



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

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

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

双色预染超低分子量蛋白质 Marker (1.5-42 kD)

Dualcolor Prestained Ultra Low Molecular Weight Protein Marker (1.5-42 kD)

Ver.750354-2.0

货号	名称	规格
RTD6148	双色预染超低分子量蛋白质 Marker (1.5-42 kD)	10 次 (50 μ l)

● 储存、运输及效期:

-20 $^{\circ}$ C 保存; 湿冰运输; 有效期 1 年。

● 贮存缓冲液:

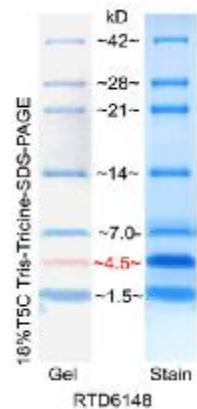
62.5 mM Tris, pH7.5, 2 mM EDTA, 2 % (w/v) SDS, 33 % (w/v) Glycerol, 5 mM DTT。

● 产品简介:

本产品由 7 种多肽和蛋白质组成, 其中 4.5 kD 为红色, 其余条带为蓝色条带, 分子量大小为 ~1.5 kD, ~4.5 kD (红色), ~7 kD, ~14 kD, ~21 kD, ~28 kD, ~42 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 7 条颜色条带。

以每次上样 5 μ l 计算, 该产品可以使用 10 次。

技术规格	
条带数量	7 条
浓度	0.1-0.3 μ g/ μ l
上样前处理	溶化后直接上样, 不要加热处理
推荐凝胶体系	16.5%或 18%Tris-Tricine-SDS-PAGE
推荐上样体积	3-5 μ l (1 mm 厚度 10 齿梳子)
推荐染色方法	预染 Marker, 电泳过程中即可见条带; 电泳结束后可以考马斯亮蓝染色
不适用于非变性电泳	为变性 Marker, 不适用于非变性电泳



● 使用说明:

1. 第一次收到该产品, 常温溶化彻底混匀, 离心快甩 10 秒将溶液完全收集到管底, -20 $^{\circ}$ C 贮存;
2. 使用该产品时, 常温解冻后轻轻混匀后既能使用, **不能 95 $^{\circ}$ C 加热处理。**;

一. 制胶:

多肽电泳建议使用 Tris-Tricine-SDS-PAGE 系统来分离蛋白, 该系统可以分离 1-100 kD 的蛋白质 (最优分离 2.5-30 kD)。客户可以使用 Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶快速制备及电泳试剂盒 (含预染 Marker) (货号: RTD6121) 或 Tris-Tricine-PAGE 凝胶制备及电泳试剂盒 (多肽变性电泳) (货号: RTD6122) 进行 Tricine 电泳, 方便快捷。或者根据以下程序制备凝胶, 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。

1.1 配制分离胶：

1.1.1 按照表一将不同体积的分离胶组份加入到小烧杯中混合。

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	-	-
蒸馏水	0.95 ml	1.1 ml	1.3 ml
10%APS	~45 μ l	~20 μ l	~20 μ l
TEMED	~4.5 μ l	~2 μ l	~2 μ l

注：如非必须，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。

1.1.2 加入10%APS和TEMED，立即混匀。

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℃约10分钟，25℃约15分钟，18℃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夹层胶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，使液面和短玻璃板上沿之间的距离比梳齿长0.5 cm即可，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，保留制备浓缩胶的位置。**

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℃ 20分钟，25℃ 25分钟，18℃ 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浓缩胶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℃ 20分钟，25℃ 30分钟，18℃ 40分钟可以聚合。

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℃处理 5 分钟后上样。双色预染超低分子量蛋白质 Marker (1.5-42 kD) 混匀后直接上样, 不能加热处理。

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)

	电压	电流变化	电泳时间
浓缩胶	恒压 30 V	起始电流: ~ 15 mA 终止电流: ~ 10 mA	~40 min
		注: 等待样品指示前沿到达夹层胶上沿时, 调高电压	
夹层胶	恒压 80 V	起始电流: ~ 35 mA 终止电流: ~ 30 mA	~60 min
		注: 等待样品指示前沿到达分离胶上沿时, 调高电压	
分离胶	恒压 120 V	起始电流: ~ 40 mA 终止电流: ~ 20 mA	~100 min
待指示前沿到达分离胶下沿时, 即可停止电泳, 电泳时间总计约 200 min。 注: 恒压条件下, 电流不可调节, 电流是逐渐降低的, 观察记录电流数值。			

三. 凝胶检测:

3.1 凝胶染色 (FastBlue 蛋白染色液):

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。

凝胶也可以使用常规考马斯亮蓝染色液 (配方 7) 和脱色液 (配方 8) 进行染色和观察。需要注意的是, 常规染色和脱色方法需要较长时间, 小肽由于长度较短, 和凝胶结合不紧密, 长时间在溶液中浸泡容易从凝胶中脱离。FastBlue 蛋白染色液 (货号: RTD6202) 除具有染色快, 无毒, 灵敏性高等特点外, 还能对小肽在染色中起到固定作用, 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。

3.2 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

注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。

中科瑞泰(北京)生物科技有限公司 电话:400-699-0631 E-mail:real-times@vip.163.com <http://www.real-times.com.cn>

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：

<p>1. 49.5%T3%C PAA(Cat:PS080) 丙稀酰胺 48 g 甲叉双丙稀酰胺 1.5 g 用蒸馏水溶解后定容至 100 ml, 过滤后使用。 贮存：4℃避光</p>	<p>2. 49.5%T6%C PAA (Cat:PI080) 丙稀酰胺 46.5 g 甲叉双丙稀酰胺 3 g 用蒸馏水溶解后定容至 100 ml, 过滤后使用。 贮存：4℃避光</p>	<p>3. 4×凝胶缓冲液(Cat:GB010) [4 M Tris; 0.4% SDS; pH8.45] Tris 碱 48.4 g; 蒸馏水 80 ml; 0.4 g SDS 或 4 ml 10% SDS 用 HCl 调 pH 值至 8.45 25℃. 用蒸馏水定容至 100 ml, 过滤后使用; 贮存：4℃</p>
<p>4. 10×阳极缓冲液 (Cat:AB080) [2 M Tris pH8.9] Tris 碱 121.1 g 蒸馏水 400 ml 用 HCl 调 pH 值至 8.9 用蒸馏水定容至 500 ml 贮存：常温 注：使用前稀释成 1×阳极缓冲液使用。</p>	<p>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 用蒸馏水溶解,定容至 1000 ml(不要调 pH)。 贮存：4℃ 注：使用前稀释成 1×阴极缓冲液使用</p>	<p>6. 2×Tricine 多肽上样缓冲液(变性,还原) (Cat:TP050) 2 ml 1M Tris-HCl 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 用蒸馏水定容至 10 ml, 混匀分装 贮存：-20℃</p>
<p>7. 染色液 (Cat: RTD6203) 冰醋酸 10% (v/v) 甲醇 50% (v/v) 考马斯亮蓝 G-250 0.2% (g/v) 贮存：常温</p>	<p>8. 脱色液 (Cat: RTD6204) 冰醋酸 10% (v/v) 贮存：常温</p>	<p>9. 50%甘油 (Cat: GA1010) 甘油 50 ml (63 克) 蒸馏水 定容到 100 ml 贮存：4℃</p>