



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

RealPAGE 3-8% Tris-醋酸预制胶

Ver.760860-3.0

货号	名称	规格
RTD6154-0308	RealPAGE 3-8% Tris-醋酸预制胶	10 板/盒

● 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 μ 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、运输及效期：

4-8℃贮存，切勿冷冻； 常温运输；**有效期一个月。**

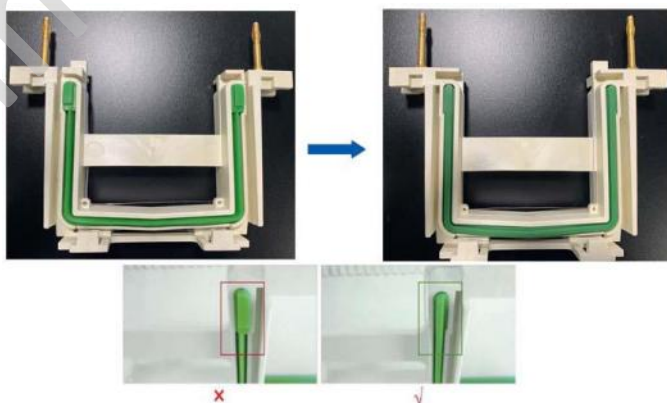
● 使用说明：

1. 实验准备：

400 $\times$ 抗氧化剂（TA1510）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×电泳缓冲液：

总体积	1000 ml
10×Tris-醋酸-SDS 电泳缓冲液(变性电泳，溶液型)（TA050）	100 ml
超纯水	900 ml

2.2.1 外槽缓冲液：取适量体积 1×电泳缓冲液用于外槽缓冲液。

2.2.2 内槽缓冲液：对于变性还原样品电泳，按照 200 ml 1×电泳缓冲液中加 0.5 ml 400×抗氧化剂比列配制，混合均匀后用于内槽缓冲液。对于变性非还原样品电泳，直接在内槽中加入 1×电泳缓冲液，不要添加 400×抗氧化剂。

2.3 准备上样样品：

注：表格以配制 10 μl 样品为例，其他体积按照比例调整。

组份	总体积 10 μl	
	变性非还原样品	变性还原样品
蛋白样品	x μl	x μl
5×MonoClolor 蛋白上样缓冲液 (变性, 还原) (PL080)	-	2 μl
5×MonoColor 蛋白上样缓冲液 (变性, 非还原) (PL112)	2 μl	-
超纯水	补至 10 μl	
95℃ 10 分钟		
注：对于多次跨膜蛋白（Multi-pass membrane protein）的变性电泳检测，样品建议使用 37℃处理 30 分钟或者 50℃处理 10 分钟，不要 95℃加热 5 分钟，因为在 95℃高温情况下，多次跨膜蛋白极易聚集形成多聚体，样品会聚集，WB 检测会表现为比实际蛋白大小更大的分子量。		

2.4 电泳过程：

在电泳槽的内槽内加入 1×内槽电泳缓冲液(含抗氧化剂)，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×外槽电泳缓冲液。上样，电泳。

恒电压	起始电流变化	结束电流变化	电泳时间
150V	40-55 mA/板胶	25-40 mA/板胶	60+min
注：冰浴电泳（可选）：恒压电泳，电流不可调节，是逐渐降低的，记录电流数据。			

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 μg 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 μm 孔径。PVDF 膜使用前注意需要用甲醇润湿活化。

4.2 10×Tris-醋酸转膜缓冲液（溶液型）配制：

将 10×Tris-醋酸转膜缓冲液（湿转，粉末型）（TA5030P）粉末溶解于 500 ml 超纯水中，即配成 500 ml 10×Tris-醋酸转膜缓冲液（溶液型），不要调节 pH，pH~7.2。

4.3 准备 1×转膜缓冲液：

	1×即用型转膜缓冲液 配制量 1 升
10×Tris-醋酸转膜缓冲液	100 ml

	超纯水	约 500 ml
<20 kD 蛋白	无水甲醇	20%
	SDS	-
20-80 kD 蛋白	无水甲醇	10%
	SDS	-
>80 kD 蛋白	无水甲醇	10% (NC 膜) / 0-5% (PVDF 膜)
	SDS	0.05-0.1%
	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。

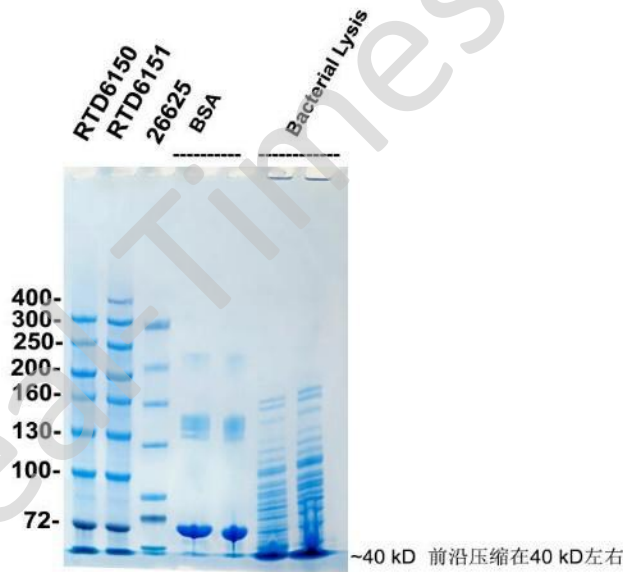
4.4 转膜条件：

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
0.45 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

5. 实验示例：

5.1 3-8%Tris 醋酸胶考染结果：



凝胶：3-8% Tris-醋酸预制胶（RTD6154-0308）

电泳条件：1×Tris-醋酸-SDS 电泳缓冲液，恒压 150V 49-30 mA 65min

染色：FastBlue 快速染色液（RTD6202），染色 30 min

5.2 3-8%Tris 醋酸胶 WB 检测结果:



样品: K562 细胞和 Jurkat 细胞用 IP 细胞裂解液 (WL1020) 提取总蛋白, 上样 5 µg 和 10 µg;

凝胶: 3-8%Tris 醋酸胶 (RTD6154-0308), 1×Tris-醋酸-SDS 电泳缓冲液加抗氧化剂, 恒压 150 V 电流变化 51-44 mA 70 min;

转膜: 0.45 µm PVDF 膜, 1×Tris-醋酸转膜缓冲液 (TA5030P) 加 10%乙醇, 恒流 200 mA 冰浴转膜 120 min;

封闭: Western 封闭液 I (BSA) (WB1070) RT 60 min;

一抗: p-ACC 兔单抗 1: 1000 (WP1080 稀释) 四度过夜;

二抗: 羊抗兔 IgG-HRP (HRG1020) 1: 5000 RT 60 min;

检测: RealECL 发光液 (EC2520) 检测, 曝光 1 s 680 ms