天净沙系列

CAT#:211237

常温运输和保存

有两个成分低温运输和保存

天净沙

miRNA 尿素-PAGE 试剂盒

miRNA Urea-PAGE Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-0448566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Urea-PAGE）是目前分离 200 nt 以下的小片段 RNA，尤其是 20 nt 左右的 microRNA（miRNA）分子的主要方法，但是单独配制各种溶液十分繁琐，为此本公司开发了本产品。它具有下列特点:

1. 一站式，含有电泳所需要的所有试剂，即开即用，十分方便，免去了实验人员称取有毒物品。
2. 灵活，可以根据需要配制各种浓度的 Urea-PAGE，以便对长度各异的 RNA 进行电泳。
3. 电泳后可直接用于 UV 观察、银染、胶回收、Northern 杂交等实验。
4. 使用新型上样缓冲液，可以防止甘油的干扰。

规格及成分

本产品第一部分为大扁盒包装，常温运输

成份	编号	规格	包装
尿素	100873	105 g×2	250 mL 本色瓶
丙烯酰胺，电泳级	211237a	60 g	125 mL 棕色瓶
甲叉双丙烯酰胺，电泳级	100877	3 g	10 mL 棕色瓶
10×TBE 电泳液	6-3337	250 mL	250 mL 本色瓶
TEMED	CAS:110-18-9	1.5 mL	1.5 mL 白盖管
过硫酸铵	100879	1 g	1.5 mL 绿盖管
固相 RNase 清除剂	903090	250 mL	250 mL 本色瓶
使用手册	211237sc	1 份	1 份

本产品第二部分为 logo 热封袋包装。低温运输

成份	编号	规格	包装
2×miRNA 尿素-PAGE 上样液	970608	1.5 mL	1.5 mL 红盖管
miRNA 电泳分子量标准 (15-50 nt)	220154	150 μL	1.5 mL 蓝盖管

运输及保存

常温运输及保存，其中 2×miRNA 尿素-PAGE 上样液、miRNA 电泳分子量标准需要低温运输，-20℃保存，保存期一年。

自备试剂

miRNA 样品、RNase-free 水。

使用方法

1. 准备工作：用固相 RNase 清除剂清洁工作平台

   直接将固相 RNase 清除剂原液或 10 倍的新鲜稀释液喷于台面，5 分钟后用普通吸水纸擦净，最后用沾有固相 RNase 清除剂 1000 倍新鲜稀释液的吸水纸擦净，晾干。
2. 准备工作：用固相 RNase 清除剂清洁玻璃和塑料器皿将器皿浸泡在固相 RNase 清除剂的 10 或 100 倍的新鲜稀释液中，静置处理 5 分钟后取出，再用固相 RNase 清

除剂 1000 倍或 10000 倍新鲜稀释液浸泡二次以上，倒置晾干后备用。

3. 配制 1×TBE 电泳液：将适量的 10×TBE 电泳液用 RNase-free 水稀释 10 倍，得到 1×TBE 电泳液待用。此溶液需要现用现配，否则易长菌。
4. 配制 10%过硫酸铵溶液：精确称取约 100 mg 过硫酸铵到一干净的 1.5 mL 离心管中，按每 1 mg 过硫酸铵加 10 μL RNase-free 水的比例加入 RNase-free 水，摇晃溶解待用。10%过硫酸铵溶液有效期不要超过一周。
5. 估计所需要的凝胶溶液的体积，一般配制一块 13 cm×15 cm×0.8 mm 的胶需要 15 mL 凝胶溶液,配制一块 36 cm×45 cm×0.8 mm 的胶需要 120 mL 凝胶溶液。
6. 配制 40%的丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液：将 3 g 甲叉双丙烯酰胺全部倒入装有 60 g 丙烯酰胺干粉的瓶中，加入 130 mL 自备的 RNase-free 水，充分摇晃混匀即得 40%的丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺（20:1）溶液。
7. 根据所需要的凝胶溶液的体积，在一个干净的三角瓶中按下表加入各成分（此处以配制 100 mL Acrylamide/Bis 终浓度为 15%的凝胶为例）：

成份	终浓度	用量
尿素	7 M	42 g
40%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液	15%	37.5 mL
10×TBE 电泳液	1×	10 mL
补 RNase-free 水到 100 mL		

注:丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液的终浓度需要根据待分离 RNA 长度选择(见下表)。

需分离的 RNA 长度范围	Acrylamide/Bis 终浓度
6-100 nt	20 %
25-150 nt	15 %
40-200 nt	12 %

8. 搅拌并加热到 40-50℃左右，直到尿素完全溶解。
9. 冷却到室温后，将三角瓶接上真空系统抽真空处理 10-15 分钟以充分去除溶液中的氧气（氧气会降低聚合反应效率）。若条件有限，此步可省略。
10. 边摇晃溶液边加入 50 μL TEMED 和 500 μL 10%过硫酸铵溶液。注意：如果选择其他工作浓度的丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液，此二成分的用量不需要随之改变。但如果配制的凝胶溶液的体积变化，此二成分的用量要按比例改变。
11. 再充分摇晃约 30 秒后迅速灌胶，然后插入样品梳，室温放置 30-60 分钟等待胶凝固。
12. 将凝胶板放置在电泳装置上后，在上下层分别加入适当量的 1×电泳缓冲液。如果不

	马上使用，需要有湿纸将上样孔端盖住以防凝胶过度干燥。 13. 拔出梳子后用加样枪吸取电泳缓冲液，充分将每个加样孔中未聚合的丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液、尿素和气泡吹打出来。 14. 在上样前，预电泳 20-30 分钟以使多余的过硫酸铵跑出加样孔，同时还可以使凝胶的温度升高（到 50℃左右），有利于 RNA 变性状态。 15. 将 5 μL miRNA 样品和 5 μL miRNA 电泳分子量标准（15-50 nt）分别和 5 μL 的 2×miRNA 上样液混合，70℃保温 2-3 分钟后迅速放置在冰上冷却，快速离心半分钟，放冰上待用。可以增加 miRNA 样品的用量，但上样液需要等比例增加。 16. 关电泳仪后开始上样。10 μL 混合液需要全部上样。 17. 重开电泳仪，对 13 cm×15 cm 的胶，以 20-30 mA 的电流电泳，直到红色染料移动到凝胶边缘为止；对 36 cm×45 cm 的胶，则以 50-60 mA 的电流电泳，直到红色染料移动到凝胶边缘为止。 18. 染色观察：将凝胶一面的玻璃板揭开，直接用仍然附着在另一玻璃板上的凝胶进行各种染色，包括银染（需单独购买试剂盒）、EB 染色（每 100 mL 1×TBE 中加 20 μL 10 mg/mL 的 EB 溶液）、克必隆低毒核酸染料染色（每 100 mL 1×TBE 中加 10 μL 低毒核酸染料）。如果用后两种染色法染色，需要在 UV 下观察并拍照。本产品提供的 miRNA Marker 有 5 条带，从上到下的长度分别为：50 nt、40 nt、30 nt、20 nt 和 15 nt。 19. 其它后续处理（本试剂盒不含所需试剂），流程仅供参考。 miRNA 回收：在 UV 下确定所需要的 miRNA 条带的位置，切胶后进行胶回收处理（需要单独购买试剂盒）。 Northern 杂交：UV 观察后将凝胶中的 RNA 电转移到带正电的尼龙膜上，然后进行杂交处理。 放射自显影：如果 miRNA 样品电泳前经过同位素标记，则将凝胶一面的玻璃板揭开，用滤纸将附着在另一玻璃板上的凝胶吸附过来，然后包上保鲜膜，真空抽干，然后使胶跟 X 光片向对置进行放射自显影。
关联产品	核酸银染试剂盒