

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#: 90604A-5  
CAT#: 90604B-5  
CAT#: 90604C-5  
低温运输, -20°C保存

**TIANDZ**

**PCR 法 DNA 探针标记试剂盒**

**PCR DNA Probe Labeling Kit**

**使用手册 V1.5**

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](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

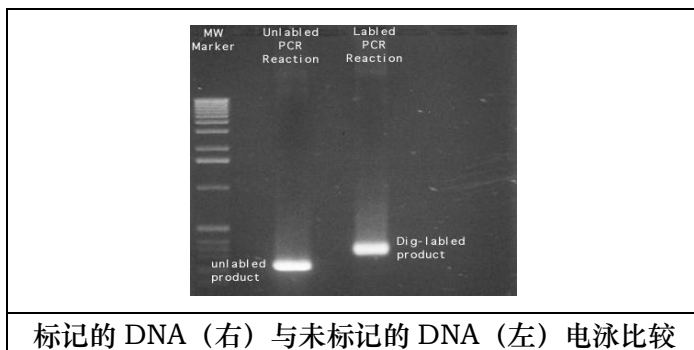
<p><b>原理及特点</b></p>	<p>PCR 标记的原理是用带标记的 dNTP 进行 PCR，最后得到的 PCR 产物将带有标记，可以直接用于杂交试验。本产品就是基于上述原理的基础上开发，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 一站式，本试剂盒提供经过优化的试剂，不需要用户自己摸索。</li> <li>2. 足够 10 次 50 uL 体系的常规 PCR（用于制备标记反应的模板和设置对照反应）和 5 次 50 uL 体系的标记反应。</li> <li>3. 一次标记可以得到 ug 级的双链 DNA 探针或约 700ng 的单链 DNA 探针，足够多次杂交实验用。</li> <li>4. 既可用于制备双链探针，也可以用于单链探针。</li> <li>5. A 型需自备含标记核苷酸的 dNTP，B 和 C 型分别含生物素和地高辛标记的底物。可用的自备标记底物包括 fluorescein-dUTP、hydroxycoumarin-dUTP、resorufin-dUTP 和 aminoallyl-dUTP 等。</li> <li>6. 掺入率一般为 4-5%，有效降低了空间阻碍，检测效果最佳。</li> <li>7. 标记探针可以用于 Southern 和 Northern Blot、原位杂交、菌落和斑点印迹杂交等分析。</li> <li>8. 本产品足够 5 次非标记 PCR 和 5 次标记 PCR（均指 50uL 体系）。</li> </ol>																																																												
<p><b>规格及成分</b></p>	<p>A 型</p> <table border="1" data-bbox="544 1093 1430 1438"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×标记专用 PCR Mix</td> <td>90604a</td> <td>500uL(黄盖)</td> </tr> <tr> <td>dATP, 10 mM each</td> <td>130912</td> <td>50uL(白盖)</td> </tr> <tr> <td>dTTP, 10 mM each</td> <td>130913</td> <td>50uL(绿盖)</td> </tr> <tr> <td>dGTP, 10 mM each</td> <td>130914</td> <td>50uL(红盖)</td> </tr> <tr> <td>dCTP, 10 mM each</td> <td>130915</td> <td>50uL(本色盖)</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL(亮黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>90604sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> <p>B 型 (生物素)</p> <table border="1" data-bbox="512 1478 1461 1738"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×标记专用 PCR Mix</td> <td>90604a</td> <td>500 uL(黄盖)</td> </tr> <tr> <td>含 Biotin-11-dUTP 的 dNTP, 2mM</td> <td>90604b</td> <td>25 uL(绿色)</td> </tr> <tr> <td>dNTP Mix, 2 mM each</td> <td>51208</td> <td>50 uL(白盖)</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL(亮黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>90604sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> <p>C 型 (DIG)</p> <table border="1" data-bbox="544 1778 1430 2036"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×标记专用 PCR Mix</td> <td>90604a</td> <td>500 uL(黄盖)</td> </tr> <tr> <td>含 DIG-11-dUTP 的 dNTP, 2mM</td> <td>90604c</td> <td>25 uL(绿色)</td> </tr> <tr> <td>dNTP Mix, 2 mM each</td> <td>51208</td> <td>50 uL(白盖)</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL(亮黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>90604sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	十孔盒包装	2×标记专用 PCR Mix	90604a	500uL(黄盖)	dATP, 10 mM each	130912	50uL(白盖)	dTTP, 10 mM each	130913	50uL(绿盖)	dGTP, 10 mM each	130914	50uL(红盖)	dCTP, 10 mM each	130915	50uL(本色盖)	超纯水	100935	1 mL(亮黄盖)	使用手册	90604sc	1 份	成份	编号	十孔盒包装	2×标记专用 PCR Mix	90604a	500 uL(黄盖)	含 Biotin-11-dUTP 的 dNTP, 2mM	90604b	25 uL(绿色)	dNTP Mix, 2 mM each	51208	50 uL(白盖)	超纯水	100935	1 mL(亮黄盖)	使用手册	90604sc	1 份	成份	编号	十孔盒包装	2×标记专用 PCR Mix	90604a	500 uL(黄盖)	含 DIG-11-dUTP 的 dNTP, 2mM	90604c	25 uL(绿色)	dNTP Mix, 2 mM each	51208	50 uL(白盖)	超纯水	100935	1 mL(亮黄盖)	使用手册	90604sc	1 份
成份	编号	十孔盒包装																																																											
2×标记专用 PCR Mix	90604a	500uL(黄盖)																																																											
dATP, 10 mM each	130912	50uL(白盖)																																																											
dTTP, 10 mM each	130913	50uL(绿盖)																																																											
dGTP, 10 mM each	130914	50uL(红盖)																																																											
dCTP, 10 mM each	130915	50uL(本色盖)																																																											
超纯水	100935	1 mL(亮黄盖)																																																											
使用手册	90604sc	1 份																																																											
成份	编号	十孔盒包装																																																											
2×标记专用 PCR Mix	90604a	500 uL(黄盖)																																																											
含 Biotin-11-dUTP 的 dNTP, 2mM	90604b	25 uL(绿色)																																																											
dNTP Mix, 2 mM each	51208	50 uL(白盖)																																																											
超纯水	100935	1 mL(亮黄盖)																																																											
使用手册	90604sc	1 份																																																											
成份	编号	十孔盒包装																																																											
2×标记专用 PCR Mix	90604a	500 uL(黄盖)																																																											
含 DIG-11-dUTP 的 dNTP, 2mM	90604c	25 uL(绿色)																																																											
dNTP Mix, 2 mM each	51208	50 uL(白盖)																																																											
超纯水	100935	1 mL(亮黄盖)																																																											
使用手册	90604sc	1 份																																																											
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期一年。</p>																																																												

<b>自备试剂</b>	DNA 模板和模板专一性引物。															
<b>使用方法</b>	<p><b>一：准备工作</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>按常规的方法设计 PCR 引物，使探针长度在 400-800bp 之间。过短则标记参入少，探针杂交信号强度减弱；过长则非特异杂交增加，背景变强。</li> <li>由于标记的 dNTP 比较珍贵，所以不推荐以基因组 DNA 或其他复杂 DNA 为模板直接进行 PCR 标记，而是建议采取下述的两步法标记来提高成功率，即先制备非标记 PCR 产物，再以之为模板制备标记的 PCR 产物。</li> <li>对 A 型标记试剂盒，四种 10mM 的 dNTP 是分开提供，用于制备 50uL 非标记 dNTP (2mM each, 用于非标记 PCR, 用于制备标记 PCR 的模板。配制方法是四种 10mM 的 dNTP 各加 10uL, 再加水 10uL 即可) 和 25uL 标记 dNTP (2mM each, 其中标记核苷酸和对应的非标记核苷酸的比例需要自行优化, 假如是 biotin 或 DIG 标记的是 dUTP, 则其对应的非标记核苷酸是 dTTP, 两者的最佳比例一般为 1: 3; 如果是 BrdUTP, 则两者的最佳比例为 1: 1。配制方法是三种 10mM 的 dNTP 各加 5uL, 再加标记核苷酸和其对应的标记核苷酸使其总的终浓度为 2mM, 再补水到 25uL)。</li> </ol> <p><b>二：非标记 PCR 产物的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>设置 50uL 非标记 PCR: 2× 标记专用 PCR Mix 25 uL, dNTP Mix (2mM each) 5uL, 自备的探针引物 (10pmol/uL) 各 1uL, 1 ug 基因组 DNA 或 1ng 质粒 DNA, 补超纯水到 50 uL。</li> <li>按已经优化的 PCR 参数进行常规 PCR。</li> <li>胶回 PCR 产物并定量, 胶回收可以避免残留引物干扰后续的标记 PCR。</li> </ol> <p><b>三：标记 PCR 反应 (最好做一个不加标记的对照用于定量)</b></p> <p>注意：由于双链 PCR 探针在杂交时变性的双链彼此还会复性，降低杂交效率，因此强烈推荐单链标记 PCR。</p> <table border="1" data-bbox="550 1771 1426 2130"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>样品</th> <th>非标记对照</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2× 标记专用 PCR Mix</td> <td>25 uL</td> <td>25 uL</td> </tr> <tr> <td>A 型: 含标记核苷酸的 dNTP Mix B 型: 含 Biotin-11-dUTP 的 dNTP C 型: 含 DIG-11-dUTP 的 dNTP</td> <td>5 uL</td> <td>不加</td> </tr> <tr> <td>dNTP Mix, 2mM</td> <td>不加</td> <td>5 uL</td> </tr> <tr> <td>若单链标记: 加探针引物其一</td> <td>50 pmol</td> <td>50 pmol</td> </tr> </tbody> </table>	成份	样品	非标记对照	2× 标记专用 PCR Mix	25 uL	25 uL	A 型: 含标记核苷酸的 dNTP Mix B 型: 含 Biotin-11-dUTP 的 dNTP C 型: 含 DIG-11-dUTP 的 dNTP	5 uL	不加	dNTP Mix, 2mM	不加	5 uL	若单链标记: 加探针引物其一	50 pmol	50 pmol
成份	样品	非标记对照														
2× 标记专用 PCR Mix	25 uL	25 uL														
A 型: 含标记核苷酸的 dNTP Mix B 型: 含 Biotin-11-dUTP 的 dNTP C 型: 含 DIG-11-dUTP 的 dNTP	5 uL	不加														
dNTP Mix, 2mM	不加	5 uL														
若单链标记: 加探针引物其一	50 pmol	50 pmol														

若双链标记: 加探针引物一和引物二	各 50 pmol	各 50 pmol
胶纯化所得 PCR 产物 (单链标记可用 100ng 模板)	10 ng	10 ng
超纯水	补到 50 uL	补到 50 uL

注意: 本试剂盒提供的 dNTP 混合物总浓度为 2mM, 所含标记 dUTP 与非标记 dTTP 的比例已经经过优化。

- 按第 5 步的 PCR 参数进行标记 PCR, 但需要进行下列修改: 一是循环数增加到 35-55 个循环。由于模板为纯化后的 PCR 产物, 探针对扩增长度完整性要求不高 (长度不均的探针由于能形成网络结构, 效果反而更好), 所以可以增加循环数; 二是延伸时间增加 15 秒, 因为标记 dUTP 参入到 DNA 的速度比常规的 dTTP 慢; 三是降低复性温度 5-7°C, 因为标记核苷酸参入到 DNA 后, 新模板的  $T_m$  值将降低。
- 标记探针的定量: 取标记反应液和对照反应液 1-5 uL, 在琼脂糖凝胶上跟浓度已知的 DNA marker 一起电泳, 并判断探针的浓度。由于标记产物中额外带有生物素, 地高辛等, 其泳动速度将慢于非标记 PCR 产物 (但同位素标记不能用此法)。下图是一个典型的双链 PCR 产物电泳结果图:



标记的 DNA (右) 与未标记的 DNA (左) 电泳比较

注意: 如果扩增的是单链 DNA 探针, 其结合 EB 的能力远低于双链 DNA, 因此 EB 染色的强弱不能准确反应 DNA 的真实浓度, 可以采用银染定量 (跟 marker 比较)。一般 100ng 模板经单链 PCR 扩增可得到 700ng 左右探针。

- 剩余的 PCR 标记产物可以不经纯化, 直接加入 (对单链 PCR 探针) 杂或加热变性并急冷后加入 (对双链 PCR 探针) 到杂交液中使用。也可放 -20°C 长期保存。如果需要纯化, 请使用乙酸铵/乙醇沉淀法纯化。

## 关联产品

柱式探针纯化试剂盒