



## 中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

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

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

### 20bp DNA ladder

#### ● 产品编号及规格:

RTM441                      50 次 (250  $\mu$ l)

#### ● 产品组成:

货号	名称	规格
RTM441-01	20bp DNA ladder	50 次 (250 $\mu$ l)
DL070	6×Native-PAGE DNA 上样缓冲液	1 ml
DL020	6×DualColor DNA loading buffer (双染料)	1 ml

#### ● 产品简介:

本产品是由 13 条带状双链 DNA 条带组成的精准定量 Marker, 适用于聚丙烯酰胺凝胶电泳中 DNA 条带大小和含量的分析。13 条带的大小分别为 20, 40, 60, 80, **100**, 120, 140, 160, 180, **200**, 300, 400, 500 bp。其中 100bp 和 200bp 条带为加亮带, 含量为 100ng/5 $\mu$ l, 其余条带浓度为 50ng/5 $\mu$ l。

本产品为双链 DNA Marker, 适用于非变性的 PAGE 电泳和琼脂糖凝胶电泳, 不适用于尿素 PAGE 电泳。由于片段较小, 如使用琼脂糖分离, 建议使用高分辨率琼脂糖凝胶电泳分离。

按照每次上样 5  $\mu$ l 计算, 该产品可以使用 50 次。

#### ● 储存条件:

4 $^{\circ}$ C 贮存 6 个月 (-20 $^{\circ}$ C 长期贮存)。

#### ● 使用方法:

##### 一、TBE-PAGE 凝胶分离:

##### 1、制备凝胶步骤:

1.1 参照凝胶模具说明书, 装配好凝胶模具。

1.2 按照表一将不同体积的成分在小烧杯或试管中混合; 最后加入 10%APS 和 TEMED, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

**注: 20bp DNA ladder 适用于配制 20%TBE-PAGE 胶。**

1.3 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液 (对于 mini-gel, 凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5 cm 或距梳齿约 0.5 cm 即可), 然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1-2 cm 的无水乙醇, 使凝胶表面保持平整。

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后, 说明凝胶已聚合

表一 TBE-PAGE 分离胶配方表 (总体积 5 ml, 适用于 1mm 厚度小板胶)

最佳 DNA 分离范围	凝胶浓度	各组份体积 (ml)				
		灭菌水	30%PAA(29:1)	5×TBE	10%APS	TEMED
70-450 bp	6%	3	1.0	1.0	0.05	0.005
60-460 bp	8%	2.66	1.34	1.0	0.05	0.005
50-300 bp	10%	2.33	1.67	1.0	0.05	0.005
40-200 bp	12%	2	2.0	1.0	0.05	0.005
25-150 bp	15%	0.5	2.5	1.0	0.05	0.005
<b>5-100 bp</b>	<b>20%</b>	<b>0.66</b>	<b>3.34</b>	<b>1.0</b>	<b>0.05</b>	<b>0.005</b>

1.5 去除覆盖在分离胶上的乙醇；按照表二将不同体积成分在一个小烧杯或试管中混合；最后加入 10%过硫酸铵和 TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。

表二 TBE-PAGE 4%浓缩配方表 (总体积 1.5 ml, 适用于 1mm 厚度小板胶)

凝胶浓度	各组份体积 (ml)				
	灭菌水	30%PAA(29:1)	5×TBE	10%APS	TEMED
4%	1.0	0.2	0.3	0.02	0.002

1.6 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面，直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端；将梳子插入凝胶内，避免产生气泡。

1.7 静置 30-60 分钟，等待浓缩胶聚合。

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。可以根据环境温度的不同调节 APS 的加入量。

## 2、电泳：

2.1 将凝胶板固定在电泳装置上，往上槽和下槽中加入 1×TBE 电泳液，1 ml 吸头冲洗加样孔 1-2 次。

2.2 取待测样品，加入相应体积 6×Native PAGE DNA 上样缓冲液，如 5 μl 样品加 1 μl 上样缓冲液，短暂离心后取 5-10 μl 上样。20bp DNA ladder 1 mm 厚 10 齿梳子上样 5 μl，其余梳齿和厚度凝胶适量调整上样量。

2.3 连接电源线，打开电源开关。200V 稳压电泳。至二甲苯菁指示前沿到达凝胶三分之二位置时结束电泳（此时溴酚蓝指示前沿已经跑出凝胶，不可见）。

TBE-PAGE 电泳			
恒电压	起始电流	结束电流	电泳时间
200 V	20-25 mA/板胶	10-15 mA/板胶	70+min

## 3、染色：

3.1 漂洗：玻璃板上拆下凝胶后，适量蒸馏水漂洗 3-5 分钟。

3.2 染色液配制：

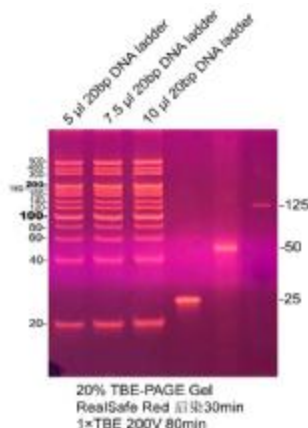
TBE-PAGE 胶可以使用 EB 或 RealSafe 类染料后染染色，以下程序用 RealSafe Red 核酸染料（货号：GR002）进行染色。即用型染色液配制：

即用型 RealSafe 核酸染色液	
	100 ml
1×TBE	100 ml
RealSafe Red 核酸染料	20 μl

3.3 染色和观察：

凝胶浸泡于即用型染色液中，常温避光摇床 40-60 rpm 染色 30 分钟。紫外光下观察。

## 4、实验示例：



### 20%TBE-PAGE 电泳

左 1-3: 20bp DNA ladder

凝胶长度 8 cm

电压 200 V 起始电流 25 mA，终止电流 11 mA

电泳缓冲液：1×TBE

电泳时间：80 分钟

染色：RealSafe Red 核酸染料后染 30 分钟

## 二、琼脂糖凝胶分离：

### 1. 琼脂糖凝胶制备：

由于片段较小，建议选用高分辨率琼脂糖（货号 AR1036）制胶。

以下步骤以制备 50 ml 3%凝胶为例：

称取 1.5 g 琼脂糖于玻璃三角瓶中，加入 50 ml 1×TAE，5  $\mu$ l RealSafe Red 核酸染料或其他核酸染料（如 EB，GoldView），混匀，盖好瓶盖，微波炉中火加热至沸腾，轻摇混匀，重复 1-2 次至琼脂糖完全溶解，无可见颗粒。倒入制胶容器中，插好梳子，常温凝固 30-50 分钟至凝胶完全凝固。

### 2. 电泳：

取待测样品，加入相应体积 6×DualColor DNA loading buffer，如 10  $\mu$ l 样品加 2  $\mu$ l 上样缓冲液，短暂离心后取 5-10  $\mu$ l 上样。20bp DNA ladder 1 mm 厚 10 齿梳子上样 5  $\mu$ l，其余梳齿和厚度凝胶适量调整上样量。

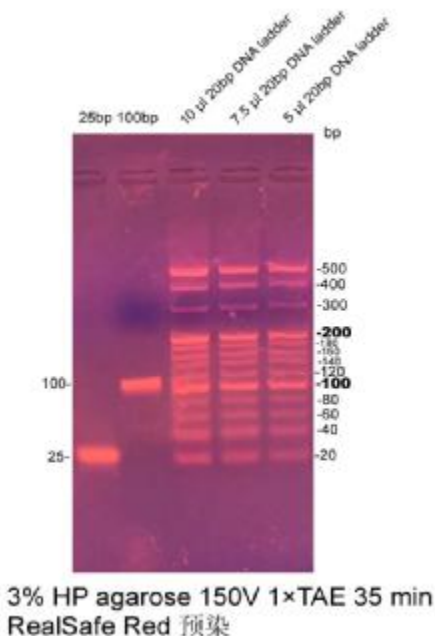
建议电泳条件：凝胶浓度为 3%，电泳电压 8-10 v/cm（单位电压指电泳槽阴阳极之间的距离电压，如阴极阳极之间的距离为 20 cm，可以用 160-200 V 电压进行稳压电泳），待溴酚蓝指示前沿距离凝胶末端 2 cm 时终止电泳，电泳时间 35-40 分钟。

注：3% 琼脂糖 TAE 电泳中，溴酚蓝大小约为 20bp，二甲苯菁大小约 200bp。

### 3. 紫外灯下观察条带。

注：使用 EB 或 Goldview 染料时，由于染料本身带正电荷较多，随着电泳时间的延长，染料会向阴极聚集，导致小片段核酸结合的染料含量降低，会出现小片段的 DNA 片段紫外灯下亮度变弱或不可见。此时可以将胶浸泡于含有染料的 1×TAE 缓冲液中染色 15-20 分钟即可看到小片段。

### 4. 实验示例：



### 3%琼脂糖凝胶电泳

左 3-5: 20bp DNA ladder

琼脂糖：高分辨率琼脂糖（HP agarose）

凝胶长度 8 cm

电压 150 V（单位电压 7.5V/cm）

电泳缓冲液：1×TAE

电泳时间：35 分钟

染色：RealSafe Red 核酸染料预染