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

三色预染超低分子量蛋白质 Marker III（1.2-40 kDa）

Tricolor Prestained Ultra Low Molecular Weight Protein Marker III（1.2-40 kDa） Ver.761060-1.0

货号	名称	规格
RTD6159	三色预染超低分子量蛋白质 Marker III（1.2-40 kDa）	50 次（250 μL）

● **储存、运输及效期：**

-20℃贮存；湿冰运输；有效期 1 年。

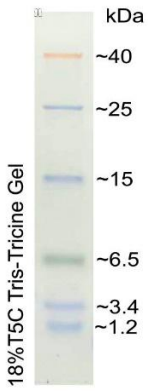
● **产品简介：**

本产品由 6 种经过预染处理的多肽及蛋白质组成，分子量范围为 1.2–40 kDa，其中~40 kDa 条带为红色，~6.5 kDa 条带为绿色，其余条带为蓝色。各条带的标称分子量分别约为 1.2、3.4、6.5、15、25 和 40 kDa。注：预染蛋白及多肽的表观迁移率可能随凝胶浓度和电泳缓冲体系变化，标称分子量仅供参考。

本产品适用于 Tris-Tricine-SDS-PAGE 电泳体系，可用于观察电泳过程、判断蛋白质及多肽的迁移位置，并辅助评估 Western Blot 转膜效果。产品无需加热或额外处理，解冻混匀后即可上样。在推荐的 Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶中，可观察到 6 条预染条带。转膜后的条带可见性受膜孔径、转膜缓冲液及转膜条件影响，低分子量条带应根据实际实验条件进行验证。

每次上样 5 μL，250 μL 包装可使用 50 次。

技术规格	
条带数量	6 条
浓度	各条带蛋白浓度为 0.1-0.3 μg/μL
上样前处理	溶化后直接上样，不要加热处理
推荐凝胶体系	16.5%或 18%Tris-Tricine-SDS-PAGE
推荐上样体积	5 μL（1 mm 厚度 10 齿梳子）
条带观察方式	预染 Marker，电泳过程中即可见条带； 电泳结束后可以考马斯亮蓝染色
不适用于非变性电泳	为变性 Marker，不适用于非变性电泳



RTD6159

● **使用说明：**

1. 第一次收到该产品，常温溶化彻底混匀，离心快甩 10 秒将溶液完全收集到管底，-20℃贮存；
2. 使用该产品时，常温解冻后轻轻混匀后既能使用，**不能 95℃加热处理。**；

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 kDa 的蛋

Real-Times 400-699-0631

白质（最优分离 3-50 kDa）。客户可以使用 16.5% RealPAGE Tricine 预制胶（货号：RTD6115-0016P）或 Tris-Tricine-PAGE 凝胶制备及电泳试剂盒（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 μL	~20 μL	~20 μL
TEMED	~4.5 μL	~2 μL	~2 μL

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。

1.1.3 沿玻璃板内壁缓慢加入适量无水乙醇覆盖凝胶表面，避免扰动凝胶溶液。

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℃约 10 分钟，25℃约 15 分钟，18℃ 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，保留制备浓缩胶的位置。

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℃ 20 分钟，25℃ 25 分钟，18℃ 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。

Real-Times 400-699-0631

1.3.5 静置 20-40 分钟装待凝胶聚合。

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℃ 20 分钟，25℃ 30 分钟，18℃ 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℃处理 5 分钟后上样。蛋白 Marker 混匀后直接上样，不能加热处理。

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 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 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 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。 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。

对于低分子量蛋白及多肽，长时间染色和脱色可能导致部分小分子组分从凝胶中扩散或流失，影响检测效果。建议优先使用 FastBlue 蛋白染色液（RTD6202），以缩短染色及脱色时间，减少低分子量条带的损失。对于 1–3 kDa 多肽，应根据实际样品性质及凝胶浓度优化染色条件。

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

Real-Times 400-699-0631

（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。

3.2.2 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。

注：对于低分子量蛋白及多肽，建议使用 0.22 μm 孔径的转印膜。转膜效率及膜上保留率受分子量、膜材料、转膜缓冲液及转膜条件影响。特别是低于 5 kDa 的多肽，应适当优化转膜时间、电流及缓冲液组成，避免转膜不足或过度转膜造成条带损失。

四.小分子蛋白质 SDS-PAGE 电泳试剂配制：

1. 49.5%T3%C PAA(Cat:PS080) 丙稀酰胺 48 g 甲叉双丙稀酰胺 1.5 g 用蒸馏水溶解后定容至 100 ml， 过滤后使用。 **贮存：4℃避光**	**2. 49.5%T6%C PAA（Cat:PI080）** 丙稀酰胺 46.5 g 甲叉双丙稀酰胺 3 g 用蒸馏水溶解后定容至 100 ml， 过滤后使用。 **贮存：4℃避光**	**3. 4×凝胶缓冲液(Cat:GB010）** [4 M Tris; 0.4% SDS; pH8.45] Tris 碱 48.4 g；蒸馏水 80 ml；0.4 g SDS 或 4 ml 10％ SDS 用 HCl 调 pH 值至 8.45 25℃. 用蒸馏水定容至 100 ml，过滤后使用； **贮存：4℃**
4. 10×阳极缓冲液（Cat:AB080） [2 M Tris pH8.9] Tris 碱 121.1 g 蒸馏水 400 ml 用 HCl 调 pH 值至 8.9 用蒸馏水定容至 500 ml **贮存：常温** 注：使用前稀释成 1×阳极缓冲液使用。	**5. 10×阴极缓冲液（Cat:CB010）** [1M Tris;1M Tricine;1% SDS;pH ~8.3] Tris 碱 121.14 g Tricine 179.2 g SDS 10 g 用蒸馏水溶解，定容至 1000 ml(不要调 pH)。 **贮存：4℃** 注：使用前稀释成 1×阴极缓冲液使用	**6. 2×Tricine 多肽上样缓冲液(变性,还原)** **(Cat:TP050)** 2 ml 1 M Tris-HCl pH6.8 5 g 甘油 0.2 g SDS 0.2 g DTT（或者 400 μL β-巯基乙醇） 4 mg 考马斯亮蓝 G-250 用蒸馏水定容至 10 ml，混匀分装 **贮存：-20℃**
7. 染色液（Cat：RTD6203） 冰醋酸 10%（v/v） 甲醇 50%（v/v） 考马斯亮蓝 G-250 0.2%（g/v） **贮存：常温**	**8. 脱色液（Cat：RTD6204）** 冰醋酸 10%（v/v） **贮存：常温**	**9. 50%甘油（Cat：GA1010）** 甘油 50 ml（63 克） 蒸馏水 定容到 100 ml **贮存：4℃**

Real-Times 400-699-0631