

DNA 尿素变性 PAGE 电泳套装（可配置 8%的胶 1000mL）

使用说明书

产品编号：SK0502

储存条件：Acr-Bis 溶液和上样液短期 4℃保存，长期-20℃保存，有效期 2 年。

产品组成：

Components	SK0502	保存条件
40%Acr-Bis (29:1)	100 mL×2	2-8℃
APS（过硫酸铵）	5×0.1 g	RT
TEMED	1 mL	RT/避光
2×尿素-PAGE 上样液	1 mL	2-8℃
10×TBE 电泳缓冲液	125 mL×2	RT
尿素（超纯）	210g	RT
说明书	1 份	

注意：过硫酸铵（APS）为固体粉末，使用前配制成 10% APS 溶液（0.1 g APS 加 1mL 双蒸水）。APS 溶液最好现配现用，通常 4℃可保存一周，-20℃能保存半年。

操作步骤：

用于 SSCP-PCR 分析的非变性 PAGE 电泳（其他应用请相应修改参数）

一、PAGE 浓度和交联度的选择指南

1. 尿素-PAGE 一般推荐用 29: 1（丙烯酰胺：甲叉双丙烯酰胺）的交联度，在此条件下，DNA 片段和最佳 PAGE 浓度对应关系如下：

单链 DNA 长度	最佳 PAGE 浓度	二甲苯青 FF 迁移率对应的长度	溴酚蓝的迁移率对应的长度
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、胶制备尿素-PAGE 胶（参照附表）

1. 参照附表的配置合适浓度的 PAGE 胶，摇晃混匀。
2. 将配置好的胶倒入胶板，在胶的液面距离达到顶部时停止灌胶，插入梳子。
3. 室温聚合 30-60 分钟（低温抑制聚合反应，故最好室温）。
4. 待胶凝固后拔出梳子，用 $0.5 \times$ TBE 液冲洗加样孔。

三、样品处理

对一般样品、测序样品、微卫星 DNA、AFLP 样品、DDRT 样品、RPA 样品：将样品跟上样液 1:1 混合， 95°C 3 分钟变性，然后放冰上待用；对 TGGE 样品：可以直接上样。

四、电泳

1. 将凝胶板固定在电泳装置上，往上槽和下槽中加入足够 $0.5 \times$ TEB 电泳液。
2. 预电泳 5-30 分钟后，将冰上放置的样品上样。
3. 连接电源线，打开电源开关。根据胶的大小选择功率（固定功率可以固定产热，这样不容易发生过热而使胶板破裂的现象。如果固定电流或电压，产热都将随电泳时间而变化，不好控制）。对小胶一般用 5-6W 固定功率，大胶用 15-25W 固定功率。
4. 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洗出尿素，否则残留尿素会干扰后面的银染。

注意事项：

1. APS 溶液不稳定，每次取用后立即放回冰箱，以防失效；若发现凝胶聚合时间延长，应考虑更换 10% APS。
2. PAGE 凝胶的凝聚速度与温度以及 APS、TEMED 的用量密切相关；可通过改变 APS 及 TEMED 的用量，控制 PAGE 凝胶的聚合速度，凝胶聚合过快不利于操作。
3. 在凝胶配制过程中，尤其是液体混匀步骤，应尽量避免气泡的产生。
4. 丙烯酰胺具有神经毒性，操作时请穿戴实验服和一次性手套。

附表：（单位：尿素 g，其余为 mL）

胶浓度	胶体积	40%Acr-Bis (29:1)	10×TBE	尿素	10%APS	TEMED	双蒸水
5%	100mL	12.5	5-10	42	0.5	0.1	73.4-68.4
6%	100mL	15.0	5-10	42	0.5	0.1	70.0-65.0
7%	100mL	17.5	5-10	42	0.5	0.1	66.7-61.7
8%	100mL	20.0	5-10	42	0.5	0.1	63.3-58.3
9%	100mL	22.5	5-10	42	0.5	0.1	60.0-55.0
10%	100mL	25.0	5-10	42	0.5	0.1	56.7-51.7
11%	100mL	27.5	5-10	42	0.5	0.1	53.3-48.3
12%	100mL	30.0	5-10	42	0.5	0.1	50.0-45.0

