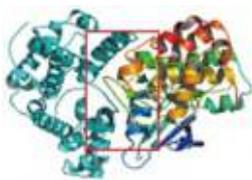
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

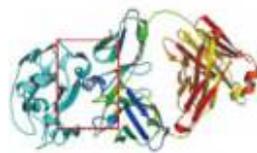
检测范围



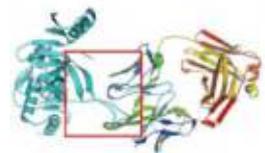
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



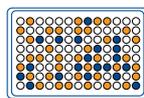
基因合成&质粒抽提



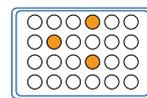
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L