



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

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

E-mail: real-times@163.com

25bp DNA ladder

● 产品编号及规格:

RTM444 50 次 (250 μ l)

● 产品组成:

货号	名称	规格
RTM444-01	25bp DNA ladder	50 次 (250 μ l)
DL070-01	6×Native-PAGE DNA 上样缓冲液	1 ml
DL020-01	6×DualColor DNA loading buffer (双染料)	1 ml

● 产品简介:

本产品是由 8 条带状双链 DNA 条带组成的精准定量 Marker, 适用于聚丙烯酰胺凝胶电泳中 DNA 条带大小和含量的分析。8 条带的大小分别为 25, 50, 100, 150, **200**, 300, 400, 500bp。其中 200bp 条带为加亮带, 含量约为 100ng/5 μ l, 其余条带浓度约为 50ng/5 μ l。

本产品为双链 DNA Marker, 适用于非变性的 PAGE 电泳和琼脂糖凝胶电泳, 不适用于尿素 PAGE 电泳。由于片段较小, 如使用琼脂糖分离, 建议使用高分辨率琼脂糖凝胶电泳分离。

按照每次上样 5 μ l 计算, 该产品可以使用 50 次。

● 储存、效期及运输:

4 $^{\circ}$ C 贮存 6 个月 (-20 $^{\circ}$ C 有效期 3 年; 湿冰运输。

● 使用方法:

一、 TBE-PAGE 凝胶分离:

1.1 制备凝胶步骤:

1.1.1 参照凝胶模具说明书, 装配好凝胶模具。

1.1.2 按照表一将不同体积的成分在小烧杯或试管中混合; 最后加入 10%APS 和 TEMED, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

注: 25bp DNA ladder 适用于配制 15%TBE-PAGE 胶。

1.1.3 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液 (对于 mini-gel, 凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5 cm 或距梳齿约 0.5 cm 即可), 然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1-2 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后, 说明凝胶已聚合

表一 TBE-PAGE 分离胶配方表 (总体积 5 ml, 适用于 1mm 厚度小板胶)

最佳 DNA 分离范围	凝胶浓度	各组份体积 (ml)				
		灭菌水	30%PAA(29:1)	5×TBE	10%APS	TEMED
70-450 bp	6%	3	1.0	1.0	0.05	0.005
60-460 bp	8%	2.66	1.34	1.0	0.05	0.005
50-300 bp	10%	2.33	1.67	1.0	0.05	0.005
40-200 bp	12%	2	2.0	1.0	0.05	0.005
25-150 bp	15%	1.5	2.5	1.0	0.05	0.005
5-100 bp	20%	0.66	3.34	1.0	0.05	0.005

注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。

1.1.5 去除覆盖在分离胶上的乙醇；按照表二将不同体积成分在一个小烧杯或试管中混合；最后加入 10%过硫酸铵和 TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。

表二 TBE-PAGE 4%浓缩配方表 (总体积 1.5 ml, 适用于 1mm 厚度小板胶)

凝胶浓度	各组份体积 (ml)				
	灭菌水	30%PAA(29:1)	5×TBE	10%APS	TEMED
4%	1.0	0.2	0.3	0.02	0.002

1.1.6 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面，直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端；将梳子插入凝胶内，避免产生气泡。

1.1.7 静置 30-60 分钟，等待浓缩胶聚合。

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。可以根据环境温度的不同调节 APS 的加入量。

1.2 电泳：

1.2.1 将凝胶板固定在电泳装置上，往上槽和下槽中加入 1×TBE 电泳液，1 ml 吸头冲洗加样孔 1-2 次。

1.2.2 取待测样品，加入相应体积 6×Native PAGE DNA 上样缓冲液，如 5 μl 样品加 1 μl 上样缓冲液，短暂离心后取 5-10 μl 上样。25bp DNA ladder 已经含有上样缓冲液，1 mm 厚 10 齿梳子直接上样 5 μl，其余梳齿和厚度凝胶适量调整上样量。

1.2.3 连接电源线，打开电源开关。200 V 稳压电泳。至二甲苯菁指示前沿到达距离凝胶下沿二分之一位置时结束电泳 (~50bp)，此时溴酚蓝指示前沿在凝胶下沿边界 (~17bp)。

PAGE 凝胶浓度	恒电压	起始电流	结束电流	二甲苯菁	溴酚蓝	电泳时间
15%	200 V	25-30 mA/板胶	10-18 mA/板胶	~50 bp	~17 bp	35+min

1.3 染色：

1.3.1 漂洗：玻璃板上拆下凝胶后，适量蒸馏水漂洗 3-5 分钟。

1.3.2 染色液配制：

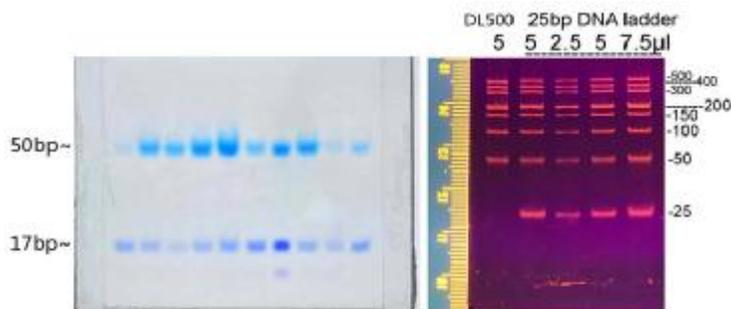
TBE-PAGE 胶可以使用 RealSafe 类染料后染染色，以下程序用 RealSafe Red 核酸染料（货号：GR002）进行染色。即用型染色液配制：

即用型 RealSafe 核酸染色液	
配制量 100 ml	
1×TBE	100 ml
RealSafe Red 核酸染料	10 μl

1.3.3 染色和观察：

凝胶浸泡于即用型染色液中，常温避光摇床 40-60 rpm 染色 30 分钟。紫外光或蓝光仪下观察。

1.4 实验示例：



凝胶：15%T3.3C TBE-PAGE
电泳条件：1×TBE 200V 35 min 电流变化：28-16mA
染色：RealSafe Red后染

二、琼脂糖凝胶分离：

注：本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。

2.1 琼脂糖凝胶制备:

由于片段较小, 建议选用高分辨率琼脂糖(货号: AR1036)制胶。以下步骤以制备 50 ml 3%凝胶为例:

称取 1.5 g 琼脂糖于玻璃三角瓶中, 加入 50 ml 1×TAE, 5 μl RealSafe Red 核酸染料或其他核酸染料(如 EB, GoldView), 混匀, 盖好瓶盖, 微波炉中火加热至沸腾, 轻摇混匀, 重复 1-2 次至琼脂糖完全溶解, 无可见颗粒。倒入制胶容器中, 插好梳子, 常温凝固 30-50 分钟至凝胶完全凝固。

2.2 电泳:

取待测样品, 加入相应体积 6×DualColor DNA loading buffer, 如 10 μl 样品加 2 μl 上样缓冲液, 短暂离心后取 5-10 μl 上样。25 bp DNA ladder 1 mm 厚 10 齿梳子上样 5 μl, 其余梳齿和厚度凝胶适量调整上样量。

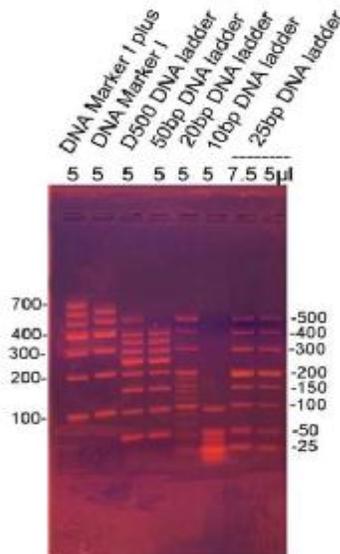
建议电泳条件: 凝胶浓度为 3%, 电泳电压 8-10 v/cm (单位电压指电泳槽阴阳极之间的距离电压, 如阴极阳极之间的距离为 20 cm, 可以用 160-200 V 电压进行稳压电泳), 待溴酚蓝指示前沿距离凝胶末端 2 cm 时终止电泳, 电泳时间 35-40 分钟。

琼脂糖浓度	电泳缓冲液	二甲苯菁	溴酚蓝	单位电压	凝胶长度	电泳时间
3%	1×TAE	~500 bp	~30 bp	8-10 V/cm	10 cm	40min+

2.3 观察条带。

注: 使用 EB 或 Goldview 染料时, 由于染料本身带正电荷较多, 随着电泳时间的延长, 染料会向阴极聚集, 导致小片段核酸结合的染料含量降低, 会出现小片段的 DNA 片段紫外灯下亮度变弱或不可见。此时可以将胶浸泡于含有染料的电泳缓冲液中染色 15-20 分钟即可看到小片段。使用 RealSafe 类染料可以直接观察条带。

2.4 实验示例:



3% 琼脂糖凝胶
电泳条件: 1×TAE 150V 45min
染色: RealSafe Red后染