

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:211237-30

常温运输和保存

有两个成分低温运输和保存

**BINGENE**

**miRNA 尿素-PAGE 试剂盒**

**使用手册 V1.0**

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: [www.bingene.com](http://www.bingene.com); 电话: 400-6005850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

| 产品及特点               | <p>尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Urea PAGE)是目前分离 200nt 以下的小片段 RNA，尤其是 20nt 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：</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>3. 电泳后可直接用于 UV 观察、银染、胶回收、Northern 杂交等实验。</p> <p>4. 使用新型上样缓冲液，可以防止甘油的干扰。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |        |           |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------|----|----|----|--------|--------|-----------|----------|---------|-----|-----------|-------------|--------|----|----------|--------------|-------|-------|-----------|-------|----------|--------|---------|------|--------|-----|---------|--------------|------|--------|-----------|------|----------|-----|--|----|----|----|----|---------------------|--------|--------|---------|------------|-------|--------|-----------|
| 规格及成分               | <p>本产品第一部分为大纸盒包装，常温运输</p> <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>尿素</td><td>100873</td><td>105gX2</td><td>250mL 本色瓶</td></tr><tr><td>丙烯酰胺，电泳级</td><td>211237a</td><td>60g</td><td>125mL 棕色瓶</td></tr><tr><td>甲叉双丙烯酰胺，电泳级</td><td>100877</td><td>3g</td><td>10mL 棕色瓶</td></tr><tr><td>TBE 电泳液, 10×</td><td>90313</td><td>250mL</td><td>250mL 本色瓶</td></tr><tr><td>TEMED</td><td>110-18-9</td><td>1.5 mL</td><td>2mL 白盖管</td></tr><tr><td>过硫酸铵</td><td>100879</td><td>1 g</td><td>2mL 绿盖管</td></tr><tr><td>固相 RNase 清除剂</td><td>3090</td><td>250 mL</td><td>250mL 本色瓶</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>211237sc</td><td>1 份</td><td></td></tr></table> <p>本产品第二部分为塑料袋包装。低温运输</p> <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>2×miRNA 尿素-PAGE 上样液</td><td>970608</td><td>1.5 mL</td><td>2mL 红盖管</td></tr><tr><td>miRNA 电泳标准</td><td>70605</td><td>150 uL</td><td>0.5mL 蓝盖管</td></tr></table> | 成份     | 编号        | 规格 | 包装 | 尿素 | 100873 | 105gX2 | 250mL 本色瓶 | 丙烯酰胺，电泳级 | 211237a | 60g | 125mL 棕色瓶 | 甲叉双丙烯酰胺，电泳级 | 100877 | 3g | 10mL 棕色瓶 | TBE 电泳液, 10× | 90313 | 250mL | 250mL 本色瓶 | TEMED | 110-18-9 | 1.5 mL | 2mL 白盖管 | 过硫酸铵 | 100879 | 1 g | 2mL 绿盖管 | 固相 RNase 清除剂 | 3090 | 250 mL | 250mL 本色瓶 | 使用手册 | 211237sc | 1 份 |  | 成份 | 编号 | 规格 | 包装 | 2×miRNA 尿素-PAGE 上样液 | 970608 | 1.5 mL | 2mL 红盖管 | miRNA 电泳标准 | 70605 | 150 uL | 0.5mL 蓝盖管 |
| 成份                  | 编号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 规格     | 包装        |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 尿素                  | 100873                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 105gX2 | 250mL 本色瓶 |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 丙烯酰胺，电泳级            | 211237a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 60g    | 125mL 棕色瓶 |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 甲叉双丙烯酰胺，电泳级         | 100877                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 3g     | 10mL 棕色瓶  |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| TBE 电泳液, 10×        | 90313                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 250mL  | 250mL 本色瓶 |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| TEMED               | 110-18-9                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1.5 mL | 2mL 白盖管   |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 过硫酸铵                | 100879                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1 g    | 2mL 绿盖管   |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 固相 RNase 清除剂        | 3090                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 250 mL | 250mL 本色瓶 |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 使用手册                | 211237sc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1 份    |           |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 成份                  | 编号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 规格     | 包装        |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 2×miRNA 尿素-PAGE 上样液 | 970608                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1.5 mL | 2mL 红盖管   |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| miRNA 电泳标准          | 70605                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 150 uL | 0.5mL 蓝盖管 |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |
| 运输及保存               | 常温运输和保存，其中 miRNAon、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                | <p>1. 准备工作：用固相 RNase 清除剂清洁工作平台</p> <p>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。</p> <p>2. 准备工作：用固相 RNase 清除剂清洁玻璃和塑料器皿</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |        |           |    |    |    |        |        |           |          |         |     |           |             |        |    |          |              |       |       |           |       |          |        |         |      |        |     |         |              |      |        |           |      |          |     |  |    |    |    |    |                     |        |        |         |            |       |        |           |

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 甲叉双丙烯酰胺全部倒入装有 60g 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 Acrylamide/Bis (20:1) 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%                |

- 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%过硫酸铵溶液。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。

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>15. 将 5uL miRNA 样品与和 5uL miRNA 电泳标准分别和 5uL 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，但上液需要等比例增加。</p> <p>16. 关电泳仪后开始上样。10uL 混合液需要全部上样。</p> <p>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。</p> <p>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 uL 10mg/mL 的 EB 溶液）、克必隆低毒核酸染料染色（每 100 mL 1×TBE 中加 10 uL 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：50nt、40nt、30nt、20nt 和 15nt。</p> <p>19. 其它后续处理（本试剂盒不含所需试剂），流程仅供参考。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> |
| 关联产品 | 核酸 PAGE 胶银染试剂盒、溴化乙锭溶液（EB 溶液），10mg/mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |