



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

RNA 尿素 PAGE 电泳试剂盒 (货号 RTE4103)

Ver.720163

RNA Urea PAGE Electrophoresis Kit

● **产品组成:**

序号	货号	名称	规格	保存条件
1	RTE4103-01	40%PAA(29:1) (RNase-free)	100 ml	4℃
2	RTE4103-02	5×TBE (RNase-free)	500 ml	RT
3	RTE4103-03	尿素 (电泳级)	220 g	RT
4	RTE4103-04	RNase-free 水	100 ml	4℃
5	RTE4103-05	2×RNA 上样缓冲液 (尿素变性胶, RNase-free)	1 ml	-20℃
6	RTE4103-06	microRNA Marker	250 μl	-20℃
7	RTE4103-07	RNA 核酸染料	0.5 ml	4℃
8	AP020P	APS (干粉)	5 ml	RT (配制后-20℃贮存)
9	TA0761	TEMED	0.5 ml	4℃, 避光
10		说明书	一份	

● **产品简介:**

核酸尿素 PAGE 电泳是研究寡核苷酸和 RNA 电泳的重要研究手段。可以检测 2-500 碱基的寡核苷酸或 RNA 片段, 理论上可以分辨出相差一个核苷酸的片段。

本公司提供的 RNA 尿素 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。

按照每次制备 7 ml 8%凝胶 (大小 10×8cm, 1mm 厚度) 计算, 试剂盒可使用至少 60 次。

● **贮存和运输:**

试剂盒按照标签温度贮存, 有效期一年。试剂盒常温运输。

● **使用说明:**

一、制备凝胶:

10% APS 配制-5 ml:

将 0.5 g APS 干粉溶于 5 ml RNase-free 水中, 彻底溶解后分装, 1 ml/支, -20℃ 备存, 每次取一管使用。10% APS 应尽量减少室温存放时间, 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 度保存的 10% APS。

1.1. 参照凝胶模具说明书, 装配好凝胶模具。

1.2. 分离胶配制: 根据表格一, 将不同体积的成分混合, 漩涡搅拌至尿素彻底溶解。

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

RNA 长度	最佳凝胶浓度	尿素(克)	40%PAA (29:1)	5×TBE	RNase-free 水	10%APS	TEMED
200-1000 nt	5%	2.4 克	0.625 ml	1 ml	至体积 5 ml	50 μl	5 μl
50-400 nt	8%	2.4 克	1 ml	1 ml	至体积 5 ml	50 μl	5 μl
30-300 nt	10%	2.4 克	1.25 ml	1 ml	至体积 5 ml	50 μl	5 μl

40-200 nt	12%	2.4 克	1.5 ml	1 ml	至体积 5 ml	50 μ l	5 μ l
10-150 nt	15%	2.4 克	1.875 ml	1 ml	至体积 5 ml	50 μ l	5 μ l

1.3 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液（对于 mini-gel，凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5 cm 或距梳齿约 0.5 cm 即可），然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1-5 cm 的水层，使凝胶表面保持平整。

1.4 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，说明凝胶已聚合。

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；冬天气温低时，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。

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

表二 TBE-尿素 PAGE 4%浓缩配方表 (总体积 2 ml, 适用于 1.0mm 厚度胶)

各组份体积 (ml)					
尿素	40%PAA (29:1)	5 \times TBE	RNase-free 水	10%APS	TEMED
0.96 克	0.2 ml	0.4 ml	补至体积 2 ml	20 μ l	2 μ l

1.6 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。

1.7 常温静置 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；冬天气温低时，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. 预电泳：拔出梳子，用 **1 \times TBE 缓冲液彻底冲洗加样孔 2-3 次，去除残余的尿素**。电泳槽内外加入适量 1 \times TBE 缓冲液稳压 200 V 预电泳 30 分钟。

注：试剂盒配套的 5 \times TBE 缓冲液和 RNase-free 水仅够配制凝胶用，1 \times TBE 电泳缓冲液原料和 RNase-free 水请自己准备，配方如下：

终浓度	顺序	原料	1 升	5 升
89 mM	1	Tris 碱 [MW121.14]	10.8 克	54 克
2 mM	2	EDTA 2Na \cdot 2H ₂ O [MW372.24]	0.744 克	3.72 克
89 MM	3	硼酸 [MW61.83]	5.5 克	27.5 克
	4	RNase-free 水最后定容至	1 升	5 升
最后 pH 在 8.2-8.3 之间，可以不用调节 pH，记录每批 pH				

2.2. 取 3-5 μ l 样品，加入等体积 2 \times RNA 上样缓冲液，70 $^{\circ}$ C 处理 5 分钟后立即冰浴，上样。microRNA Marker 为即用型，不要添加上样缓冲液，70 $^{\circ}$ C 处理 5 分钟后立即冰浴，上样。microRNA Marker 7 条带的大小为 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75nt，为单链 DNA 混合物，可以判断单链 RNA 的大小。

2.3. 连接电源线，打开电源开关，按照以下条件电泳。

	恒电压	起始电流	结束电流	电泳时间	适用条件
推荐电压	200V	15-20 mA/板胶	8-15 mA/板胶	50+ min	最佳电压，最优的分辨率

2.4. 根据下表溴酚蓝指示前沿位置判断条带位置，取出凝胶进行后续实验。

变性胶浓度	溴酚蓝	二甲苯菁
5%	35 nt	130 nt
8%	19 nt	75 nt
10%	15 nt	55 nt
12%	12 nt	55 nt
15%	10 nt	52 nt

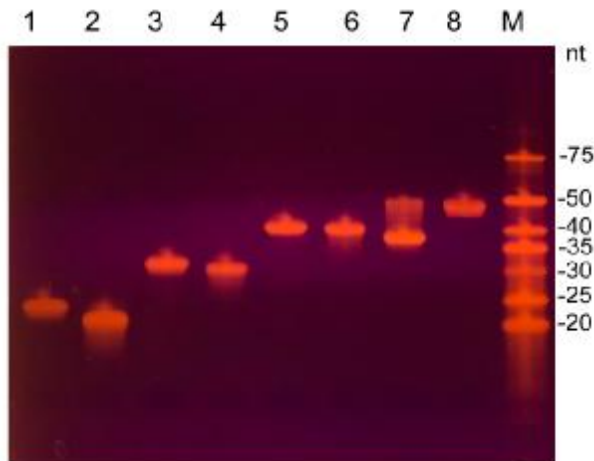
三、染色：

3.1 染色液配制：取一合适的容器，加入 100 ml 1×TBE，随后加入 20 μl RNA 核酸染料混匀。

3.2 染色：取下凝胶放入染色液中，常温下摇床轻轻地摇动凝胶染色，最佳的染胶时间为 15-20 分钟，这取决于凝胶的厚度、聚丙烯酰胺的浓度和 RNA 的长短。凝胶越厚或聚丙烯酰胺的浓度越高，染色所需要的时间就越长。注：染色溶液至少可重复使用 2-3 次。如果不立即再用的话，建议将用过的染色溶液冷藏避光保存。

3.3 观察：紫外灯下观察条带。

● 实验示例：



15% TBE 尿素胶

电泳条件：200 V 稳压电泳，17-9 mA 55min

染色：RNA 核酸染料后染

lane 1: 22 nt RNA; lane 2: 20 nt RNA; lane 3: 31nt RNA; lane 4: 30 nt RNA

lane 5 and 6: 40 nt RNA; lane 7: 38 nt RNA; lane 8: 50 nt RNA; M: microRNA Marker;

lane 1-8: 上样量为 1 μg; Marker 上样 5 μl。