

1. 溶液配制

1.1 2×上样缓冲液（loading buffer）配置

量取下列试剂，置于 100ml 塑料离心管中。		
试剂	终浓度	用量
甲酰胺（Formamide）	95%	95ml
0.1M EDTA（PH8.0）	0.5mM/L	500μL
溴酚蓝	0.025%	25mg
二甲苯青	0.025%	25mg
充分溶解后定容至 100ml； 小份（500μL/管）分装后，于 2~8℃保存。		

1.2 10%过硫酸铵

在配制容器加入 0.8ml 蒸馏水，称取 0.1g 过硫酸铵，加入配制容器，混匀，补水至 1ml，混匀备用。可于 4~8℃保存，保存期为 2 周。

1.3 5×TBE 电泳缓冲液

1000ml 5×TBE 缓冲液配制（使用前需稀释 5 倍）

试剂	用量	加入约 800ml 去离子水搅拌溶解，用 NaOH 调整 PH 至 8.0，定容至 1L，室温保存。
Tris Base	54g	
硼酸	27.5g	
EDTA 溶液（0.5mol/L）	20ml	

1.4 Gelred 染色液：50ml Gelred 染色液配制

试剂	用量
1×TBE 染色液	50mL
4SGelred 核酸染料, 10000X 水溶液	5μL

1.5 16%Urea-TBE-PAGE 丙烯酰胺配制：1000ml

试剂	用量
单体丙烯酰胺	154.67g
甲叉双丙烯酰胺	5.33g
尿素	480g
先加入 800ml 蒸馏水，放在烘箱内设置温度为 65℃溶解，每 10 分钟用玻璃棒搅拌一次充分溶解后，再定容至 1000ml。	

2. 制胶

2.1 组装胶架

将洁净、无水的玻片对齐，形成空腔，插入塑料框的凹槽中，注意箭头向上，并确保下端平齐。
放于制胶架上夹紧，下端紧贴密封条。

2.2 电泳胶的制作

将下表中的原料加入离心管后应快速混匀，否则会形成颗粒状凝胶块。

16%Urea-TBE-PAGE 电泳胶配方表（1.0mm 两块）

试液	16%Urea-TBE-PAGE	10%过硫酸铵	TEMED
体积	15mL	0.11mL	0.011mL

2.3 灌胶

混匀后用移液枪将凝胶溶液沿玻棒小心注入到长、短玻璃板间的狭缝内(胶高度距样品模板梳齿下缘约 1cm)。

2.4 插入制胶梳

混匀后用移液枪将凝胶溶液注入到长、短玻璃板间的狭缝内(分离胶上方)，轻轻加入样品模板梳，小心避免气泡的出现。约 60 分钟，聚合完全。

2.5 安装电泳槽

将制备好的凝胶板取下，小心拔下梳子。两块凝胶板分别插到 U 形橡胶框的两边凹形槽中，可往上提起使凝胶板紧贴橡胶。将装好玻璃板的胶模框平放在仰放的贮槽框上，其下缘与贮槽框下缘对齐，放入电泳槽内。倒入电泳缓冲液。

3. 样品处理

取 7 μ L 样品并加入 7 μ L 上样缓冲液，随后上样到 16%变形聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测，Marker 也需按照上述流程进行处理，推荐上样量为 3 μ L。

3.1 电泳

盖上电泳槽连接电泳仪，正负极对应插好，调电泳电压在 120-150V 之间，60min；待样品前沿距硅胶框底边 1cm 时，停止电泳，关闭电源。

3.1 凝胶板的剥离

电泳结束后，用工具打开玻璃板，取下凝胶。

3.1 染色

电泳完，凝胶浸入含 Gelred 的 1 $\times$ TBE 缓冲液中染色 10-15 分钟，随后用凝胶成像系统观察核酸条带，并用软件进行数据分析。