

天
净
沙
系
列

CAT#:220528-30

常温运输

BINGENE

DNA 尿素-PAGE 变性电泳试剂盒

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: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

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 (10cm×10cm) 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 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>尿素</td><td>100873</td><td>105g×2</td><td>250mL 本色瓶</td></tr><tr><td>丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 (29:1), 电泳级</td><td>220528a</td><td>62g</td><td>250mL 棕色瓶</td></tr><tr><td>TBE 电泳液, 10×</td><td>90313</td><td>250mL</td><td>250mL 本色瓶</td></tr><tr><td>TEMED</td><td>110-18-9</td><td>1.5 mL</td><td>2.0mL 白盖管</td></tr><tr><td>过硫酸铵</td><td>100879</td><td>1 g</td><td>2.0mL 绿盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>220528sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table> 本产品第二部分为塑料袋包装, 低温运输 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×尿素-PAGE 变性胶上样液</td><td>900874</td><td>1.5 mL</td><td>2.0mL 红盖管</td></tr></table>	成份	编号	规格	包装材料	尿素	100873	105g×2	250mL 本色瓶	丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 (29:1), 电泳级	220528a	62g	250mL 棕色瓶	TBE 电泳液, 10×	90313	250mL	250mL 本色瓶	TEMED	110-18-9	1.5 mL	2.0mL 白盖管	过硫酸铵	100879	1 g	2.0mL 绿盖管	使用手册	220528sc	1 份	无	成份	编号	规格	包装材料	2×尿素-PAGE 变性胶上样液	900874	1.5 mL	2.0mL 红盖管
成份	编号	规格	包装材料																																		
尿素	100873	105g×2	250mL 本色瓶																																		
丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 (29:1), 电泳级	220528a	62g	250mL 棕色瓶																																		
TBE 电泳液, 10×	90313	250mL	250mL 本色瓶																																		
TEMED	110-18-9	1.5 mL	2.0mL 白盖管																																		
过硫酸铵	100879	1 g	2.0mL 绿盖管																																		
使用手册	220528sc	1 份	无																																		
成份	编号	规格	包装材料																																		
2×尿素-PAGE 变性胶上样液	900874	1.5 mL	2.0mL 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	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: <table><tr><th>单链 DNA 长度</th><th>最佳 PAGE 浓度</th><th>二甲苯青 FF 迁移率对应的 DNA 长度</th><th>溴酚蓝 迁移率对应的 DNA 长度</th></tr><tr><td>50-400 nt</td><td>8%</td><td>160 nt</td><td>45 nt</td></tr><tr><td>200-1000 nt</td><td>5%</td><td>260 nt</td><td>65 nt</td></tr><tr><td>750-2000 nt</td><td>3.5%</td><td>460 nt</td><td>100 nt</td></tr></table> 二、制备尿素-PAGE 变性胶	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																				
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																																		

此处以配制 100mL 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 1mL 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 250mL 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	12.5mL	5.0 mL	100mL
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 500uL 10%APS 和 100uL 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