天净沙系列

CAT#:220528

常温运输和保存，有一低温成份

天净沙

DNA 尿素-PAGE 变性电泳试剂盒

DNA Urea-PAGE Denaturing 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

本产品是专门用于 DNA 尿素-PAGE 变性电泳的试剂盒，它具有下列特点:

1. 一站式，即开即用，用户不需单独准备各种成分，十分方便。
2. 安全，免去了实验人员接触粉末状的剧毒物品丙烯酰胺。
3. 可用于 DNA 测序、AFLP、DDRT、TGGE 和 RNase 保护实验等。
4. 电泳后可直接用于银染、EB 染色等实验。
5. 本产品足够 30 次 mini 尿素-PAGE 胶（10 cm×10 cm）实验。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分为大纸盒包装，常温运输

成份	编号	规格	包装材料
尿素	100873	105 g×2	250 mL 本色瓶
丙烯酰胺：甲叉双丙烯酰胺 (29:1)，电泳级	220528a	60 g	250 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	220528sc	1 份	1 份

本产品第二部分为塑料袋包装，低温运输

成份	编号	规格	包装材料
2×尿素-PAGE 变性胶上样液	900874	1.5 mL	2.0 mL 红盖管

运输及保存

常温运输，保存条件见上表，有效期一年。

自备试剂

去离子水。

使用方法

使用前需确保 TBE 电泳液，10×无结晶，如出现结晶可 65 摄氏度水浴加热溶解后再使用。

一、PAGE 浓度和交联度的选择指南

1. 尿素-PAGE 变性胶一般使用 29：1（丙烯酰胺：甲叉双丙烯酰胺）的交联度，在此交联度的条件下，DNA 片段长度和最适 PAGE 浓度对应关系如下:

单链 DNA 长度	最佳 PAGE 浓度	二甲苯青 FF 迁移率对应的 DNA 长度	溴酚蓝 迁移率对应的 DNA 长度
50-400 nt	8%	160 nt	45 nt
200-1000 nt	5%	260 nt	65 nt
750-2000 nt	3.5%	460 nt	100 nt

二、 制备尿素-PAGE 变性胶

此处以配制 100 mL 尿素-PAGE 变性胶为例，如果配制体积不同，则各成分用量需要按比例调整。

2. 新鲜配制 10%的 APS（过硫酸铵）：按每 0.1 克过硫酸铵干粉加 1 mL 去离子水的比例将水加到装有硫酸铵干粉的 1.5 mL EP 管中，摇晃到粉末全部溶解。配制好的 10%的 APS 溶液可以在 4℃存放一周，超过一周必须弃之不用。
3. 配制 40%的丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液（29：1，简称 AB 溶液，下同）：在装有丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺干粉的 250 mL 棕色塑料瓶中加入 120 mL 自备的去离子水，颠倒摇晃溶解后，即得 40%的 AB 溶液。注意：丙烯酰胺单体溶液具有神经毒性，一定要戴手套操作。
4. 配尿素-PAGE 变性胶：在一个干净的 250 mL 玻璃三角瓶中，按下表的用量加入各成分。注意：丙烯酰胺单体溶液具有神经毒性，一定要戴手套操作。

需要配制的 PAGE 胶浓度	所需各成分的用量			补水到
	尿素	40%AB 溶液	10×TBE 缓冲液	
5%	42 克	12.5 mL	5.0 mL	100 mL
6%	42 克	15.0 mL	5.0 mL	100 mL
7%	42 克	17.5 mL	5.0 mL	100 mL
8%	42 克	20.0 mL	5.0 mL	100 mL
9%	42 克	22.5 mL	5.0 mL	100 mL
10%	42 克	25.0 mL	5.0 mL	100 mL
11%	42 克	27.5 mL	5.0 mL	100 mL
12%	42 克	30.0 mL	5.0 mL	100 mL

5. 搅拌直到所有成分溶解，然后用滤纸过滤。
6. 抽真空 10-15 分钟以去除溶液中的氧气，因为氧气能抑制丙烯酰胺聚合反应。无条件抽真空也可以跳过此步。
7. 加入 500 μL 10%APS 和 100 μL TEMED 后，迅速摇匀后灌胶。
8. 在 PAGE 胶的液面距离达到顶部时停止灌胶，插入梳子。
9. 室温聚合 30-60 分钟。不能放低温，低温会抑制聚合反应。
10. 拔出梳子，用 0.5×TEB 液冲洗加样孔。

三、DNA 样品的准备

11. 对一般样品、测序样品、微卫星 DNA、AFLP 样品、DDRT 样品、RPA 样品：将样品跟 2×尿素-PAGE 上样液 1:1 混合，95℃ 3 分钟变性，然后放冰上待用。

	12. 对 TGGE 样品：可以不加上样液直接放冰上待用。 **四：电泳** 13. 将凝胶板固定在电泳装置上，往上槽和下槽中加入足够 0.5×TEB 电泳液。 14. 预电泳 30 分钟，使得 PAGE 胶发热后，将冰上放置的样品上样。 15. 连接电源线，打开电源开关。根据胶的大小选择固定功率进行电泳。固定功率等于固定产热，这样就不容易发生过热而发生 PAGE 胶板破裂的现象。如果固定电流或电压，产热将随电泳时间而变化，不好控制。对小胶一般用 5-6W 的固定功率，大胶用 15-25W 的固定功率。 16. 终止电泳，取出凝胶进行后续的处理（如银染）。注意：如果银染，必须延长固定时间以便让洗出尿素，否则胶中残留的尿素会严重干扰后面的银染。
关联产品	核酸银染试剂盒