



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@vip.163.com](mailto: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  $\mu$ 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:

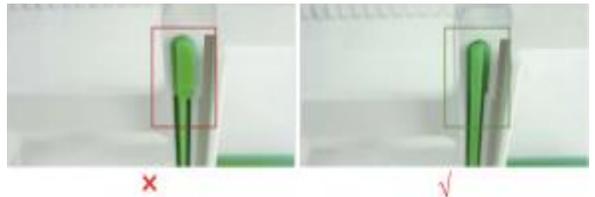
1.1 20 $\times$ 样品还原剂为干粉,4℃贮存。用前加入 1ml 超纯水震荡彻底溶解后使用,已经溶解的 20 $\times$ 样品还原剂-20℃贮存。

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  $\mu$ l 样品为例, 其他体积按照比例调整。

| 组份                                      | 总体积 10 $\mu$ l        |             |
|---|-----------------------|-------------|
|   | 非还原样品                 | 还原样品        |
| 蛋白样品                                    | x $\mu$ l             | x $\mu$ l   |
| 5 $\times$ MonoClolor 蛋白上样缓冲液 (变性, 非还原) | 2 $\mu$ l             | 2 $\mu$ l   |
| 20 $\times$ 样品还原剂                       | -                     | 0.5 $\mu$ l |
| 超纯水                                     | 补至 10 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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)<br>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   |