



# 中科瑞泰

Ver. 720572

## DNA非变性PAGE电泳试剂盒 DNA Native PAGE Electrophoresis Kit

### 产品编号及规格:

RTE4101 45板(0.75 mm胶)

### 产品组成:

货号	名称	规格	贮存
AC2913-01	30%PAA(29:1)	100 ml	4℃
TB001	5×TBE	500 ml	RT
AP020P	10% APS (干粉)	5 ml	RT (配制后-20℃贮存)
TA0761-01	TEMED	0.5 ml	4℃, 避光
DL070	6×Native-PAGE DNA上样缓冲液	1 ml	4℃

本产品常温运输, 按照标签温度贮存; 有效期一年。

### 产品简介:

非变性 PAGE 电泳是研究DNA构象变化的常用手段, 在非变性条件下, DNA的泳动与电荷、片段大小、DNA结合的蛋白及折叠构象都有关系。非变性PAGE电泳是研究单链 PCR片段构象多态性 (SSCP-PCR, single-strand conformation polymorphism-PCR) 的重要研究手段。在SSCP测定中, 双链DNA (dsDNA) 变性为单链DNA (ssDNA), 每一条单链DNA都基于他们的内部序列呈现不同的折叠构象, 即使相同长度的单链DNA因其碱基顺序不同, 甚至单个碱基的不同都会形成不同的构象。这些不同构象的ssDNA在非变性PAGE中得到分离。另外, 非变性PAGE还可以分离小片段的双链DNA, 与琼脂糖电泳相比, 对低于500 bp的双链DNA片段有更好的分辨率。

本公司提供的DNA非变性PAGE电泳试剂盒包含凝胶制备及电泳所需的全部试剂, 用户只需自备制胶器具和蒸馏水, 即可配制各种浓度的PAGE胶, 使用方便。

本试剂盒可以配制20-45块常规大小 (8×10cm) PAGE凝胶, 具体数量根据凝胶厚度决定: 0.75mm厚度凝胶可以配制45块胶, 1mm厚度凝胶可以配制至少35块胶, 1.5mm厚度凝胶可以配制至少20块胶。

### 使用说明:

10% APS配制-5 ml; 将0.5 g APS干粉溶于5 ml 灭菌水中, 彻底溶解后分装, 1 ml/支, -20℃ 备存, 每次取一管使用。10% APS应尽量减少常温存放时间, 以防失效。10% APS在4℃有效期为一周, -20℃有效期6个月。若发现凝胶聚合时间延长, 应考虑更换使用-20℃保存的10% APS。

### 一. 制胶:

- 1.1 参照凝胶模具说明书, 装配好凝胶模具。
- 1.2 按照表一将不同体积的成分在小烧杯中混匀; 随后加入10% APS和TEMED, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

表一 TBE-PAGE分离胶配方表  
(总体积5 ml, 适用于厚度1.0 mm小板胶)

分离范围	胶浓度	组份体积				
		水	30% PAA	5×TBE	10% APS	TEMED
70-450 bp	6%	3 ml	1 ml	1 ml	50 μl	5 μl
60-460 bp	8%	2.66 ml	1.34 ml	1 ml	50 μl	5 μl
50-300 bp	10%	2.33 ml	1.67 ml	1 ml	50 μl	5 μl
40-200 bp	12%	2 ml	2 ml	1 ml	50 μl	5 μl
20-150 bp	15%	1.5 ml	2.5 ml	1 ml	50 μl	5 μl
5-100 bp	20%	0.66 ml	3.34 ml	1 ml	50 μl	5 μl

注: 凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时, 聚合较快; 冬天温度低时, 聚合时间会延长。可以根据环境温度的不同调节APS的加入量。

- 1.3 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液 (对于8×10cm凝胶, 凝胶液加至约距前玻璃板顶端1.5 cm即可), 然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层1-2 cm的水层, 使凝胶表面保持平整。
- 1.4 常温静置10-20分钟, 待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面后, 说明分离胶已聚合。

- 1.5 去除覆盖在分离胶上的水层, 用滤纸吸干水分。
- 1.6 按照表二将不同体积成分在一个小烧杯中混匀; 加入10%过硫酸铵和TEMED, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

表二 TBE-PAGE浓缩胶配方表  
(总体积1.5 ml, 适用于厚度1.0 mm小板胶)

胶浓度	组份体积				
	水	30% PAA	5×TBE	10% APS	TEMED
4%	1 ml	0.2 ml	0.3 ml	15 μl	1.5 μl

- 1.7 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面, 直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端; 将梳子插入凝胶内, 避免产生气泡。
- 1.8 静置30-60分钟, 等待浓缩胶聚合。  
注: 凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时, 聚合较快; 冬天温度低时, 聚合时间会延长。可以根据环境温度的不同调节APS的加入量。

### 二. 电泳:

- 2.1 1×TBE电泳液配制: 取100ml 5×TBE, 加蒸馏水400 ml, 即配成500 ml 1×TBE。将凝胶板固定在电泳装置上, 往上槽和下槽中加入足够1×TBE电泳液。用1ml吸头冲洗加样孔1-2次。
- 2.2 样品处理: 取待测样品, 加入相应体积6×Native PAGE DNA上样液, 如10 μl样品加2 μl上样液, 短暂离心后取5-10 μl上样。TBE-PAGE中判断双链DNA大小可以选择20bp DNA ladder (货号: RTM441) 作为DNA Marker。

2.3 200 V稳压电泳。至二甲苯菁指示前沿到达凝胶三分之二位置时结束电泳。

恒电压	200 V
起始电流	20-25 mA/板胶
终止电流	10-15 mA/板胶
电泳时间	70+ min

### 三.染色:

3.1 漂洗: 拆下凝胶后, 适量蒸馏水漂洗3-5分钟。

3.2 染色液配制:

TBE-PAGE胶推荐使用RealSafe类染料后染染色, 以下程序用RealSafe Red核酸染料(Cat:GR002)进行染色。

即用型染色液配制 (配制量: 100 ml)

即用型RealSafe Red核酸染色液	
1×TBE	100 ml
RealSafe Red核酸染料	20 μl

3.3 染色:

凝胶浸泡于即用型染色液中, 常温避光摇床40-60 rpm 染色30分钟。

3.4 观察:

紫外灯或蓝光仪上观察条带。

参考资料:

#### DNA在PAGE中的有效分离范围

PAGE浓度 (w/v)C3.3	DNA有效分离范围		二甲苯菁 溴酚蓝		二甲苯菁 溴酚蓝	
	双链 bp	单链 nt	染料迁移率(bp)*		染料迁移率(nt)*	
3.5%	1000-2000	750-2000	460	100	150	45
5%	80-500	200-1000	260	65	130	35
8%	60-400	50-400	160	45	75	19
10%	50-300	40-350	100	25	60	18
12%	40-200	30-300	70	20	55	17
15%	25-150	10-150	60	18	40	15
20%	6-100	8-120	45	15	30	8

\* 染料迁移率相当于双链DNA片段粗略大小, 染料迁移率相当于单链DNA片段粗略大小

### 实验示例:

