



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-times.com.cn](http://www.real-times.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

## Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶快速制备及电泳试剂盒（含预染 Marker）

Ver.750270-2.0

货号	名称	规格
RTD6121	Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶快速制备及电泳试剂盒(含预染 Marker)	10 次

### ● 产品组成:

序号	组分货号	名称	规格	贮存
1	RTD6121-01	2×浓缩胶聚合溶液	15 ml	4℃
2	RTD6121-02	2×分离胶聚合溶液	30 ml	4℃
3	RTD6121-03	2×凝胶缓冲液	40 ml	4℃
4	RTD6148	双色预染超低分子量蛋白质 Marker (1.5-42 kD)	10 次	-20℃
5	TP080-01	2×Tricine 多肽上样缓冲液(变性,还原,含溴酚蓝)	1 ml	-20℃
6	AP020P	10% APS (干粉)	5 ml	RT, 配制后-20℃
7	TA0761-01	TEMED	0.5 ml	4℃, 避光保存
8	CB010P	10×Tris-Tricine-SDS 缓冲液(变性电泳,粉末型)	500 ml	RT, 配制后 4℃
9	RTD6202-02	FastBlue 蛋白染色液	500 ml	RT

### ● 产品简介:

该产品含有多肽电泳全套试剂,可以用来检测 1-20 kD 的多肽大小。本试剂盒可配制至少 10 块常规大小(8×10cm),厚度 1 mm 的 PAGE 胶。该产品具有以下特点:

1. 分辨率高:凝胶缓冲液独特配方,可以有效分离 1-5 kD 多肽;
2. 使用方便:制胶无需计算所需溶液量;无需制备三层凝胶(浓缩胶,夹层胶,分离胶);
3. 配套 Tris-Tricine-SDS 缓冲液,无需区分阳极缓冲液和阴极缓冲液;
4. 试剂盒配套有预染蛋白 Marker,方便检测多肽大小;
5. 试剂盒配套有快速蛋白染色液,最快可以在 30 分钟内完成染色过程,有效避免小肽从凝胶中游离。

### ● 贮存、运输及效期:

按照标签温度贮存;湿冰运输;有效期一年。

### ● 使用说明:

#### 一. 制胶:

**10%APS 溶液配制:** 10% APS 为固体粉末,使用前加入 5 ml 灭菌水溶解即配制成 10% APS 溶液,将溶液分装后置于-20℃保存,通常一年内有效。该溶液在 4℃条件下可以稳定保存两周。若发现凝胶聚合时间延长,应考虑更换使用-20℃保存的 10% APS 溶液。

#### 1.1 配制分离胶:

1.1.1 按照表一将不同体积的成分加入到小烧杯中混合;立即混匀 5-10 秒,以使溶液充分混匀。

表 1 (一块厚度 1 mm 8×10cm 凝胶胶用量)\*

	分离胶	浓缩胶
	18%T5C /5 ml	4%T 2.6C/1.5 ml
2×凝胶缓冲液	2.5 ml	0.75 ml
2×浓缩胶聚合溶液	/	0.75 ml
2×分离胶聚合溶液	2.5 ml	/
10%APS	~50 μl	~15 μl
TEMED	~5 μl	~1.5 μl

注：\* 如非必须，不要使用厚度 1.5 mm 的凝胶，尽量使用厚度 1 mm 的凝胶，这样会减少电泳后染色和脱色的时间。

1.1.2 在玻璃板中迅速灌入适量分离胶溶液，使液面和短玻璃板上沿之间的距离比梳齿长 0.5 cm 即可。注：此溶液为过量，请勿全部注入。

1.1.3 然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1-2 cm 的无水乙醇层，使凝胶表面保持平整。

1.1.4 静置 10-30 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。可以根据表 1 的标准条件调节促凝剂的加入量。分离胶在 25℃ 条件下，约 20 分钟可以聚合。

## 1.2 配制浓缩胶：

去除覆盖在分离胶上的乙醇层，用滤纸将残留的乙醇吸去。

1.2.1 按照表一将不同成分加入到小烧杯中混合；立即混匀 5-10 秒，以使溶液充分混匀。

1.2.2 将梳子插入凝胶内，避免产生气泡。

1.2.3 静置 30-50 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。可以根据表 1 的标准条件调节促凝剂的加入量。浓缩胶在 25℃ 条件下，约 40 分钟可以聚合。

## 二. 电泳：

### 2.1 变性电泳缓冲液和样品配制：

#### 2.1.1 10×Tris-Tricine- SDS 缓冲液配制：

将 10×Tris-Tricine-SDS 缓冲液（10×TTS）粉末（Cat: CB010P）置于一干净的烧杯中，加入 500 ml 超纯水，彻底搅拌混匀，不要调节 pH，即配成 500 ml 10×缓冲液。超纯水稀释 10 倍配成 1×Tris-Tricine-SDS 缓冲液。

#### 2.1.2 变性样品处理：

待上样的检测样品与 2×Tricine 上样缓冲液（变性，还原，含溴酚蓝）[Cat No: TP080] 等体积混合，95℃ 处理 5 分钟后上样。蛋白 Marker 一般已经含有上样缓冲液，根据说明书上样（预染 Marker 不能加热处理，非预染 Marker 上样前一般要 95℃ 处理 5 分钟）。试剂盒配套的预染 Marker（Cat: RTD6148）不要加热处理，溶化混匀后直接上样，1 mm 厚度 10 齿梳子建议上样 3-5 μl。

### 2.2 电泳：

将电泳槽的内槽加满电泳缓冲液，轻柔拔出梳子，用 1 ml 移液器将梳孔吹洗干净，将 Marker 或蛋白样品加入点样孔，稳压电泳（表 2），至溴酚蓝指示前沿至分离胶下沿位置时即可停止电泳。整个电泳过程大约需要 2.5-3 个小时。

表 2 多肽电泳条件（单板电泳）

	电压	电流变化	电泳时间
浓缩胶	恒压 80 V	起始电流：~ 30 mA 终止电流：~ 25 mA	~20 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	~200 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 220 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. 染色：

3.1 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。

3.2 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 $\mu\text{g}$	~5 分钟
100 ng-1 $\mu\text{g}$	~10 分钟
10 ng-100 ng	~60 分钟

3.3 摇床上摇动至所有条带清晰可见。

3.4 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。

3.5 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和脱色液进行染色和观察。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。

#### 四. 转膜:

多肽转膜选择孔径 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF 膜（用前用甲醇处理润湿）或 0.22  $\mu\text{m}$  NC 膜。

##### 4.1 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）。转膜推荐条件：一板小型凝胶（8×10 cm）恒流，1.3 A，7-10 min。

##### 4.2 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（湿转，溶液型）（货号：TB1040）。转膜条件：恒流 200 mA 40-60 min。

#### 五. 实验示例:

