

天
净
沙
系
列

CAT#:131036-10
低温运输和-20℃保存

TIANDZ

DNA5' 末端标记试剂盒

DNA 5' End-Labeling Kit

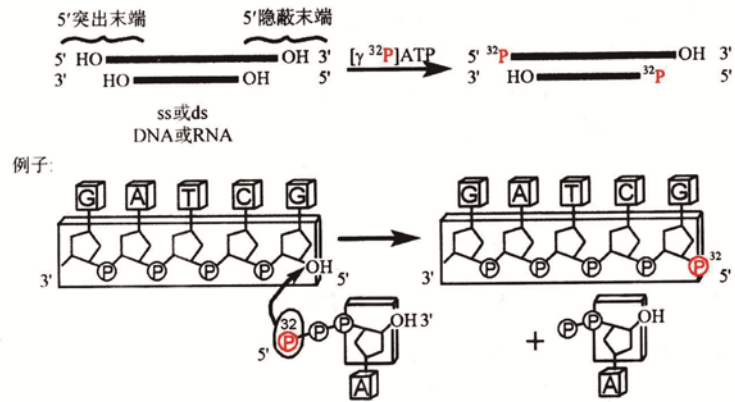
使用手册 V1.0

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

本产品为 DNA 5' 末端标记系统，利用 T4 Polynucleotide Kinase (T4 多聚核苷酸激酶) 和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 对粘性末端或平末端的 DNA 或 RNA 的 5' 末端进行高效标记反应。原理如下：



T4 多核苷酸激酶的活性与 DNA 分子 5'-末端的标记

本产品具有下列特点：

1. 使用本试剂盒之前，不需要对 5' 末端的磷酸基团进行去磷酸化处理，因为使用的 kinase 能使 5' 末端的磷酸与 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的 γ -磷酸进行交换。
2. 合成的单链或双寡核苷酸的 5' 末端游离的 OH 基团都能通过 Kinase 反应被标记（或者只是简单的磷酸化）。
3. 提供的两种反应液使交换反应和磷酸化反应都能高效进行，均能得到大于 10^6 cpm/pmol (5' -end) 的比活性。

规格及成分

成份	编号	热封袋包装
T4 多聚核苷酸激酶 (10 U/ μL)	131036A	20 μL
5 \times 交换反应缓冲液	131036B	100 μL
10 \times 磷酸缓冲液	131036C	50 μL
Control DNA	131036D	20 μL
使用手册	1 份	

运输及保存

低温运输， -20°C 保存，有效期一年。

自备试剂

DNA 片段、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 或其它的标记、未标记的 ATPs、牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) 等

使用方法

一、交换反应

1. 实验前需自备的试剂：7 M 醋酸铵、100%乙醇、70%乙醇等
2. 在微量离心管中制备下列反应液：

成分	加入的体积
自备的 5' 磷酸化 DNA 片段	14 μL (≤ 5 pmoles 的 5' 末端)

5×交换反应缓冲液	5 μL
[γ- ³² P] ATP	5 μL
T4 多聚核苷酸激酶 (10 U/μL)	1 μL
灭菌的超纯水	补足到 25 μL

注: 5 pmoles 的 5' 末端约等于 0.17 μg 的长 100 bp 的双链 DNA。

- 37°C 反应 30 分钟。
- 70°C 加热 5~10 分钟使酶失活。
- 加入 10 μL 的 7 M CH₃COONH₄ (pH 4.5)。如使用 CH₃COONa 做乙醇沉淀时使其终浓度达 300 mM。
- 加入 87.5 μL (2.5 倍) 的冷无水乙醇, -20°C 放置 30~60 分钟。
- 离心回收沉淀, 用 70% 的冷乙醇清洗沉淀, 真空干燥。
- 用适当 Buffer 溶解沉淀。

注: 通过第 5~8 步操作几乎可以除去大部分未反应的[γ-³²P] ATP, 如要完全将其除去时, 乙醇沉淀后用凝胶过滤等方法精制即可。如需用苯酚抽提除去蛋白质时, 请在第 8 步之后进行。

二、磷酸化反应标记

A. 去磷酸化反应

- 实验前需自备的试剂: TE 饱和酚/氯仿、3 M NaCl、100%乙醇、70%乙醇、牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) 等
- 在微量离心管中制备下列反应液:

成分	加入的体积
自备的 DNA 片段	133 μL (≤ 10 μg)
1 M Tris-HCl, pH 8.0	15 μL
牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP, 10~20 U/μL)	2 μL
灭菌的超纯水	补足到 150 μL

- 50°C 反应 30 分钟。
- 加入 150 μL 的 TE 饱和酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1), 充分混匀。
- 离心, 取上层 (水层) 移到另一个微量离心管中。
- 重复操作 4~5。
- 加入 7.5 μL 的 3 M NaCl (最终浓度 150 mM)。
- 加入 375 μL (2.5 倍量) 的冷无水乙醇, -20°C 放置 30~60 分钟。

9. 离心回收沉淀，用 1 mL 70% 的冷乙醇清洗后，沉淀真空干燥。
10. 使用 20 μL 的 TE Buffer 溶解沉淀。

B. 磷酸化反应（前反应）

1. 在微量离心管中制备下列反应液：

成分	加入的体积
自备的 DNA 片段	20.5 μL (≤ 5 pmoles 的 5' 末端)
10 \times 磷酸缓冲液	2.5 μL
[γ - ^{32}P] ATP	1 μL
T4 多聚核苷酸激酶 (10 U/ μL)	1 μL
灭菌的超纯水	补足到 25 μL

2. 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟。
3. 下面的操作与交换反应的第 4-8 步操作相同。

三、合成 DNA 寡核苷酸的标记

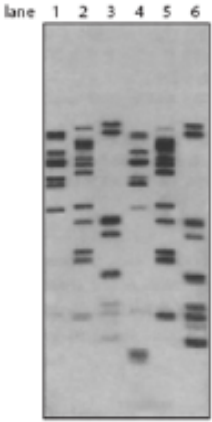
1. 在微量离心管中制备下列反应液：

成分	加入的体积
Oligonucleotide DNA with free 5' -OH(5~10 pmoles)	≤ 3 μL
10 \times 磷酸缓冲液	2.5 μL
[γ - ^{32}P] ATP	1 μL
T4 多聚核苷酸激酶 (10 U/ μL)	1 μL
灭菌的超纯水	补足到 25 μL

2. 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟。
3. 下面的操作与交换反应的第 4-8 步操作相同。

四、合成 DNA 寡核苷酸的标记

当掺入水平很低的时候，需要使用本步骤，即通过体积排阻色谱或过滤试剂盒除去未反应的标记。Sephadex G-50 层析柱（需另购）对于去除未掺入的 dNTPs 效果很好，它还能大幅减少小于 20 个碱基的 DNA 寡核苷酸和小于 20 bp 的双链 DNA 的量。使用之前需要在 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5~10 分钟以使 T4 多聚核苷酸激酶失活。Sephadex G-25 层析柱可以用来纯化长度不小于 10 个碱基的寡核苷酸。

<p>使用举例</p>	<p>按照使用方法中交换反应和合成 DNA 寡核苷酸的标记的实验操作，取 λ-<i>Bst</i>P I, λ-<i>Hpa</i> I, λ-<i>Eco</i>T22 I 各 3 pmols, 用 [γ-³²P] ATP 通过正向磷酸化反应或交换反应标记。各 DNA 片段的放射自显影结果如下所示：</p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p>Lane 1: λ-<i>Hpa</i> I fragments</p> <p>2: λ-<i>Bst</i>P I fragments</p> <p>3: λ-<i>Eco</i>T22 I fragments</p> <p>4: λ-<i>Hpa</i> I fragments</p> <p>5: λ-<i>Bst</i>P I fragments</p> <p>6: λ-<i>Eco</i>T22 I fragments</p> </div> </div>
<p>注意事项</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 缓冲液可在室温融解。融解后立即置于冰中，使用前充分混匀。 2. 5×交换反应缓冲液于-20℃冻结保存时会有白色浑浊出现，但不影响反应效果。 3. 酶切得到的 DNA 片段需经乙醇沉淀等方法纯化。 4. 当用于交换反应的 DNA 在 5 pmols 以上 (约 1,000 bp 以上) 时，标记效率有时会低于 10⁶ cpm/pmol。 5. 如果交换反应所用 DNA 低于 500 bp 时，标记效率有时会有所降低。 6. 若不进行放射线标记，仅使用本试剂盒做 5' 末端磷酸化反应时，反应体系中的 [γ-³²P] ATP 可用 5 μL 的 10 mM ATP 代替。 7. 磷酸化反应时的 [γ-³²P] ATP 可用 [γ-³⁵S] ATP 替代。
<p>关联产品</p>	<p>超快蛋白银染试剂盒 (CAT#:100810)、质谱兼容型蛋白银染试剂盒 (CAT#:100811)</p>