天净沙系列

CAT#:220954-30
常温运输和保存
但有三个低温成分

天净沙

乙酸-尿素-PAGE 电泳试剂盒

AU-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

本产品专门用于乙酸-尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Acetic Acid-Urea-PAGE，AU-PAGE，乙酸-尿素-PAGE），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. 采用不连续胶系统，分辨率高，能有效分离只有一个修饰基团不同的组蛋白。
3. 使用光激发剂，故不需要进行长时间的预电泳。
4. 适用于分离等电点偏碱性的各种碱性蛋白，如嗜中性防御素、酪氨酸酶 、鱼精蛋白、组蛋白以及这些碱性蛋白的各种修饰形式（如乙酰化、泛素化等）。
5. 电泳后可直接用于考染、银染、Western 杂交等实验。
6. 本产品足够 30 次 0.1 cm×14 cm×14 cm 大小的 AU-PAGE。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

AU-PAGE 第 1 部分，编号 220954pt1，大扁盒包装，常温运输和保存

成份	编号	规格	包装
甲叉双丙烯酰胺干粉	110-26-9	2.5 g	5 mL 本色瓶
TEMED	110-18-9	10 mL	10 mL 棕色瓶
氨水	1336-21-6	10 mL	10 mL 本色瓶
尿素	57-13-6	250 g×2	500 mL 本色瓶
pH 指示剂	220954b	1 mL	1.5 mL 棕色管
使用手册	220954sc	1 份	无

AU-PAGE 第 2 部分，编号 220954pt2，大扁盒包装，常温运输和保存

成份	编号	规格	包装
丙烯酰胺干粉	79-06-1	150 g	250 mL 棕色瓶
乙酸	64-19-7	250 mL	250 mL 本色瓶
10×AU-PAGE 电泳缓冲液	220954a	250 mL	250 mL 本色瓶

AU-PAGE 第 3 部分，编号 220954pt3，塑料袋包装，低温运输，-20℃保存

成份	编号	规格	包装
光激发剂	220954c	10 mL	10 mL 棕色瓶
上样液成分 1	220954d	1 g	1.5 mL 白盖管
AU-PAGE 电泳示踪剂	220954e	1 mL	1.5 mL 棕色管

运输及保存

常温运输和保存，但塑料袋包装的成分需要低温运输，-20℃保存。有效期一年

自备试剂

去离子水、透析袋（去除样本中的盐离子用）

使用方法

一：试剂和样本准备工作

1. 60%丙烯酰胺母液：加 160 mL 自备去离子水到装有丙烯酰胺干粉的 250 mL 棕色瓶中，终于体积为 250 mL。充分摇晃溶解（不能加热）。一次没用完的本溶液可以放 4℃长期保存。
2. 2.5%甲叉双丙烯酰胺母液：加 100 mL 自备去离子水到装有甲叉双丙烯酰胺干粉的 120 mL 本色瓶中，摇晃溶解（不能加热）。没用完的需 4℃保存。
3. 8 M 尿素母液：用本试剂盒提供的尿素干粉和自备的去离子水配制 8 M 的尿素母液。如果配制 10 mL，则将 4.8 g 尿素溶于少量水中，最后定容到 10 mL。没用完的本溶液需放-20℃保存，避免产生氰酸根离子。
4. 待电泳的蛋白样本必须没有离子，故最好先用 3500 Da 截留的透析袋在 2.5%乙酸溶液中充分透析，然后分装成 5-50 μg/管，冷冻抽干。也可以用三氯乙酸沉淀，丙酮洗涤去盐离子。本试剂盒不提供相关试剂。

二：PAGE 胶的配制（整个过程在常温操作，不能在低温操作）

5. 下表是配制 0.1 cm×14 cm×14 cm 大小 PAGE 胶所需各成分的用量。由于常见的碱性蛋白组蛋白和鱼精蛋白分子量都比较小，因此需用 4%的浓缩胶浓度和 15%的分离胶浓度。若胶大小变化或者碱性蛋白分子量较大，所配制的胶的体积和浓度需要相应调整。在两个容器中分别加入下列成分:

成分	15%分离胶	4%浓缩胶
60%丙烯酰胺溶液	8.6 mL	0.67 mL
2.5%甲叉双丙烯酰胺溶液	1.4 mL	0.64 mL
乙酸	2.1 mL	0.57 mL
尿素	16.8 g	4.8 g
加去离子水到	加到 33 mL	加到 9.3 mL

6. 灌分离胶：按上表配制分离胶，将溶液摇晃混匀，然后用真空泵接上管子抽真空 15 分钟去除溶液中的氧气，然后加入 125 μL 氨水、175 μL TEMED 和 2.38 mL 光激发剂，迅速摇匀并灌胶，在分离胶的液面距离胶板顶部 5 cm 的时候，停止灌胶。加入 1 mL 去离子水。由于分离胶比重较大，水将覆盖分离胶并使得胶面平整。将胶板放在强光下（如看 X 光片的灯箱前）促进光激发剂活动。室温聚合 30-60 分钟。凝固后倒出水，插入梳子。
7. 灌浓缩胶：按上表配制分离胶，将溶液摇晃混匀，然后用真空泵接上管子抽真空 15 分钟去除溶液中的氧气，加入 35 μL 氨水、50 μL TEMED 和 650 μL 光激发剂，迅速摇匀并灌胶。将胶板放在明亮处，促进光激发剂活动。室温聚合 30-60 分钟。浓缩胶的高度有 1 cm-2 cm 即可。

三：电泳（整个过程在常温操作，不能在低温操作）

	8. 在等待胶凝固的过程中，配制上样液：在 1.5 mL 塑料离心管中，加入 7.7 mg 上样液成分 1，0.9 mL 8 M 尿素母液，50 μL pH 指示剂，50 μL 氨水。混匀后即得上样液。上样液只能现配现用，没有用完的不需要保留。 9. 浓缩胶凝固后，拔出梳子，取出胶下面的隔条，将胶板上架到电泳槽上。先在下槽加入 1×AU-PAGE 电泳缓冲液。上槽的电泳缓冲液待上样后再加。 （注：1×AU-PAGE 电泳缓冲液由本试剂盒提供的 10×AU-PAGE 电泳缓冲液稀释而来，在 1 倍体积的 10×AU-PAGE 电泳缓冲液中加入 9 倍体积的去离子水，混匀后即可。1×AU-PAGE 电泳缓冲液可以重复使用 3 次） 10. 在第 4 步制备的冷冻干燥的蛋白样本中每管加入上步制备的上样液 40 μL，室温溶解 5 分钟。为避免尿素修饰蛋白，溶解时间不要超过 5 分钟。如果加入样本后，溶液不是粉红色，则表示蛋白样本中有残留乙酸使得 pH 过低，蛋白溶解不充分，需要补加氨水调到颜色变成粉红色，恢复碱性。 11. 上样前每管补加 2.5 μL 乙酸进行酸化，再加 2 μL AU-PAGE 电泳示踪剂，补水到总体积为 50 μL（补水多少取决于第 10 步加入了多少氨水调 pH）。 12. 将 50 μL（含 5-50 μg 总蛋白质）全部上样，多余的加样孔中要加入空白样本（40 μL 上样液+2.5 μL 乙酸+2 μL AU-PAGE 电泳示踪剂+5.5 μL 去离子水）以平衡电泳时各加样孔的盐离子浓度。 13. 小心在上槽加满新鲜配制的 AU-PAGE 电泳液。加入了 AU-PAGE 电泳液后的凝胶必须立即使用，不得放置。 14. 接上电源线。注意 AU-PAGE 的电泳方法跟 SDS-PAGE 相反，故正极需要接到上槽，负极需要接到下槽。碱性蛋白在电泳体系中带正电，向负极移动。 15. 固定电压到 300 V 电泳，如果是小的胶，可以固定电压到 250 V 电泳。在电泳过程中电流将逐渐降低。整个过程在常温操作，不能在低温操作。 16. 当电泳示踪剂快到胶的边缘时停止电泳。 17. 对 AU-PAGE 胶进行考染（本试剂盒不含考染相关试剂）：将 5 g 考马斯亮蓝 R-250 溶解在 500 mL 脱色液（20%甲醛，7%乙酸）中，如果有不溶解的颗粒可以过滤去除，放入 AU-PAGE 胶后摇晃 1 小时。然后在脱色液（20%甲醛，7%乙酸）中脱色直到调条带显现。注意：常见的碱性蛋白 Histone 和鱼精蛋白分子量都比较小，故不能使用固定步骤。
关联产品	Blue-Native PAGE 电泳试剂盒