

天
净
沙
系
列

CAT#:211246-30
常温运输和保存

BINGENE

非变性 PAGE 电泳试剂盒 (DNA 用)

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

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）和凝胶阻滞（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。 <table><tr><td>成份</td><td>编号</td><td>规格</td><td>包装材料</td></tr><tr><td>丙烯酰胺，电泳级</td><td>211237a</td><td>60 g</td><td>250mL 棕色瓶</td></tr><tr><td>甲叉双丙烯酰胺，电泳级</td><td>100877</td><td>2g</td><td>10mL 棕色瓶</td></tr><tr><td>TBE 电泳液，10×</td><td>90313</td><td>250 mL</td><td>250mL 本色瓶</td></tr><tr><td>TEMED</td><td>110-18-9</td><td>1.5 mL</td><td>2.0 mL 白色盖</td></tr><tr><td>过硫酸铵</td><td>100879</td><td>1 g</td><td>2.0 mL 绿色盖</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>100205sc</td><td>1 份</td><td>常温</td></tr></table> 本产品第二部分，塑料袋包装，低温运输，-20℃保存。 <table><tr><td>成份</td><td>编号</td><td>规格</td><td>包装材料</td></tr><tr><td>2×DNA 非变性 PAGE 上样液</td><td>100875</td><td>1.5 mL</td><td>2.0mL 棕盖管</td></tr></table>				成份	编号	规格	包装材料	丙烯酰胺，电泳级	211237a	60 g	250mL 棕色瓶	甲叉双丙烯酰胺，电泳级	100877	2g	10mL 棕色瓶	TBE 电泳液，10×	90313	250 mL	250mL 本色瓶	TEMED	110-18-9	1.5 mL	2.0 mL 白色盖	过硫酸铵	100879	1 g	2.0 mL 绿色盖	使用手册	100205sc	1 份	常温	成份	编号	规格	包装材料	2×DNA 非变性 PAGE 上样液	100875	1.5 mL	2.0mL 棕盖管
成份	编号	规格	包装材料																																					
丙烯酰胺，电泳级	211237a	60 g	250mL 棕色瓶																																					
甲叉双丙烯酰胺，电泳级	100877	2g	10mL 棕色瓶																																					
TBE 电泳液，10×	90313	250 mL	250mL 本色瓶																																					
TEMED	110-18-9	1.5 mL	2.0 mL 白色盖																																					
过硫酸铵	100879	1 g	2.0 mL 绿色盖																																					
使用手册	100205sc	1 份	常温																																					
成份	编号	规格	包装材料																																					
2×DNA 非变性 PAGE 上样液	100875	1.5 mL	2.0mL 棕盖管																																					
运输及保存	大纸盒常温运输，塑料袋低温运输，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 80-500bp、8%的 PAGE 的有效分辨范围为 60-400bp、12%的 PAGE 的有效分辨范围为 40-200bp。																																							

2. 体积的选择: SSCP-PCR 检测需要长约 30-40cm 的测序胶板, Gel-Shift 实验一般只使用长度为 8-10cm 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 克硫酸铵干粉到一个 1.5 mL EP 管中, 按每 0.1 克过硫酸铵干粉加 1mL 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 2g 甲叉双丙烯酰胺倒入到装有 60g 丙烯酰胺的 250mL 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, 最好在一个月内存用, 4℃ 保存。

C: 配 SSCP PAGE 胶: 在一个 250mL 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。

C: 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。

	D: 加入 500uL 10%APS 和 100uL TEMED, 迅速摇匀后倒胶。 E: 在 PAGE 胶的液面距离达到顶部时停止灌胶, 插入梳子。 F: 室温聚合 30-60 分钟 (低温抑制聚合反应, 故最好室温)。 G: 待 PAGE 胶凝固后拔出梳子, 用 1×TEB 液冲洗加样孔。 H: 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 uL 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 uL 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 25W 的功率, 电泳 5-7 小时 (对 3-40cm 长的 PAGE 胶而言)。如果使用含甘油的 PAGE, 则使用 8W 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