

天
净
沙
系
列

CAT#:70606-30

常温运输和保存, miRNAon、
miRNA Marker 需要低温运输
和保存



一站式 miRNA 尿素-PAGE 电泳套装

One-Stop miRNA Urea-PAGE Pack

使用手册 V1.10

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

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, 为此天泽基因开发了本产品。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. 使用新型缓冲液, 可以防止甘油的干扰。			
规格及成分	成份	编号	大纸盒包装	运输及保存
	尿素	100873	210 g	RT
	丙烯酰胺	100864	60g, 用 250mL 瓶	RT
	甲叉双丙烯酰胺	100877	3g	RT
	TBE 电泳液, 10×	90313	250 mL	RT
	TEMED	110-18-9	1.5 mL	RT
	过硫酸铵	100879	1 g	RT
	miRNA _{ON}	70608	1.5 mL	低温/-20℃
	miRNA Marker	70605	150 uL	低温/-20℃
	固相 RNase 清除剂	3090	250 mL	RT
	使用手册	70606sc	1 份	RT
运输及保存	常温运输和保存, miRNA _{on} 、miRNA Marker 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, 倒立晾干后备用。 3. 配制 1×TBE 电泳液: 将适量的 10×TEB 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 uL 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 3g 甲叉双丙烯酰胺加入到装有 60g 丙烯酰胺干粉的瓶中，再加入 130 mL RNase-free 水，充分摇晃混匀即得 40%的 Acrylamide/Bis 溶液。
7. 根据所需要的凝胶溶液的体积，在一干净的三角瓶中按下表加入各成分（此处以配制 100mL 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% Acrylamide/Bis 溶液	15%	37.5mL
10×TEB 电泳液	1×	10 mL
补 RNase-free 水到 100mL		

注：Acrylamide/Bis 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%
60-400 nt	8%
80-500 nt	5%
1000-2000 nt	3.5%

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 uL TEMED 和 500 uL 10%过硫酸铵。注意：如果选择其他工作浓度的 Acrylamide/Bis，此二成分的用量不需要随之改变。但如果配置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，充分将每个加样空中未聚合的 Acrylamide/Bis、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空，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 miRNA 样品与等体积的 miRNAon 混合，将 miRNA Marker 5uL 与 5uL 的 miRNAon 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。 16. 关电泳仪后开始上样。miRNA Marker 与 miRNAon 的混合液（共 10uL）需要全部上样。 17. 重开电泳仪，对 13 cm×15 cm 的胶，以 20-30mA 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 50-60mA 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（固定、漂洗、显影和定影等步骤）、EB（每 100 mL 1×TBE 中加 20 uL 10mg/mL 的 EB 溶液）、天泽基因低毒核酸染料 DNAgreen（每 100 mL 1×TBE 中加 10 uL DNAgreen 原液）。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：50nt、40nt、30nt、20nt 和 15nt。 19. miRNA 回收：按上法用 EB 等染料染色后，UV 下确定所需要的 miRNA 条带的位置，切胶后进行胶回收处理。 20. Northern 杂交：按上法用 EB 等染料染色后，UV 下确定所需要的 miRNA 条带的位置，切胶后电转移到带正电的尼龙膜上，然后进行杂交处理。 21. 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	RNAon（产品编号：3130）、液相 RNase 清除剂（产品编号：3091）、固相 RNase 清除剂（产品编号：3090）