

天
净
沙
系
列

CAT#:100205-30
常温运输保存

TIANDZ

一站式 DNA 非变性 PAGE 电泳套装
One-Stop Native PAGE Pack

使用手册 V1.3

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506
网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>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, 因为在非变性 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。本产品就是专门用于非变性 PAGE 的试剂, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 一站式, 用户只需要准备去离子水和样品, 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. PAGE 电泳后可直接用于银染等后续试验。 																															
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="432 622 1394 1070"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>大纸盒包装</th> <th>保存</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺 (29:1)</td> <td>100876</td> <td>60 g (250mL 棕色塑料瓶)</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>TEMED</td> <td>100880</td> <td>1.5 mL (棕色管)</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>过硫酸铵 (干粉)</td> <td>100879</td> <td>1 g</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>DNA 非变性 PAGE 上样液</td> <td>100875</td> <td>1.5 mL</td> <td>-20℃</td> </tr> <tr> <td>10×TBE</td> <td>90313</td> <td>250 mL</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>100205sc</td> <td>1 份</td> <td>常温</td> </tr> </tbody> </table> <p>注: TEMED 和过硫酸铵 (干粉) 放一个热封袋, DNA 非变性 PAGE 上样液放另一个热封袋, 低温单独存放。</p>				成份	编号	大纸盒包装	保存	丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺 (29:1)	100876	60 g (250mL 棕色塑料瓶)	常温	TEMED	100880	1.5 mL (棕色管)	常温	过硫酸铵 (干粉)	100879	1 g	常温	DNA 非变性 PAGE 上样液	100875	1.5 mL	-20℃	10×TBE	90313	250 mL	常温	使用手册	100205sc	1 份	常温
成份	编号	大纸盒包装	保存																													
丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺 (29:1)	100876	60 g (250mL 棕色塑料瓶)	常温																													
TEMED	100880	1.5 mL (棕色管)	常温																													
过硫酸铵 (干粉)	100879	1 g	常温																													
DNA 非变性 PAGE 上样液	100875	1.5 mL	-20℃																													
10×TBE	90313	250 mL	常温																													
使用手册	100205sc	1 份	常温																													
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输, 收到货后各成分的保存条件见上表, 有效期一年。</p>																															
<p>自备试剂</p>	<p>去离子水、核酸银染试剂盒</p>																															
<p>使用方法</p>	<p>用于 SSCP-PCR 分析的非变性 PAGE 电泳 (其他应用请相应修改参数)</p> <p>一、PAGE 浓度的选择: 最好使用浓度为 5-12% 的丙烯酰胺胶, 因为 SSCP-PCR 的扩增长度一般在 150-200bp 之间, 而 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。</p> <p>二、体积的选择: SSCP-PCR 检测需要长约 30-40cm 的测序胶板, 可以结合梳子的厚度, 计算所需 PAGE 胶的体积。</p> <p>操作:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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) <p>A: 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。</p>																															

B: 新鲜配制 30%的丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液 (29:1 的 AB 溶液, 下同): 在本产品提供的装有 60g 丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺干粉的 250mL 棕色塑料瓶中加入 146 mL 自备的去离子水, 充分摇晃直到溶解 (约需 10-20 分钟), 即得到 30%的 AB (29:1) 溶液。此溶液最好在一个月内用完, 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 缓冲液。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 缓冲液	
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 序列间的链内互补形成, 对温度很敏感。

2. 将预冷的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

	<p>泳液。</p> <p>3. 取 3-5 uL SSCP-PCR 样品，加入等体积 2×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。</p> <p>4. 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℃。</p> <p>5. 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。</p>
<p>疑难解答</p>	<p>一、为何 SSCP-PCR 带型有复合条带？</p> <p>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。</p> <p>二、如何提高电泳分辨率？</p> <p>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。</p>
<p>关联试剂</p>	<p>核酸银染试剂盒（CAT#: 81104）</p>