

天
净
沙
系
列

CAT#:131208-10
常温运输和保存

TIANDZ

DNA 探针变性液

DNA Probe Denaturation Solution

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

<p>产品及特点</p>	<p>杂交反应进行时，探针和靶核酸都必须单链的。如果用双链 DNA 探针进行杂交（包括检测 RNA 时），双链 DNA 探针在杂交前必须进行变性。本产品就是即用型的 DNA 探针变性液，专门针对 DNA 探针在杂交前进行变性处理。本产品特点如下：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用。 2. 使用方便快捷，可用于核酸杂交。 			
<p>规格及成分</p>		<p>成份</p>	<p>编号</p>	<p>10 mL 塑料袋包装</p>
		<p>本产品</p>	<p>131208</p>	<p>10 mL</p>
		<p>使用手册</p>	<p>1 份</p>	
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，有效期一年。</p>			
<p>自备试剂</p>	<p>印迹膜、标记探针、6×SSC、2×SSC、0.1×SSC、超级杂交液、Tris-Cl 溶液（1 M，pH 7.2）、HCl 溶液（0.4 M）</p>			
<p>使用方法</p>	<p>一、根据探针和靶分子的不同，分别按下面不同情况计算杂交分子的 T_m 值</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 对 DNA-DNA 杂交，其 $T_m = 81.5 + 16.6 \times \log_{10}[\text{Na}^+] + 0.41 \times \text{GC}\% - 500/L$ <p>说明：L 是探针或靶分子的长度（用两者中最短的一个）</p> <p>GC% 是探针或靶分子中的 GC 百分比（用两者中最短的一个）</p> <p>Na⁺ 浓度是超级杂交液中 Na⁺ 的浓度，为 0.75 M，$16.6 \times \log_{10}[\text{Na}^+] = (-2.07)$</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 对 DNA-RNA 杂交，其 T_m 值比 DNA-DNA 的 T_m 值要高 10-15℃。 3. 对 RNA-RNA 杂交，其 T_m 值比 DNA-DNA 的 T_m 值要高 20-25℃。 4. 对 Oligo 探针杂交，$T_m = \text{GC 数量} \times 4^\circ\text{C} + \text{AT 数量} \times 2^\circ\text{C}$。 <p>二、确定最佳杂交温度（预杂交温度跟杂交温度应该一样）</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 对于大于 200 bp 的 DNA-DNA 杂交，最佳杂交温度一般比 T_m 低 15-25℃，一般选择 68℃。 2. 对 RNA-RNA 或 DNA-RNA 杂交，最佳杂交温度一般比 T_m 低 15-25℃。如果这样计算出的杂交温度很高（如高于 70℃），则 RNA 容易降解，所以最好选用含甲酰胺的超级杂交液（超级杂交液 B 型），以便能在 42℃ 完成杂交。 3. 对 Oligo 探针的杂交，最佳杂交温度一般比 T_m 低 5℃。由于 Oligo 较短，更容易受各种因素影响（如错配率、修饰碱基比例等），所以最佳温度需要适度摸索和优化。 			

三、确定洗膜温度

一般使用 $0.1 \times \text{SSC}$ 做洗膜液，在此条件下的最佳洗膜温度比 T_m 低 $5-12^\circ\text{C}$ ，一般情况下可以在 55°C 进行洗膜。Oligo 探针可以室温洗膜。

四、预杂交步骤

预杂交就是用不含探针的超级杂交液跟印迹膜进行孵育，其目的是用所含的非特异性 DNA 分子(鲑精 DNA 或小牛胸腺 DNA)及其它高分子化合物将印迹膜上会非特异地吸附探针分子的位点封闭，否则这些位点会吸附标记的探针，造成高背景。

1. 将结合了靶分子的硝酸纤维素印迹膜或尼龙印迹膜浸泡于自备的 $6 \times \text{SSC}$ 溶液中，使其充分湿润。
2. 将湿润的印迹膜置于一塑料杂交袋中(塑料袋最好预先封口，再剪掉一角，留一个小口)，按每平方厘米印迹膜加 0.2 mL 超级杂交液的比例沿小口加入超级杂交液，然后用塑料封口机将口封牢。
3. 将此塑料袋浸没入温度设定在最佳杂交温度的恒温水浴中或杂交炉中，保温 $1-2$ 小时，延长到 $12-16$ 小时亦可。注意保温过程中塑料袋应在不停的摇动状态中，使超级杂交液与印迹膜充分接触。

五、杂交步骤

1. 如果标记的探针是双链核酸，则需经变性处理。具体操作是：根据探针浓度和杂交所需探针的量计算出所需的探针体积，取出所需体积的探针到一干净的硅化的塑料离心管中，加入等体积的本产品，吹打混匀后室温放置 5 分钟变性后，将探针样品放入冰浴中冷却，加入 0.05 倍体积的自备的 1 M 的 Tris-Cl 溶液 ($\text{pH } 7.2$) 以及等体积的自备的 0.4 M 的 HCl 溶液。将探针样品保存在冰浴中直至需要。如果是单链 DNA 或 RNA 探针，则不需变性，直接使用。
2. 将单链探针或变性后的双链探针加入到完成了预杂交的杂交袋中(先用剪刀剪一小口，加入探针后用热封机封口)。探针的加入量视探针标记效率而定，一般要求终浓度不能低于 $1-2 \text{ ng/mL}$ 。如果检测基因组中的单拷贝基因，探针的加入量应加大，而对于检测克隆的基因片段，则探针的量可减少。如果是放射性探针，应将此塑料袋套在另一塑料袋之中，以避免杂交袋发生遗漏、污染工作环境。
3. 在选定的杂交温度下继续保温，时间一般为 $6-12$ 小时。

六、洗膜步骤。注意在下面的所有操作过程中，一定不要使印迹膜干燥。

	<p>此步是将与印迹膜非特异结合的探针分子洗去而只留下特异结合的探针分子。由于非特异性杂交的杂交分子解链温度较低，热稳定性较差，在一定的温度和较低的离子强度下，即可洗掉。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 杂交完毕，取出塑料袋，剪去一角，倒出所有的含探针的杂交液。此含探针的杂交液可以多次使用再倒弃。 2. 剪开杂交袋，用镊子取出印迹膜，浸没于大量的 2×SSC (含 0.5 % SDS) 溶液中，室温下振荡漂洗 15 分钟。 3. 重复上步操作一次。 4. 将印迹膜转移至 0.1×SSC (含 0.1% SDS) 溶液中，在计算好的洗膜温度下振荡漂洗 30 分钟至 1 小时。 5. 重复上步操作一次。如果是同位素标记探针，则需要重复至用盖革计数器在无核酸区域检测不出放射信号为止。 6. 将印迹膜转移到滤纸上，吸去表面液体后印迹膜即可用于后续检测。
<p>关联产品</p>	<p>超级杂交液 (CAT#:80915)、超级杂交液 (Oligo 探针) (CAT#:130904)、超级杂交液 (芯片) (CAT#:130905)</p>