



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

25bp DNA ladder

Ver:760974-2.0

产品编号	产品名称	规格
RTM444	25bp DNA ladder	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:

本产品由 8 条双链 DNA 片段组成, 可作为 DNA Marker 用于聚丙烯酰胺凝胶电泳中 DNA 片段大小及含量的分析。8 条带的大小分别为 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 和 500 bp。其中 200 bp 条带为加亮带, 每次上样 5 μ L 时, 200 bp 加亮条带的 DNA 含量约为 100 ng, 其余各条带的 DNA 含量约为 50 ng。

本产品为双链 DNA Marker, 适用于非变性 PAGE 及琼脂糖凝胶电泳, 不适用于尿素变性 PAGE。由于 DNA 片段较小, 如采用琼脂糖凝胶电泳, 建议使用高分辨率琼脂糖。

按照每次上样 5 μ L 计算, 该产品可以使用 50 次。

● 贮存、效期及运输:

4 $^{\circ}$ C 贮存, 有效期 6 个月; -20 $^{\circ}$ C 贮存, 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。通用 SDS-PAGE 蛋白电泳用设备。

1.1.2 按照表一所示体积依次加入各组分并混匀, 最后加入 10% APS 和 TEMED, 轻轻混匀, 避免产生气泡。

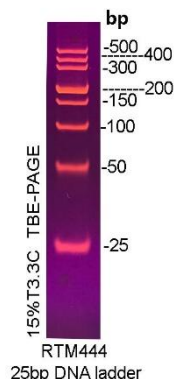
注: 对于本产品所包含的 25-500 bp DNA 片段, 推荐使用 15% TBE-PAGE 进行分离。

1.1.3 在凝胶玻璃板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 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 min, 待分离胶与乙醇层之间形成清晰界面后, 即表明分离胶已基本聚合。

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

DNA 分离范围	凝胶浓度	各组分体积 (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

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%APS 和 TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。

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

	各组份体积 (mL)				
凝胶浓度	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上，直至胶液接近前玻璃板顶端。插入梳子，注意避免产生气泡。

1.1.7 静置 30-60 分钟，待浓缩胶聚合。

注：凝胶聚合速度受环境温度影响：温度较高时聚合加快，温度较低时聚合时间延长。

1.2 电泳：

1.2.1 将凝胶板固定在电泳装置上，向上、下电泳槽中加入 1× TBE 电泳缓冲液，并用 1 mL 移液器吸头吸取电泳缓冲液冲洗加样孔 1-2 次。

1.2.2 取待测样品，按 5:1 的体积比加入 6× Native-PAGE DNA 上样缓冲液。例如，5 μL 样品加入 1 μL 上样缓冲液，混匀并短暂离心后，取 5-10 μL 上样。25 bp DNA ladder 已含上样缓冲液。对于 1 mm 厚、10 齿梳制备的凝胶，建议每孔直接上样 5 μL；使用其他厚度或不同齿数梳子时，可根据加样孔体积适当调整上样量。

1.2.3 连接电源线，打开电源开关。200 V 恒压电泳。当二甲苯菁指示前沿迁移至凝胶长度约 1/2 处时结束电泳，其迁移位置约相当于 50 bp DNA；此时溴酚蓝指示前沿接近凝胶下缘，其迁移位置约相当于 17 bp DNA。。

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：从玻璃板上取下凝胶后，用适量蒸馏水漂洗 3-5 min。

1.3.2 染色液配制：

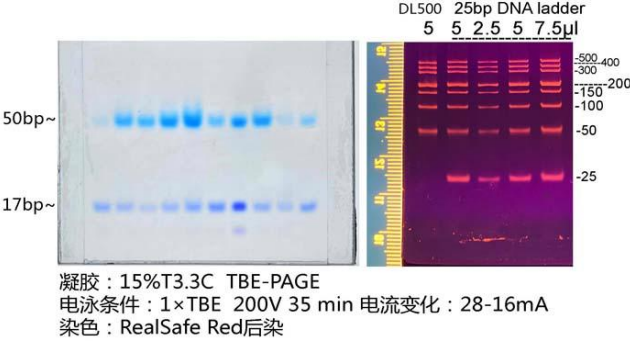
TBE-PAGE 凝胶可采用 RealSafe 类核酸染料进行电泳后染色。以下以 RealSafe Red 核酸染料（货号：GR002）为例。即用型 RealSafe Red 核酸染色液配制如下：

	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：

将凝胶完全浸没于即用型染色液中，室温避光，于摇床 40-60 rpm 染色 30 min。染色完成后，可使用紫外或蓝光凝胶成像仪观察条带。

1.4 实验示例：



二、 琼脂糖凝胶分离：

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 及 5 μL RealSafe Red 核酸染料，或加入适量其他核酸染料（如 EB、GoldView）。混匀，盖好瓶盖，使用微波炉中火加热至沸腾，取出后轻轻摇匀，必要时重复加热 1-2 次，直至琼脂糖完全溶解且无可见颗粒。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，按 5：1 体积加入 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：3%高分辨率琼脂糖凝胶，电场强度 8-10 V/cm。电场强度按电泳槽正、负电极之间的距离计算。例如，两电极间距为 20 cm 时，可采用 160-200 V 恒压电泳，当溴酚蓝指示前沿距凝胶下缘约 2 cm 时结束电泳，电泳时间 35-40 分钟。

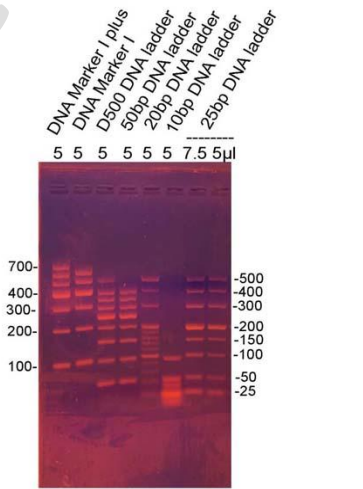
琼脂糖浓度	电泳缓冲液	二甲苯菁	溴酚蓝	单位电压	凝胶长度	电泳时间
3%	1×TAE	~500 bp	~30 bp	8-10 V/cm	10 cm	40min+

2.3 观察条带：

注：使用 EB 或 GoldView 等核酸染料进行预染时，随着电泳时间延长，部分染料可能发生与 DNA 迁移方向不同的电泳迁移，导致小片段 DNA 结合的染料量降低，从而使小片段条带的荧光强度减弱甚至难以观察。此时可将凝胶浸泡于含相应核酸染料的电泳缓冲液中染色 15-20 min，以增强小片段 DNA 条带信号。

使用 RealSafe 类染料时，可直接观察条带。

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