



中科瑞泰(北京)生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

6%Tris-醋酸-SDS-PAGE 电泳试剂盒(变性电泳, 手灌胶)

货号	名称	规格
RTD6162	6%Tris-醋酸-SDS-PAGE 电泳试剂盒(变性电泳, 手灌胶)	10次

● 产品组成:

货号	名称	规格	贮存
RTD6162-UA	上层胶溶液 A	15 ml	4℃
RTD6162-UB	彩色上层胶溶液 B	15 ml	4℃
RTD6162-LA06	下层胶溶液 A 6%	30 ml	4℃
RTD6162-LB	下层胶溶液 B	30 ml	4℃
RTD6162-SP	改良型促凝剂	8 ml	4℃ (配制后-20℃贮存)
TA1510	400×抗氧化剂	15 ml	4℃ (配制后-20℃贮存)
TA050	10×Tris-醋酸-SDS 电泳缓冲液(变性电泳, 溶液型)	500 ml	RT
PL080-01	5×MonoClolor 蛋白上样缓冲液(变性, 还原)	1 ml	-20℃
RTD6202	FastBlue 蛋白快速染色液	500 ml	RT
TA5030P	10×Tris-醋酸转膜缓冲液(湿转, 粉末型)	500 ml	RT
	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,能有效提高蛋白的稳定性;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。

该试剂盒包含凝胶制备、蛋白上样、蛋白电泳、蛋白染色及转膜所需的全部试剂。试剂盒配套的制胶溶液,可以配制 10 板厚度 1mm 凝胶(面积 8×10 cm),分离胶浓度为 6%,可以有效分离 50-500 kD 范围内蛋白。配好的凝胶浓缩胶为红色,方便上样。本试剂盒用于蛋白变性还原电泳,不适用于蛋白非变性电泳。

按照一次实验电泳一块凝胶计算,本试剂盒可以使用 10 次。

● 贮存、运输及效期:

按照标签温度贮存;试剂盒常温运输;有效期一年。

● 使用说明:

一. 实验准备:

1.1 改良型促凝剂为干粉,用前加入 8 ml 超纯水震荡彻底溶解,适量分装后取一管使用。溶解后的促凝剂-20℃贮存。

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

二. 凝胶配制:

2.1 参照凝胶模具说明书，装配好凝胶模具。

2.2 根据下表配制凝胶:

下层胶配方				上层胶配方			
胶厚度	下层胶溶液 B	下层胶溶液 A	改良型促凝剂	胶厚度	彩色上层胶溶液 B	上层胶溶液 A	改良型促凝剂
0.75 mm	2 ml	2 ml	40 μ l	0.75 mm	0.5 ml	0.5 ml	10 μ l
1.0 mm	2.5 ml	2.5 ml	50 μl	1.0 mm	0.75 ml	0.75 ml	15 μl
1.5 mm	4 ml	4 ml	80 μ l	1.5 mm	1 ml	1 ml	20 μ l

2.2.1 取等体积下层胶溶液 B 和下层胶溶液 A，各 2.0/2.5/4.0 ml，混匀；

2.2.2 混合溶液中加入 40/50/80 μ l 的改良型促凝剂，轻轻混匀，将混匀后的溶液注入制胶玻璃板中，使液面和短玻璃板上沿之间的距离比梳齿长 0.5 cm 即可；

注意：此溶液为过量，请勿全部注入。

2.2.3 沿玻璃板缓慢加入适量灭菌水或无水乙醇覆盖于下层胶之上，待下层胶凝固后，倒去上层水或乙醇；

注意：当水（乙醇）和胶之间有一条折射线时，说明胶已凝固；25℃时 5-10 分钟可以聚合。

2.2.4 取等体积彩色上层胶溶液 B 和上层胶溶液 A，各 0.5/0.75/1.0 ml，混匀；

2.2.5 向混合溶液中加入 10/15/20 μ l 的改良型促凝剂，轻轻混匀，插入梳齿；

2.2.6 待上层胶凝固后（约 20-40 min），拔去梳齿即可用于电泳。

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。

上层胶 25℃ 20-25 分钟可以聚合；18℃ 35-40 分钟可以聚合。

三. 电泳:

3.1 准备 1×电泳缓冲液:

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

3.1.1 外槽缓冲液：取适量体积 1×电泳缓冲液用于外槽缓冲液。

3.1.2 内槽缓冲液：200 ml 1×电泳缓冲液中加 0.5 ml 400×抗氧化剂，混合均匀后用于内槽缓冲液。

3.2 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 还原样品
蛋白样品	x μ l
5×MonoClolor 蛋白上样缓冲液 (变性, 还原)	2 μ l
超纯水	补至 10 μ l
	95℃ 10 分钟

3.3 电泳过程:

在电泳槽的内槽加入内槽缓冲液（已加入抗氧化剂），让电泳缓冲液漫过加样孔，轻轻的拔出梳子，用 1ml 吸头冲洗加样孔 3 次；随后在电泳槽外槽加入适量的外槽缓冲液（不用添加抗氧化剂）。上样，电泳。

恒电压	起始电流	结束电流	电泳时间
200 V	65-75 mA/板胶	35-55 mA/板胶	50+min
注：冰浴电泳（可选）			

四. 染色：

注：如果只是观察蛋白的分离情况，对凝胶进行染色。如果要后续进行 WB 实验，凝胶不要染色，进行步骤五。

- 4.1 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 μg 条带）。
- 4.2 摇床常温继续摇动 15-30 分钟至条带清晰可见。
- 4.3 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。
- 4.4 观察保存结果。

五. 转膜：

5.1 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 μm 孔径。PVDF 膜使用前注意需要用甲醇润湿活化。

5.2 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~7.2。

5.3 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
20-80 kD 蛋白	无水甲醇	10%
	SDS	0.05%
>80 kD 蛋白	无水甲醇	10% (NC 膜) 0-5% (PVDF 膜)
	SDS	0.1%
	超纯水	定容至 1 升, 不要调节 pH, pH~7.2

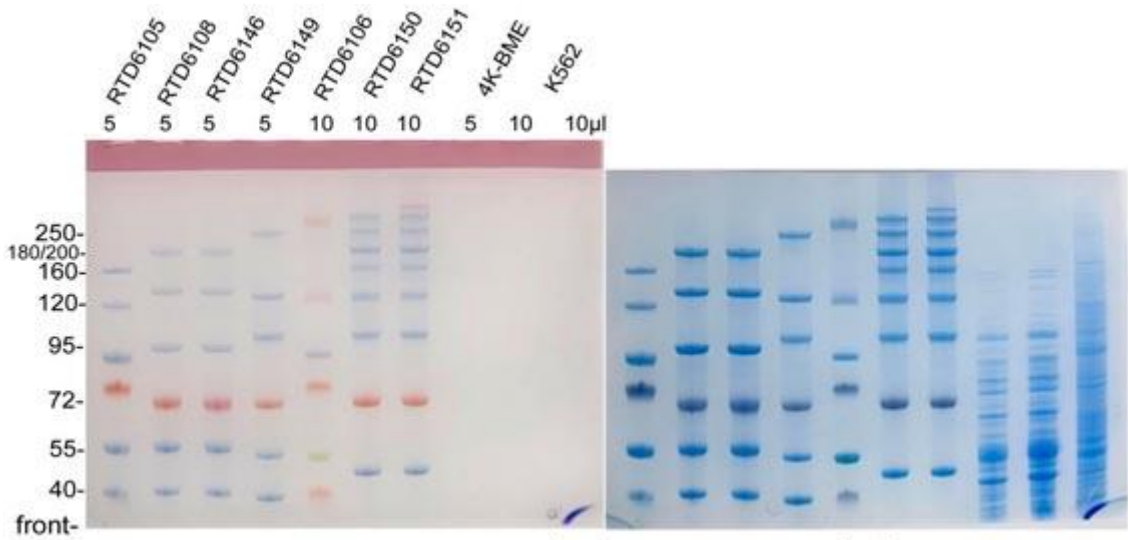
注：甲醇和 SDS 在转膜中有拮抗作用。甲醇使蛋白更加结合在膜上，而 SDS 让蛋白更加离开膜。因此对大蛋白转膜来说，多加 SDS，少加甲醇；而对小蛋白转膜，多加甲醇，少加 SDS。

5.4 转膜条件：

高分子量蛋白建议湿转。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
0.45 μm	50-200 kD	350 mA	~60 分钟	需要
0.45 μm	高于 200 kD	350 mA	~2-3 小时	需要

六. 实验示例:



6%Tris-醋酸-SDS-PAGE电泳

凝胶: 6%Tris 醋酸手灌胶

电泳: 1 \times TAS 200V 70-42mA 55min; 内槽加抗氧化剂

染色: FastBlue 蛋白染色液染色 15 分钟

样品: 4K-BME-细菌裂解物; K562-悬浮细胞 RIPA 提取总蛋白