天净沙系列

CAT#:211246

常温运输和保存

天净沙

非变性 PAGE 电泳试剂盒（DNA 用）

DNA Non-Denaturing PAGE Electrophoresis Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

在非变性 PAGE 中，DNA 的迁移率除跟长短相关外，还跟其构象和结合的蛋白质相关，因此 DNA 的非变性 PAGE 电泳是研究 SSCP-PCR（Single-strand Conformation Polymorphism-PCR、单链 PCR 片段构象多态性）和凝胶滞阻（Gel Shift）的重要研究手段。本产品就是专门用于 DNA 非变性 PAGE 的试剂盒，它具有下列特点:

1. 一站式，用户只需要准备去离子水和样品，不需要单独优化各种条件，十分方便。
2. 安全，免去了实验人员接触粉末状的有毒物品丙烯酰胺。
3. PAGE 电泳后可直接用于银染等后续试验。
4. 可以用于 SSCP 和 Gel-Shift 实验。
5. 本产品足够 30 次 mini PAGE 凝胶电泳。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分，大纸盒包装，常温运输和保存。

成份	编号	规格	包装
丙烯酰胺，电泳级	211237a	60 g	250 mL 棕色瓶
甲叉双丙烯酰胺，电泳级	100877	2 g	10 mL 棕色瓶
TBE 电泳液，10×	90313	250 mL	250 mL 本色瓶
TEMED	110-18-9	1.5 mL	2.0 mL 白盖管
过硫酸铵	100879	1 g	2.0 mL 绿盖管
使用手册	100205sc	1 份	1 份

本产品第二部分，logo 热封袋包装，低温运输，-20℃保存。

成份	编号	规格	包装
2×DNA 非变性 PAGE 上样液	900875	1.5 mL	2.0 mL 棕盖管

运输及保存

大纸盒常温运输，logo 热封袋低温运输，收到货后两部分的保存条件见上表，有效期一年。

自备试剂

去离子水、核酸银染试剂盒

使用方法

下面的操作步骤是以 SSCP-PCR 的非变性 PAGE 电泳为例，其他应用请相应修改相关参数。

1. PAGE 浓度的选择：根据 SSCP-PCR 和 Gel-Shift 的 DNA 长度选择 PAGE 凝胶的浓度。5%的 PAGE 的有效分辨范围为 80-500 bp、8%的 PAGE 的有效分辨范围为 60-400 bp、12%的 PAGE 的有效分辨范围为 40-200 bp。
2. 体积的选择：SSCP-PCR 检测需要长约 30-40 cm 的测序胶板，Gel-Shift

实验一般只使用长度为 8-10 cm 的 mini 凝胶，可以结合梳子的厚度，计算所需 PAGE 胶的体积。

3. 配制 PAGE 胶（下面以配制 100 mL PAGE 胶为例计算用量，配制更大体积的胶则需以此用量为基础按比例增加）：

A:新鲜配制 10%的 APS(过硫酸铵):称量约 0.1 g 硫酸铵干粉到一个 1.5 mL EP 管中，按每 0.1 克过硫酸铵干粉加 1 mL 自备去离子水的比例将水加到管中，摇晃到硫酸铵粉末全部溶解。配制好的 10%的 APS 溶液可以在 4℃存放一周，超过一周不能再用。

B：新鲜配制 30%的丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液（29:1）：将 2 g 甲叉双丙烯酰胺倒入到装有 60 g 丙烯酰胺的 250 mL 棕色塑料瓶中，天平上去皮，加入 146 mL 自备的去离子水，充分摇晃直到溶解（约需 10-20 分钟）。此溶液简称为 30% AB 溶液，最好在一个月内用完，4℃保存。

C：配 SSCP PAGE 胶：在一个 250 mL 的三角瓶中，先按下表的用量加入去离子水、30% AB 溶液和 10×TBE 电泳液。丙烯酰胺单体溶液具有神经毒性，一定要戴手套操作。

PAGE 胶浓度	各成分用量（单位：mL）			总体积（mL）
	去离子水	30% AB 溶液	10×TBE 电泳液	
5%	73.4	16.6	10.0	100
6%	70.0	20.0	10.0	100
7%	66.7	23.3	10.0	100
8%	63.3	26.7	10.0	100
9%	60.0	30.0	10.0	100
10%	56.7	33.3	10.0	100
11%	53.3	36.7	10.0	100
12%	50.0	40.0	10.0	100
注:有大量文献报道 PAGE 胶中加入 5%-10%的甘油能提高 SSCP 分析时某些位点的分辨率。如果选择加入 10%的自备甘油，则减少去离子水的用量 10 mL，同时加入 10 mL 甘油原液。				

D：摇晃混匀。最好能抽真空 10-15 分钟以去除溶液中的氧气（氧气能抑制丙烯酰胺聚合反应），无条件也可以不脱氧。

E：加入 500 μL 10% APS 和 100 μL TEMED，迅速摇匀后倒胶。

F：在 PAGE 胶的液面距离达到顶部时停止灌胶，插入梳子。

G：室温聚合 30-60 分钟（低温抑制聚合反应，故最好室温）。

	H：待 PAGE 胶凝固后拔出梳子，用 1×TEB 液冲洗加样孔。 I：放 4℃冰箱预冷 30 分钟-12 小时。为了防止 PAGE 胶收缩，最好在其顶部加少量 1×TBE 缓冲液。使用预冷的 PAGE 胶有利于单链 DNA 在电泳时保持其构型，这些构型靠 DNA 序列间的微弱的链内互补形成，对温度很敏感。温度越高，这些微弱相互作用越不稳定。 4. 将预冷后的 PAGE 凝胶板固定在电泳装置上，往上槽和下槽中加入足够 1×TEB 电泳液。 5. 取 3-5 μL SSCP-PCR 样品，加入等体积 2×DNA 非变性 PAGE 上样液，85℃处理 5 分钟后冰浴。用前短暂离心后取 2 μL 上样。上样量跟检测方法的灵敏度相关，上述上样量是针对核酸银染检测法。 6. 连接电源线，打开电源开关。如果 PAGE 中不含甘油，则使用 25 W 的功率，电泳 5-7 小时（对 3-40 cm 长的 PAGE 胶而言）。如果使用含甘油的 PAGE，则使用 8 W 的功率，电泳 16-18 小时。由于温度变化过大会改变 DNA 构型，所以电泳时最好能保持恒温。对不含甘油的 PAGE，最好恒温在 4℃、对含甘油的 PAGE，最好恒温在 25℃。 1. 终止电泳，取出凝胶进行后续的银染处理。不建议使用灵敏度低于银染的方法，因为 SSCP 异构体的数量都比较少，一般方法没法检测到。
疑难解答	一、为何 SSCP-PCR 带型有复合条带? 原因之一：可能是残留的 PCR 引物跟单链的 DNA 结合形成迁移率不同的条带。解决方法是稀释 PCR 或电泳前将 PCR 产物进行纯化。原因之二：可能是 PCR 产物用量过高，彼此复性。解决办法是将 PCR 产物稀释后 4-8 倍后使用。 二、如何提高电泳分辨率? 可以在配胶时加入甘油（终浓度为 5%-10%），因为甘油是弱变性剂，能部分展开 DNA 折叠结构，增加表面积，增加电泳时位移差异。但加入甘油后粘性变大，电泳速度变慢，因此只适合室温电泳使用，不要 4℃电泳。如果条件允许，最好同时做加甘油和不加甘油的电泳实验。
关联试剂	核酸银染试剂盒