

RealPAGE®彩色PAGE凝胶快速制备试剂盒（两步法）

RealPAGE® Two-Step Colour PAGE Gel Fast Preparation Kit

货号	名称	可制胶数量
RTD6133-Y	制备 6% PAGE 胶，黄色上层胶	125 块 0.75 mm 胶 > 90 块 1.0 mm 胶 > 60 块 1.5 mm 胶
RTD6133-G	制备 7.5% PAGE 胶，绿色上层胶	
RTD6133-B	制备 10% PAGE 胶，蓝色上层胶	
RTD6133-R	制备 12.5% PAGE 胶，红色上层胶	
RTD6133-V	制备 15% PAGE 胶，紫色上层胶	

货品内容		
组份	名称	规格
1	上层胶溶液（2×）	80 ml
2	上层胶缓冲液（2×）	80 ml
3	下层胶溶液（2×）	250 ml
4	下层胶缓冲液（2×）	250 ml
5	改良型促凝剂	10 ml
6	刻度配胶杯	6 个
7	说明书	一份

● 运输、贮存及效期：

本产品常温运输；4-8℃贮存，其中配制后的改良型促凝剂贮存于-20℃；有效期一年。

● 产品特点：

快速制备凝胶：短时间即可灌制多块凝胶，无需计算所需溶液量，无需稀释；

彩色上层胶：可制备五种颜色的上层胶，为点样和区分不同凝胶提供便利；

避免异味：无需使用 TEMED，环境安全友好；

凝胶高稳定性：中性pH凝胶，有效提高凝胶稳定性，密封条件下，凝胶可以四度贮存6个月。

兼容性广：制胶溶液中不含SDS，可用于非变性电泳（Native-PAGE）。

● 产品简介:

该产品利用聚丙烯酰胺凝胶电泳原理, 采用上层胶和下层胶的预混配方, 只需加入改良型促凝剂, 可在15-30分钟内配制得到高质量的聚丙烯酰胺凝胶, 可用于变性和非变性蛋白凝胶电泳, 适用于Tris-甘氨酸电泳体系(Laemmli体系)。本产品可以配制6% (黄色上层胶)、7.5% (绿色上层胶)、10% (蓝色上层胶)、12.5% (红色上层胶) 和15% (紫色上层胶) 的分离胶浓度, 所配的上层胶带有颜色(黄色、绿色、蓝色、红色或紫色), 点样孔清晰易辨, 方便点样, 可以满足绝大多数蛋白电泳需求。

本产品配套提供改良型促凝剂, 其具有更好的稳定性和催化效能, 配胶过程中无需额外添加TEMED。为方便操作, 已开盖使用中的改良型促凝剂, 可置于4℃保存至少三个月, -20℃保存一年。

本试剂盒大约可以配制60-125块常规大小(8×10cm)的PAGE凝胶, 具体数量根据凝胶厚度决定: 0.75 mm厚度凝胶可以配制125块胶, 1.0 mm厚度凝胶可以配制至少90块胶, 1.5 mm厚度凝胶可以配制至少60块胶。

● 使用说明:

一. 制胶前的准备:

1.1 即用型改良型促凝剂配制:

试剂盒提供的改良型促凝剂为干粉, 第一次使用前加入10 ml超纯水, 彻底溶解后使用。配制好的即用型改良型促凝剂置于4℃备用, 有效期3个月, 长期不用建议-20℃贮存。

1.2 推荐操作:

实验前半小时, 取出试剂盒所有组份, 常温静置半小时使溶液恢复到常温后轻柔混匀, 可以有效降低制胶时产生气泡的可能性。

二. 凝胶配制(以一块0.75/1.0/1.5 mm厚度的8×10 cm胶为例):

2.1 下层胶制备:

2.1.1 根据表一配制下层胶:

表一 下层胶配方			
胶厚度	下层胶溶液	下层胶缓冲液	促凝剂
0.75 mm	2 ml	2 ml	40 μ l
1.0 mm	2.5 ml	2.5 ml	50 μ l
1.5mm	4 ml	4 ml	80 μ l

2.1.2 取等体积下层胶溶液和下层胶缓冲液, 混匀;

2.1.3 混合溶液中加入改良型促凝剂, 轻轻混匀;

注: 加入改良型促凝剂后, 需轻柔混匀, 防止过多氧气混入胶溶液, 抑制凝胶聚合和导致凝胶内可能产生气泡。

RealPAGE®彩色PAGE凝胶快速制备试剂盒（两步法）

RealPAGE® Two-Step Colour PAGE Gel Fast Preparation Kit

2.1.4 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 约1.5 cm或距离梳齿下沿距离约0.5 cm即可；

注：此溶液为过量，请勿全部注入；可留少许于制胶杯中，便于判断凝胶状态。

2.1.5 封闭：沿玻璃板缓慢加入适量超纯水或醇（无水乙醇或异丙醇）覆盖于下层胶之上，待下层胶凝固后（5-15 min），倒去上层水或醇，可用滤纸将残余溶液吸尽；

注：当水（醇）和胶之间有一条折射线时，说明胶已凝固；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。下层胶25℃~5分钟可以聚合；18℃~15分钟可以聚合。

2.2 上层胶配制(以一块0.75/1.0/1.5 mm厚度的8×10cm胶为例)：

2.2.1 根据表二配制上层胶：

表二 彩色上层胶配方			
胶厚度	上层胶溶液	彩色上层胶缓冲液	促凝剂
0.75 mm	0.5 ml	0.5 ml	10 µl
1.0 mm	0.75 ml	0.75 ml	15 µl
1.5 mm	1 ml	1 ml	20 µl

2.2.2 取等体积上层胶溶液和彩色上层胶缓冲液，混匀；

注：由于染料特殊理化性质，使用前请摇匀彩色上层胶缓冲液。

2.2.3 向混合溶液中加入改良型促凝剂，轻轻混匀；

注：加入改良型促凝剂后，需轻柔混匀，防止过多氧气混入胶溶液，抑制凝胶聚合和导致凝胶内可能产生气泡。

2.2.4 将混合溶液注入制胶玻璃板中，插入梳齿，待上层胶凝固后（约15-40 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℃ 15-20分钟可以聚合；18℃ 35-40分钟可以聚合。

三. 电泳：

3.1 变性电泳：

电泳缓冲液	Tris-甘氨酸-SDS电泳缓冲液
上样缓冲液	5×蛋白上样缓冲液（变性，还原）
电泳条件	恒压 200V 40-55 min

3.2 非变性电泳:

电泳缓冲液	Tris-甘氨酸电泳缓冲液
上样缓冲液	5×蛋白上样缓冲液（非变性，非还原）
电泳条件	恒压 150 V 50-65 min

非变性电泳必看：该凝胶体系pH大约8左右，适用于等电点pI小于8的蛋白电泳分离，pI越远离8，带的负电荷越多，分离就更容易；等电点接近8或者高于8的蛋白不适合用该系统进行非变性电泳。

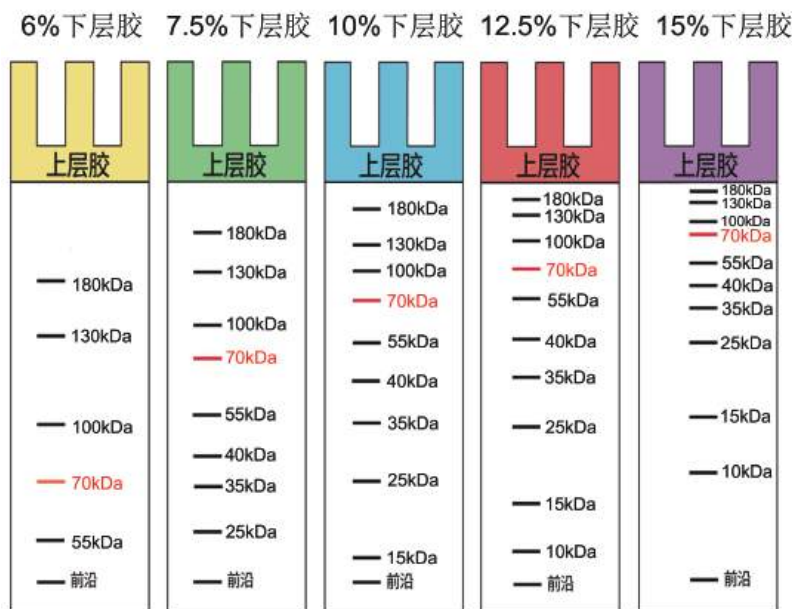
四. 凝胶染色或转膜:

4.1 凝胶染色可以选择FastBlue蛋白快速染色液(货号: RTD6202), 可以在30分钟内完成染色和脱色, 也可以选择常规法考马斯亮蓝蛋白染色液(货号: RTD6203)。

4.2 转膜缓冲液可以使用湿转法或半干转方法转膜。湿转法可以使用经典Tris-甘氨酸转膜缓冲液（货号：TB1040）或者使用10×RealBlot快速转膜液（货号：RT5020）。半干转转膜可以使用5×RealBlot快速半干转膜缓冲液（货号：RT5030）。

五. 凝胶浓度选择参考:

目的蛋白分子量	下层胶浓度	压缩前沿
10 kD以下	15%	~6 kD
10-45 kD	12.5%	~10 kD
45-100 kD	10%	~15 kD
100-180 kD	10%/7.5%	~15 kD/~25 kD
180-250 kD	7.5%	~25 kD
250 kD以上	6%	~60 kD



上图为 Tris-甘氨酸缓冲系统中, 蛋白分子量标准 (10-180 kDa, 含有 10 条蛋白条带) 在不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶中的分离示意图。因温度、pH 值等因素不同, 实际分离情况会略有出入, 本图仅供参考。