



RTM501

Ver. 740459

单链DNA Marker (20-75 nt)

产品编号及规格:

RTM501 25 T

产品组成:

货号	名称	规格
RTM501-01	单链DNA Marker (20-75 nt)	125 μ l
DL080-01	2 \times TBE尿素上样缓冲液	1 ml

贮存、效期及运输:

-20 $^{\circ}$ C 贮存; 有效期2年; 湿冰运输。

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。35 nt 浓度约为100 ng/ μ l, 其余条带浓度约为50 ng/ μ l。该产品已经含有上样缓冲液, 使用前70 $^{\circ}$ C处理5分钟后可以直接上样。该Marker适用于尿素变性胶电泳, 电泳后使用单链DNA PAGE电泳染色试剂盒 (Cat: RTS5103), 核酸PAGE电泳染色试剂盒 (Cat: RTS5102), 核酸快速高灵敏度染色试剂盒 (Cat: RTS5101) 或核酸染料如 RealSafe Red (货号: GR002) 或 RealSafe All (货号: GR004) 均可以得到清晰的条带分离效果。

按照每次上样5 μ l计算, 该产品可以使用约25次。产品内附带2 \times TBE尿素上样缓冲液 (Cat: DL080-01), 方便待检样品的上样。

使用说明:

一. 制胶:

1.1 参照凝胶模具说明书, 装配好凝胶模具。

1.2 按照表一将不同体积的成分在小烧杯中混匀, 随后加入10%APS和TEMED, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

注: 单链DNA Marker适用于配制20%TBE-尿素-PAGE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)

分离范围	胶浓度	组份体积					
		尿素	40% PAA	10 \times TBE	补水至	10%APS	TEMED
200-1000nt	5%	2.1克	0.625 ml	0.5 ml	5 ml	50 μ l	5 μ l
50-400 nt	8%	2.1克	1 ml	0.5 ml	5 ml	50 μ l	5 μ l
40-350 nt	10%	2.1克	1.25 ml	0.5 ml	5 ml	50 μ l	5 μ l
10-150 nt	15%	2.1克	1.875 ml	0.5 ml	5 ml	50 μ l	5 μ l
5-120 nt	20%	2.1克	2.5 ml	0.5 ml	5 ml	50 μl	5 μl

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催化剂的加入量。

1.3 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液 (对于8 \times 10cm凝胶, 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的水层, 使凝胶表面保持平整。

1.4 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, 说明分离胶已聚合。

1.5 去除覆盖在分离胶上的水层, 用滤纸吸干水分。

1.6 按照表二将不同体积成分在一个小烧杯中混匀, 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浓缩胶 (4%) 配方表
(总体积2 ml, 适用于厚度1.0 mm小板胶)

组份体积					
尿素	40% PAA	10 \times TBE	水补至	10% APS	TEMED
0.84克	0.2 ml	0.2 ml	2 ml	20 μ l	2 μ l

1.7 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。

1.8 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催化剂的加入量。

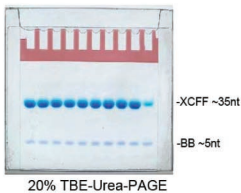
二. 电泳:

2.1 1 \times TBE电泳液配制: 取100 ml 5 \times TBE或50 ml 10 \times TBE, 加超纯水定容至500 ml, 即配成500 ml 1 \times TBE。向电泳槽上槽和下槽中加入足够1 \times TBE电泳液。用1ml吸头冲洗加样孔1-2次。

2.2 样品处理: 取适量体积单链DNA Marker样品(不用添加上样缓冲液), 70 $^{\circ}$ C处理5分钟; 待测样品与等体积的2 \times TBE尿素上样缓冲液混合, 70 $^{\circ}$ C处理5分钟, 冰浴制冷后待上样。单链DNA Marker 1 mm厚10齿梳子上样5 μ l, 其余梳齿和厚度凝胶适量调整上样量。

2.3 200 V稳压电泳, 至溴酚蓝指示前沿距离玻璃下沿1 cm时结束电泳 (如下图)。

恒电压	200 V
起始电流	15-20 mA/板胶
终止电流	10-15 mA/板胶
电泳时间	60+ min



三 染色:

用单链DNA PAGE电泳染色试剂盒 (Cat:RTS5103), 核酸PAGE电泳染色试剂盒 (Cat:RTS5102) 或核酸快速高灵敏度染色试剂盒 (Cat:RTS5101) 染色均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 (Cat:GR002) 或RealSafe All (Cat: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。

以下程序用RealSafe Red核酸染料(Cat:GR002)进行染色。

3.1 漂洗: 拆下凝胶后, 适量蒸馏水漂洗3-5分钟。

3.2 染色液配制:

TBE-尿素-PAGE胶使用RealSafe Red染料后染染色, 即用型染色液配制 (配制量: 100 ml)

即用型RealSafe Red核酸染色液	
1×TBE	100 ml
RealSafe Red核酸染料	10-20 μl

3.3 染色:

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。

3.4 观察:

紫外灯或蓝光仪上观察条带。

参考资料: DNA在PAGE中的有效分离范围

PAGE浓度 (w/v)	DNA有效分离范围		二甲苯菁	溴酚蓝	二甲苯菁	溴酚蓝
	双链 bp	单链 nt	染料迁移率(bp)*	染料迁移率(nt)**		
3.5%	1000-2000	750-2000	460	100	150	45
5%	80-500	200-1000	260	65	130	35
8%	60-400	50-400	160	45	75	19
10%	50-300	40-350	100	25	60	18
12%	40-200	30-300	70	20	55	17
15%	25-150	10-150	60	18	40	15
20%	6-100	5-120	45	15	35	5

* 染料迁移率相当于双链DNA片段粗略大小

**染料迁移率相当于单链DNA片段粗略大小

发表文章:

1. [2022 IF=3.5] Real-time detection of SARS-CoV-2 in clinical samples via ultrafast ligation-dependent RNA transcription amplification.

Author: Peng Zhang, Yang Li, Dongmei Zhang, Chao Shi

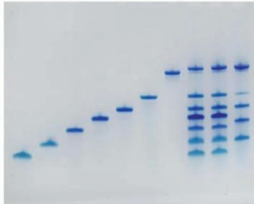
Journal: *Analytical Methods* 2023, 15,1915

Institution: Qingdao University

实验示例:

1. 使用单链DNA PAGE电泳染色试剂盒(Cat:RTS5103)染色:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



15% TBE-Urea-PAGE

1×TBE 200V 55min

lane 1-7 为20, 25, 30, 35,

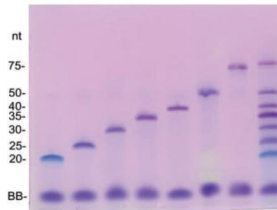
40, 50, 75nt ssDNA

上样量为1μg

lane 8, 9, 10 ssDNA Marker

上样量5 μl

2. 使用核酸PAGE电泳染色试剂盒(Cat:RTS5102)染色:



15%TBE-Urea-PAGE

lane 1-7 为20, 25, 30, 35,

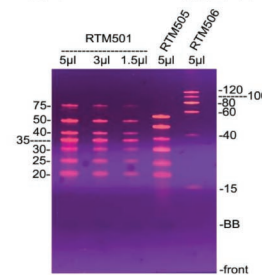
40, 50, 75nt ssDNA

上样量为1μg

lane 8 ssDNA Marker

上样量5 μl

3. 使用RealSafe Red核酸染料 (Cat:GR002) 染色:



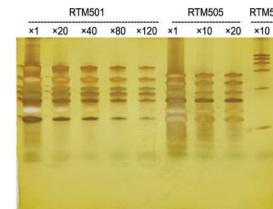
20% TBE-Urea-PAGE

1×TBE 200V 75min

RealSafe Red后染20min

紫外激发

4. 使用核酸快速高灵敏度染色试剂盒(Cat:RTS5101)染色:



20% TBE-Urea-PAGE

1×TBE 200V 62min

×表示稀释倍数

注: RTM501 25nt不能有效染色