



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

蓝色预染超低分子量蛋白质 Marker (3.3-31 kD)

Blue Ultra Low Molecular Weight Protein Marker (3.3-31 kD)

Ver750260-1.0

● 产品编号及规格:

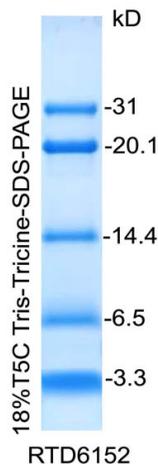
RTD6152 20 次 (200 μ l)

● 贮存、运输及效期:

-20 $^{\circ}$ C 贮存; 湿冰运输; 有效期 12 个月。

● 产品简介:

本产品包含预染的 3 种多肽和 2 种低分子量蛋白质组成, 分子量大小范围为~3.3, ~6.5, ~14.4, ~20.1, ~31 kD。可以用于直接观察蛋白质电泳状况以及清晰地判断 Western Blot 的转膜效果。经 Tricine-甘油 SDS-PAGE 凝胶电泳时以及转移到 PVDF 或 NC 膜上可看到清晰的 5 条蓝色的蛋白条带。以每次上样 10 μ l 计算, 该产品可以使用 20 次。



● 使用说明:

第一次收到该产品, 常温融化后, 彻底混匀, 离心快甩将溶液完全收集到管底。本产品为即用型, 溶化后既能使用, 不能 95 $^{\circ}$ C 加热处理。

一. 制胶:

先配制分离胶, 聚合后再配制夹层胶, 最后配制浓缩胶, 3 种胶的制胶体积比约为 4.5:1.5:1.5 (注: 表一中夹层胶和浓缩胶配制体积是过量的, 制胶时不要全部加入)。

1.1 配制分离胶:

1.1.1 按照表一将不同体积的组份加入到小烧杯中混合。

1.1.2 加入 10%APS 和 TEMED, 立即混匀以使溶液混匀。

1.1.3 在玻璃板中灌入分离胶溶液, 然后轻轻覆盖一层 1-3 cm 的无水乙醇, 使凝胶表面保持平整。

1.1.4 静置 10-20 分钟, 待分离胶和乙醇层之间出现一个清晰的界面表示凝胶已聚合。

注：凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。分离胶 37°C 约 10 分钟，25°C 约 15 分钟，18°C 约 20 分钟可以聚合。

1.2 配制夹层胶：

1.2.1 去除覆盖在分离胶上的醇，用滤纸将残留的醇吸去。

1.2.2 按照表一将不同体积的组份加入到小烧杯中混合。

1.2.3 加入 10%APS 和 TEMED，立即混匀使溶液混匀。

1.2.4 在玻璃板中灌入适量夹层胶溶液，然后在溶液上轻轻覆盖一层 1-3cm 的无水乙醇，使凝胶表面保持平整。注：此溶液为过量，请勿全部注入。

1.2.5 静置 20-30 分钟，待夹层胶和乙醇层之间出现一个清晰的界面表示凝胶已聚合。

注：凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。夹层胶 37°C 20 分钟，25°C 25 分钟，18°C 约 30 分钟可以聚合。

1.3 配制浓缩胶

1.3.1 去除覆盖在夹层胶上的乙醇，用滤纸将残留的醇吸去。

1.3.2 按照表一将不同体积的组份加入到小烧杯中混合。

1.3.3 加入 10%APS 和 TEMED，立即混匀，以使溶液充分混匀。

1.3.4 将梳子插入凝胶内，避免产生气泡。

1.3.5 静置 20-40 分钟待凝胶聚合。注：凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。浓缩胶 37°C 20 分钟，25°C 30 分钟，18°C 40 分钟可以聚合。

表一 （一块 1 mm 厚度小板胶用量）

	分离胶	夹层胶	浓缩胶
	16.5%T6%C/4.5 ml	10%T3%C/2 ml	5%T3%C/2 ml
49.5%T 3%C	/	0.4 ml	0.2 ml
49.5%T 6%C	1.5 ml	/	/
4×凝胶缓冲液	1.125 ml	0.5 ml	0.5 ml
50%甘油 (v/v)	0.9 ml	-	-
ddH ₂ O	0.95 ml	1.1 ml	1.3 ml
10%APS	~45 μl	~20 μl	~20 μl
TEMED	~4.5 μl	~2 μl	~2 μl

注：如非必要，不要使用 1.5mm 厚度的凝胶，这样会减少电泳后染色和脱色的时间。

二. 电泳：

2.1 电泳缓冲液配制：

电泳前，将 10×阳极缓冲液（Cat No:AB080）和 10×阴极缓冲液（Cat No:CB010）用蒸馏水稀释成 1×缓冲液备用。

2.2 样品处理：

待上样的检测样品与 2×Tricine 上样缓冲液(Cat:TP050)等体积混合，95°C处理 5 分钟后上样。蛋白 Marker 一般已经含有上样缓冲液，预染 Marker 不能加热处理，混匀后直接上样，非预染 Marker 一般需要 95°C处理 5 min 后上样。

2.3 电泳：

将电泳槽的外槽加入 1×阳极缓冲液，内槽加入 1×阴极缓冲液，轻柔拔出梳子，将 Marker 或蛋白

样品加入点样孔，稳压电泳（电泳条件参考下表）

浓缩胶	恒压 30 V	35-45 min
夹层胶	恒压 80 V	30-40 min
分离胶	恒压 120 V	80-100 min
待指示前沿到达分离胶下沿时,即可停止电泳,电泳时间总计 2-4 小时		

三. 凝胶检测:

注: 多肽染色可以用配方 7 和 8 (表二) 进行染色和观察。如果使用该配方进行染色时效果不好或考虑其毒性, 请选择 FastBlue 蛋白染色液 (Cat: RTD6202), 该产品能在 60 分钟之内完成蛋白的染色, 不至于小肽在染色和脱色中从凝胶中脱离, 是常规染色液的理想替代品。

3.1 染色 (以 FastBlue 蛋白染色液染色为例):

3.1.1 将电泳后的 PAGE 胶取下放入塑料容器中,用适量蒸馏水漂洗, 去除胶表面的 SDS, 残余 SDS 会导致染色液出现沉淀。

3.1.2 弃蒸馏水, 加入适量染色液 (以刚刚覆盖过胶面为适),摇床上常温摇动, 根据下表确定染色时间。

待检测蛋白量	染色时间
> 1 μg	~5 分钟
100 ng-1 μg	~10 分钟
10 ng-100 ng	~60 分钟

3.1.3 摇床上摇动至所有条带清晰可见。

3.1.4 蒸馏水摇动漂洗脱色 1-2 次, 每次 5-10 分钟, 至凝胶背景干净。

3.1.5 收集用过的染色液, 可以重复使用 2-3 次。

3.2 转膜: 多肽电泳后转膜选择孔径 0.22 μm PVDF 膜 (用前用甲醇处理润湿) 或 0.22 μm NC 膜。

3.2.1 半干转: 使用伯乐 Trans-Blot Turbo 半干转机器请选择配套的 5×RealBlot 快速半干转转膜缓冲液 (货号: RT5030), 推荐转膜条件: 一板小型凝胶 (8×10 cm) 恒流, 1.3 A, 10-15 min。

3.2.1 湿转: 湿转转膜缓冲液 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.01% SDS, 20% Methanol, pH~8.3), 可以选择 10×Tris-甘氨酸转膜缓冲液 (货号: TB1040)。推荐转膜条件: 恒流 200 mA 40-60 min。

四. 小分子蛋白质 SDS-PAGE 电泳试剂配制:

1. 49.5%T3%C PAA (Cat:PS080) 丙稀酰胺 48 g 甲叉双丙稀酰胺 1.5 g 用 ddH2O 溶解后定容至 100 ml, 过滤后使用。 贮存: 4°C	2. 49.5%T6%C PAA (Cat:PI080) 丙稀酰胺 46.5 g 甲叉双丙稀酰胺 3 g 用 ddH2O 溶解后定容至 100 ml, 过滤后使用。 贮存: 4°C	3. 4×凝胶缓冲液 (Cat:GB010) [4 M Tris; 0.4% SDS; pH8.45] Tris 碱 48.4 g; ddH2O 80 ml 0.4 g SDS 或 4 ml 10% SDS 用 HCl 调 pH 值至 8.45 25°C. 用 ddH2O 定容至 100 ml; 贮存: 4°C
4. 10×阳极缓冲液 (Cat:AB080) [2 M Tris pH8.9] Tris 碱 121.1 g ddH2O 400 ml 用 HCl 调 pH 值至 8.9 用 ddH2O 定容至 500 ml 贮存: 4°C 注: 使用前稀释成 1×阳极缓冲液使用。	5. 10×阴极缓冲液 (Cat:CB010) [1M Tris; 1M Tricine; 1% SDS; pH 8.3] Tris 碱 121.14 g Tricine 179.2 g SDS 10 g 用水溶解, 定容至 1000 ml (不用调 pH)。 贮存: 4°C 注: 使用前稀释成 1×阴极缓冲液使用	6. 2×Tricine 多肽上样缓冲液 (变性, 还原) (Cat:TP050) 2 ml 1M Tris-Cl pH6.8 5 g 甘油 0.2 g SDS 0.2 g DTT (或者 400 μl β -巯基乙醇) 4 mg 考马斯亮蓝 G-250 用灭菌 ddH2O 定容至 10 ml 混匀分装 -20°C 贮存备用
7. 染色液 冰醋酸 100 ml 考马斯亮蓝 G-250 0.25 g 水 900 ml	8. 脱色液 冰醋酸 100 ml 水 900 ml	9. 50%甘油 甘油 50 ml (63 克) 超纯水 定容到 100 ml 贮存: 4°C