

# 超低分子量蛋白 Marker V (3.5-42 kD) (非预染)

## Ultra Low Molecular Weight Protein Marker V (3.5-42 kD)

Ver. 750271-2.0

● **产品编号及规格:**

RTD6113 20 次 (100  $\mu$ l)

● **贮存、运输及效期:**

-20 $^{\circ}$ C 保存; 湿冰运输; 有效期 1 年。

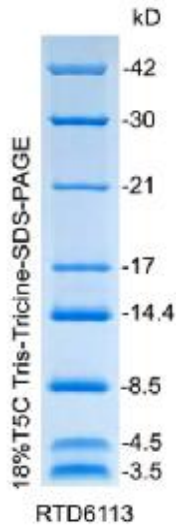
● **贮存缓冲液成分:**

65 mM Tris-HCl (pH 7.0), 20% Glycerol, 还原剂, 2% SDS, 0.005% 溴酚蓝。

● **产品简介:**

本产品包含 8 种低分子量蛋白质, 分子量范围为 3.5-42 kD, 通过 Tris-Tricine-SDS-PAGE 电泳并经考马斯亮蓝染色后可见分子量大小为 3.5, 4.5, 8.5, 14.4, 17, 21, 30, 42 kD 的条带。

以每次上样 5  $\mu$ l 计算, 该产品可以使用 20 次。



| 技术规格      |  |
|-----------|--|
| 条带数量      | 8 条                                      |
| 浓度        | 0.1-0.3 $\mu$ g/ $\mu$ l                 |
| 上样前处理     | 95-100 $^{\circ}$ C 加热处理 5 min           |
| 推荐凝胶体系    | 16.5%或 18%Tris-Tricine-SDS-PAGE          |
| 推荐上样体积    | 3-5 $\mu$ l (1mm 厚度 10 齿梳子)              |
| 推荐染色方法    | 非预染 Marker, 电泳时不可见条带, 电泳后需要考马斯亮蓝染色可以观察条带 |
| 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:**

- 第一次收到该产品, 常温融化后, 彻底混匀, 离心快甩 10 Sec 将溶液完全收集到管底, -20 $^{\circ}$ C 贮存;
- 使用该产品时, 常温解冻后轻轻混匀或用移液枪缓慢吹打均匀;
- 从原液中吸取所需的上样量至新的微量离心管中;
- 95-100 $^{\circ}$ C 下加热 5 min, 使蛋白质完全变性;
- 低速离心快甩 10 Sec 后, 取 3-5  $\mu$ l 上样电泳;

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 $\mu$ l      | ~20 $\mu$ l  | ~20 $\mu$ l |
| TEMED       | ~4.5 $\mu$ l     | ~2 $\mu$ l   | ~2 $\mu$ 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, 立即混匀以使溶液混匀。

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°C 约 10 分钟, 25°C 约 15 分钟, 18°C 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。**

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°C 20 分钟, 25°C 25 分钟, 18°C 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°C 20 分钟，25°C 30 分钟，18°C 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°C 处理 5 分钟后上样。蛋白 Marker 一般已经含有上样缓冲液，预染 Marker 不能加热处理，混匀后直接上样，非预染 Marker 一般需要 95°C 处理 5 min 后上样。

### 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<br>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<br>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<br>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。<br>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><b>1. 49.5%T3%C PAA(Cat:PS080)</b><br/>丙稀酰胺 48 g<br/>甲叉双丙稀酰胺 1.5 g<br/>用蒸馏水溶解后定容至 100 ml,<br/>过滤后使用。<br/><b>贮存：4℃</b></p>   | <p><b>2. 49.5%T6%C PAA (Cat:PI080)</b><br/>丙稀酰胺 46.5 g<br/>甲叉双丙稀酰胺 3 g<br/>用蒸馏水溶解后定容至 100 ml,<br/>过滤后使用。<br/><b>贮存：4℃</b></p>   | <p><b>3. 4×凝胶缓冲液(Cat:GB010)</b><br/>[4 M Tris; 0.4% SDS; pH8.45]<br/>Tris 碱 48.4 g<br/>蒸馏水 80 ml<br/>0.4 g SDS 或 4 ml 10% SDS<br/>用 HCl 调 pH 值至 8.45 25℃.<br/>用蒸馏水定容至 100 ml, 过滤后使用;<br/><b>贮存：4℃</b></p>             |
| <p><b>4. 10×阳极缓冲液 (Cat:AB080)</b><br/>[2 M Tris pH8.9]<br/>Tris 碱 121.1 g<br/>蒸馏水 400 ml<br/>用 HCl 调 pH 值至 8.9<br/>用蒸馏水定容至 500 ml<br/><b>贮存：常温</b><br/>注：使用前稀释成 1×阳极缓冲液使用。</p> | <p><b>5. 10×阴极缓冲液 (Cat:CB010)</b><br/>[1M Tris;1M Tricine;1% SDS;pH ~8.3]<br/>Tris 碱 121.14 g<br/>Tricine 179.2 g<br/>SDS 10 g<br/>用水溶解，定容至 1000 ml(不要调 pH)。<br/><b>贮存：4℃或常温</b><br/>注：使用前稀释成 1×阴极缓冲液使用</p> | <p><b>6. 2×Tricine 多肽上样缓冲液(变性,还原)</b><br/><b>(Cat:TP050)</b><br/>2 ml 1M Tris-HCl pH6.8<br/>5 g 甘油<br/>0.2 g SDS<br/>0.2 g DTT (或者 400 μl β-巯基乙醇)<br/>4 mg 考马斯亮蓝 G-250<br/>用灭菌水定容至 10 ml, 混匀分装<br/><b>贮存：-20℃</b></p> |
| <p><b>7. 染色液 (Cat: RTD6203)</b><br/>冰醋酸 10% (v/v)<br/>甲醇 50% (v/v)<br/>考马斯亮蓝 G-250 0.2% (g/v)<br/><b>贮存：常温</b></p>   | <p><b>8. 脱色液 (Cat: RTD6204)</b><br/>冰醋酸 10% (v/v)<br/><b>贮存：常温</b></p>  | <p><b>9. 50%甘油</b><br/>甘油 50 ml (63 克)<br/>超纯水 定容到 100 ml<br/><b>贮存：4℃</b></p>  |