



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

RealPAGE 3-8% Tris-醋酸预制胶

● 产品组成:

货号	名称	规格	贮存
RTD6154-0308	RealPAGE 3-8% Tris-醋酸预制胶	10 板/盒	4-8℃
	说明书	一份	-

● 产品简介:

Tris-醋酸-SDS-PAGE 凝胶电泳适合于分离高分子量蛋白,可以有效分离 50-500 kD 范围内蛋白;电泳体系呈中性,抑制半胱氨酸的二次氧化,防止二硫键在凝胶中交联;在变性还原电泳中,电泳缓冲体系中加入抗氧化剂,整个电泳过程都在还原条件下进行,有效防止二硫键的形成。

RealPAGE 3-8% Tris-醋酸预制胶为梯度凝胶,浓度为 3-8%,厚度为 1.1 mm, 12 齿,每个泳道可以上样最大 30 μ l 样品。另外,本公司也提供 Tris-醋酸-SDS-PAGE 电泳试剂盒(货号:RTD6155)包含预制胶、蛋白上样、蛋白电泳、染色及转膜所需的全部试剂。

● 贮存及运输:

按照标签温度贮存;试剂盒常温运输。

● 使用说明:

1. 实验准备:

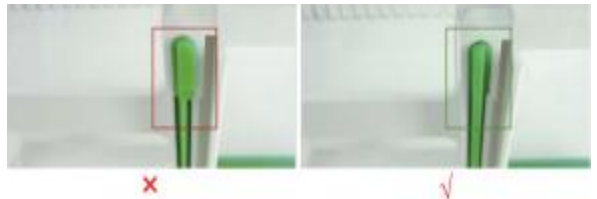
1.1 20 \times 样品还原剂为干粉,4℃贮存。用前加入 1ml 超纯水震荡彻底溶解后使用,已经溶解的 20 \times 样品还原剂-20℃贮存。

1.2 400 \times 抗氧化剂为干粉,常温贮存。用前加入 15 ml 超纯水震荡彻底溶解后使用,已经溶解的 400 \times 抗氧化剂-20℃贮存。

2. 电泳:

2.1 拆开预制胶包装,将预制胶安装在合适的电泳槽中。

注:伯乐 Mini III 或 Mini-PROTEAN Tetra Cell, 天能 VE-180, 六一 24K 系列电泳槽请确保密封条的安装方向(如图)。六一其他系列,君意东方 JY-SCZ2/4, 百晶 BG-verMINI 等电泳槽可以直接使用预制胶。不兼容 Thermol 系列电泳槽。



2.2 准备 1 \times 电泳缓冲液:

总体积	1000 ml
10 \times Tris-醋酸-SDS 电泳缓冲液	100 ml
超纯水	900 ml

2.2.1 外槽缓冲液:取适量体积 1 \times 电泳缓冲液用于外槽缓冲液。

2.2.2 内槽缓冲液:对于还原样品电泳,200 ml 1 \times 电泳缓冲液中加 0.5 ml 400 \times 抗氧化剂,混合均匀后用于内槽缓冲液。对于非还原样品电泳,直接在内槽中加入 1 \times 电泳缓冲液,不要添加 400 \times 抗氧化剂。

2.3 准备上样样品:

注: 表格以配制 10 μ l 样品为例, 其他体积按照比例调整。

组份	总体积 10 μ l	
	非还原样品	还原样品
蛋白样品	x μ l	x μ l
5 \times MonoClolor 蛋白上样缓冲液 (变性, 非还原)	2 μ l	2 μ l
20 \times 样品还原剂	-	0.5 μ l
超纯水	补至 10 μ l	
	95 $^{\circ}$ C 10 分钟	

2.4 电泳过程:

在电泳槽的内槽内加入 1 \times 电泳缓冲液(让电泳缓冲液漫过加样孔), 轻轻的拨出梳子, 用 1ml 吸头冲洗加样孔 3 次; 随后在电泳槽外槽加入适量的 1 \times 电泳缓冲液。上样, 电泳。

恒电压	起始电流	结束电流	电泳时间
150V	40-55 mA/板胶	25-40 mA/板胶	60+min
注: 冰浴电泳 (可选)			

3. 染色:

3.1 将电泳后的 PAGE 胶取下放入塑料容器中, 加入适量 FastBlue 蛋白染色液 (以刚刚覆盖过胶面为适), 摇床常温摇动, 条带 5-10 分钟即可见 (蛋白含量高于 1 μ g 条带)。

3.2 摇床常温继续摇动 15-30 分钟至条带清晰可见。

3.3 加入适量蒸馏水脱色, 期间更换 1-2 次蒸馏水, 摇床常温摇动 10-15 分钟至背景干净。

3.4 观察保存结果。

4. 转膜:

4.1 转印膜选择:

Tris-醋酸凝胶转膜可以使用 NC 膜和 PVDF 膜, 需要选择 0.45 μ m 孔径。PVDF 膜使用前注意需要用甲醇润湿活化。

4.2 10 \times Tris-醋酸转膜缓冲液 (溶液型) 配制:

将 10 \times Tris-醋酸转膜缓冲液 (湿转, 粉末型) 粉末溶解于 500 ml 超纯水中, 即配成 500 ml 10 \times Tris-醋酸转膜缓冲液 (溶液型), 不要调节 pH, pH \sim 7.2。

4.3 准备 1 \times 转膜缓冲液:

		1 \times 即用型转膜缓冲液 配制量 1 升	
10 \times Tris-醋酸转膜缓冲液(溶液型)		100 ml	
		变性蛋白	非变性蛋白
<20 kD 蛋白	无水甲醇	20%	5-10%
	SDS	0.01%	0.01%
20-80 kD 蛋白	无水甲醇	10%	0-5%
	SDS	0.05%	0.05%

>80 kD 蛋白	无水甲醇	10% (NC 膜) 0-5% (PVDF 膜)	0%
	SDS	0.1%	0.1%
	超纯水	定容至 1 升, 不要调节 pH, pH~7.2	

注：甲醇和 SDS 在转膜中有拮抗作用。甲醇使蛋白更加结合在膜上，而 SDS 让蛋白更加离开膜。因此对大蛋白转膜来说，多加 SDS，少加甲醇；而对小蛋白转膜，多加甲醇，少加 SDS。

4.4 转膜条件：

以下转膜条件仅供参考，客户针对自己的目的蛋白，最好经过1-2次预实验后，确定最佳的转膜条件。

膜孔径	蛋白大小	稳流	建议时间	降温措施
0.22 μm	低于 20 kD	200 mA	~30 分钟	不需要
0.45 μm	20-50 kD	300 mA	~45 分钟	需要
0.45 μm	50-200 kD	350 mA	~50 分钟	需要
0.45 μm	高于 200 kD	350 mA	~2.5-4.5 小时	需要