



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-times.com.cn](http://www.real-times.com.cn)

E-mail: [real-times@163.com](mailto:real-times@163.com)

## 单链 DNA Marker（20-75 nt）非预混型

Ver760663-2.0

货号	名称	规格
RTM507	单链 DNA Marker（20-75 nt）非预混型	25 次

### ● 产品编号及规格：

货号	名称	规格	贮存
RTM507-01	单链 DNA Marker（20-75 nt）非预混型	62.5 $\mu$ l	-20 $^{\circ}$ C
DL080-01	2 $\times$ TBE 尿素上样缓冲液	1 ml	4 $^{\circ}$ C
DL112-01	2 $\times$ 非变性 PAGE DNA 上样缓冲液	1 ml	4 $^{\circ}$ C

### ● 产品简介：

单链 DNA Marker 由不同长度的单链 DNA 分子混合而成，7 条带的大小为 20，25，30，35，40，50，75 nt（注：条带大小为尿素变性电泳条件下的大小，非变性电泳条带有差异，参见实验示例 2）。该产品不含有上样缓冲液，可以根据实验需求使用不同的上样缓冲液，用于尿素变性电泳或非变性电泳。电泳后的 PAGE 胶可以使用单链 DNA PAGE 电泳染色试剂盒（Cat: RTS5103）或核酸染料如 RealSafe Red（货号：GR002）或 RealSafe All（货号：GR004）进行染色，均可以得到清晰的条带分离效果。

产品附带 2 $\times$ TBE 尿素上样缓冲液和 2 $\times$ 非变性 PAGE DNA 上样缓冲液，方便待检样品的上样。

配制好的即用型单链 DNA Marker 以每次上样 5  $\mu$ l 计算，该产品可以使用大约 25 次。

### ● 保存条件和运输：

按照标签温度贮存；有效期 2 年；湿冰运输。

### ● 使用方法：

#### 一. 即用型单链 DNA Marker（20-75 nt）配制方法：

##### 1.1 进行尿素变性电泳：

即用型单链 DNA Marker（20-75 nt）	配制体积 20 $\mu$ l
DNA Marker（20-75 nt）非预混型	10 $\mu$ l
2 $\times$ TBE 尿素上样缓冲液	10 $\mu$ l
	混匀，70 $^{\circ}$ C 处理 5 分钟

##### 1.2 进行非变性电泳：

即用型单链 DNA Marker（20-75 nt）	配制体积 20 $\mu$ l
DNA Marker（20-75 nt）非预混型	10 $\mu$ l
2 $\times$ 非变性 PAGE DNA 上样缓冲液	10 $\mu$ l
	混匀，不用加热处理

## 二. 凝胶制备:

注: 以下使用方法均以 8×10cm 凝胶 厚 1.0mm 示例, 其他规格凝胶请适当调整。

### 2.1 TBE-尿素凝胶制备:

2.1.1 可以选择 DNA 尿素 PAGE 电泳试剂盒 (Cat: RTE4102) 或按照以下程序制胶:

表一 TBE-尿素 PAGE 分离胶配方表 (总体积 5 ml, 适用于厚度 1.0 mm 小板胶)

单链 DNA 长度	最佳凝胶浓度	尿素 (克)	40%PAA (29:1)	10×TBE	补水到 总体积	10%APS	TEMED
200-1000 nt	5%	2.1 克	0.625 ml	0.5 ml	5 ml	50 μl	5 μl
50-400 nt	8%	2.1 克	1 ml	0.5 ml	5 ml	50 μl	5 μl
30-300 nt	10%	2.1 克	1.25 ml	0.5 ml	5 ml	50 μl	5 μl
10-150 nt	15%	2.1 克	1.875 ml	0.5 ml	5 ml	50 μl	5 μl
5-120 nt	20%	2.1 克	2.5 ml	0.5 ml	5 ml	50 μl	5 μl

2.1.2 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 1-5 cm 的水层, 使凝胶表面保持平整。

2.1.3 静置 10-20 分钟, 待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面后, 说明凝胶已聚合。

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。可以根据环境温度的不同调节 APS 的加入量。

2.1.4 去除覆盖在分离胶上的水层; 按照表二将不同体积成分在一个小烧杯中混合; 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-尿素 PAGE 4%浓缩配方表 (总体积 2 ml, 适用于 1.0mm 厚度胶)

各组份体积 (ml)						
凝胶浓度	尿素	40%PAA (29:1)	10×TBE	灭菌水	10%APS	TEMED
4%	0.84 克	0.2 ml	0.2 ml	补水至体 积 2 ml	20 μl	2 μl

2.1.5 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。

2.1.6 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。

### 2.2 非变性凝胶制备:

2.2.1 可以选择 DNA 非变性 PAGE 电泳试剂盒 (货号: RTE4101) 或按照以下程序制胶。

2.2.2 按照表三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。

2.2.3 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 1-5 cm 的水层, 使凝胶表面保持平整。

2.2.4 静置 10-20 分钟, 待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面后, 说明凝胶已聚合

表三 TBE-非变性 PAGE 分离胶配方表 (总体积 5 ml, 适用于厚度 1.0 mm 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：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。

2.2.5 去除覆盖在分离胶上的水层；按照表四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。

表四 TBE-非变性 PAGE 4%浓缩配方表 (总体积 1.5 ml, 适用于 1.0mm 厚度胶)

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

2.2.6 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。

2.2.7 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。

### 三. 样品制备：

根据实验目的，配制即用型单链 DNA Marker 样品（步骤一）。单链 DNA 样品使用尿素变性电泳，双链 DNA 样品使用非变性电泳，单链/双链混合样品使用非变性电泳。

### 四. 电泳：

4.1 上样：根据梳齿确定 Marker 上样量，一般是 10 齿 1mm 厚梳子上样 5  $\mu$ l，15 齿 1mm 厚梳子上样 3  $\mu$ l。

4.2 连接电源线，打开电源开关，按照以下条件电泳。

	恒电压	起始电流	结束电流	电泳时间
推荐电压	150-200 V	15-20 mA/板胶	10-15 mA/板胶	60+ min

4.3 根据上样缓冲液的溴酚蓝指示前沿位置大体判断条带分离位置，终止电泳后取出凝胶进行后续实验。

胶浓度	溴酚蓝	二甲苯菁
5%	~35 nt	~130 nt
8%	~19 nt	~75 nt
10%	~15 nt	~55 nt

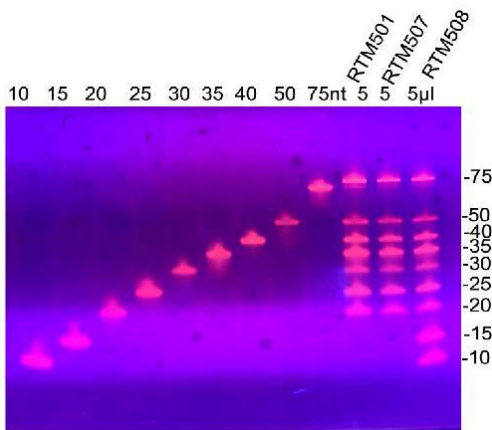
15%	~10 nt	~52 nt
20%	~8 nt	~35 nt

## 五. 染色:

用单链 DNA PAGE 电泳染色试剂盒 (Cat: RTS5103) 染色可以得到清晰的条带分离效果。注: 如果使用核酸染料染色, RealSafe Red (货号: GR002) 或 RealSafe All (货号: GR004) 核酸染料结合单链核酸效果最佳, 强烈建议使用以便获得最佳效果的胶图。其余染料如 GelRed, Goldview, EB 等染色效果不好。

## 六. 电泳示例:

### 6.1 使用 RealSafe Red 核酸染料 (货号: GR002) 染色:



#### 15%尿素变性胶分离单链 DNA

lane 1-9 为 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75 nt ssDNA 上样量为 0.5 µg

lane 10: RTM501, 单链 DNA Marker (20-75 nt) 预混型, 上样量 5 µl

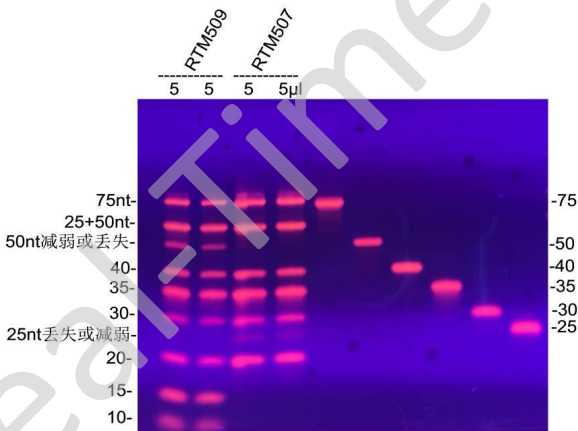
lane 11: RTM507, 单链 DNA Marker (20-75 nt) 非预混型, 配制后上样量 5 µl

lane 12: RTM508, 单链 DNA Marker (10-75 nt) 预混型, 上样量 5 µl

电泳条件: 1×TBE, 恒压 200 V 50 min

染色: RealSafe Red 后染 20min, 紫外激发

### 6.2 TBE 非变性变性电泳后使用 RealSafe Red 核酸染料 (货号: GR002) 染色:



RTM509和RTM507 TBE非变性电泳

样品: 分别取 RTM509-01 或 RTM507-01 加等体积 DL112-01 混合后上样

凝胶: 15%T3.3C TBE 非变性胶 (RTE4101)

电泳条件: 1×TBE 恒压 150 V 50 min

染色: RealSafe Red (GR002) 后染 20 min, 紫外激发

结果解析: 由于 50 nt 序列中有部分序列与 25 nt 存在互补, 在非变性条件下, 导致出现 25+50 nt 的部分互补条带, 25 nt 条带减弱或消失, 50 nt 条带减弱或消失