

天
净
沙
系
列

CAT#:90603A-5

CAT#:90603B-5

CAT#:90603C-5

低温运输、-20℃保存

TIANDZ

随机引物法 DNA 探针标记试剂盒

Random Primer DNA Labeling Kit

使用手册 V1.2

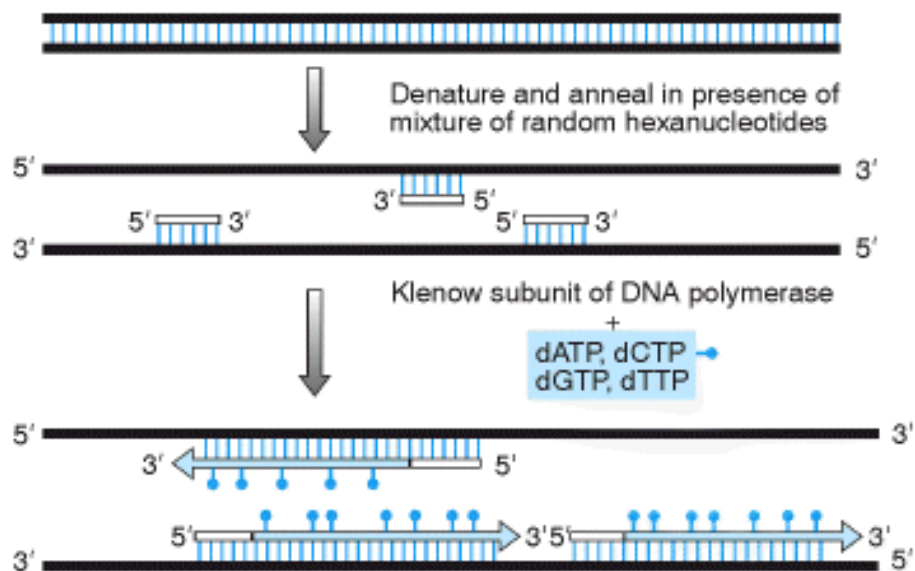
北京天恩泽基因科技有限公司

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

本产品是基于 Feinberg 和 Vogelstein 发明的随机引物标记法而开发出来的即用型 DNA 探针标记试剂盒，标记过程由双链 DNA 热变性、随机引物与单链 DNA 结合、在 Klenow DNA 聚合酶催化下，引物的延伸合成 DNA 探针并掺入标记的核苷酸三步组成，可用下面的示意图表示：



本产品对 Feinberg 和 Vogelstein 经典方法进行了改良，具有下列特点：

1. 提供的标记反应液整合了除酶和模板外的所有成分，简化了反应加样步骤，提高了标记反应的可重复性。
2. 使用无外切活性的 Klenow exo- DNA 聚合酶，已标记 DNA 探针不会被酶降解。
3. 快速，最快 1 小时即可完成标记反应。
4. 得到的 DNA 探针比活性高（如果是同位素，可以达到 10^9 cpm/ μ g DNA）。
5. 所需模版 DNA 量少，可以是各种形状（线状和环状）的、也可以是单链或双链的，但长度必须在 100 bp 以上。
6. 得到的探针长度在 200-400 nt 之间，可以用于 Southern 杂交、Northern 杂交、原位杂交、菌落和斑点印迹杂交等。
7. 提供三种标记选择，其中 90603A 可用于各种同位素和非同位素标记，但需自备标记底物；90603B 和 90603C 可分别用于生物素和地高辛标记，不需自备标记底物。

规格及成分

A 型

成份	编号	十孔盒包装
2×随机引物标记反应液(A 型)	90603a	50 μ L
dATP, 2 mM	90603d1	10 μ L
dTTP, 2 mM	90603d2	10 μ L

dGTP, 2 mM	90603d3	10 uL
dCTP, 2 mM	90603d4	10 uL
Klenow exo-聚合酶, 2U/uL	90603e	5 uL
超纯水	100935	1 mL
使用手册	90603sc	1 份

B 型 (生物素标记)

成份	编号	十孔盒包装包装
2×随机引物标记反应液(B 型)	90603b	50 uL
Klenow exo-聚合酶, 2U/uL	90603e	5 uL
超纯水	100935	1 mL
使用手册	90603sc	1 份

C 型 (DIG 标记)

成份	编号	十孔盒包装包装
2×随机引物标记反应液(C 型)	90603c	50 uL
Klenow exo-聚合酶, 2U/uL	90603e	5 uL
超纯水	100935	1 mL
使用手册	90603sc	1 份

运输及保存

低温运输, -20℃保存, 有效期一年。

自备试剂

0.5M EDTA (pH8.0)。如果是 A 型, 则需要自备标记的核苷酸。

使用方法

1. 在一干净的硅化的塑料离心管中加入下列成分:

成分	用量
模板 DNA	50-150 ng
2×随机引物标记反应液(ABC 三种之一)	10 uL
超纯水	补水到 15 uL

注意: 非同位素标记基团疏水性强, 易与塑料离心管表面非特异性结合, 所以要硅化塑料离心管。模板 DNA 并非越多越好, 否则会竞争性地抑制探针跟靶分子的杂交。

2. 沸水浴 5-10 分钟, 或在 PCR 仪上 100℃加热 5-10 分钟后立即放冰上待用。
3. 高速离心数秒使所有液体集中在管底, 根据试剂盒类型加入下列成份:

试剂盒类型	成分及用量
A 型	dATP、dGTP、dCTP 各 1 uL (共 3uL, 浓度均为 2mM) 自备的 2mM dTTP/标记 dUTP 混合物 (见注) 1uL

	1 uL Klenow exo 聚合酶
B 型	1 uL Klenow exo 聚合酶 4 uL 超纯水 不需加 dNTP, 已经包括在 2×随机引物标记反应液 (B 型) 中
C 型	1 uL Klenow exo 聚合酶 4 uL 超纯水 不需加 dNTP, 已经包括在 2×随机引物标记反应液 (C 型) 中

注:上表中的 dTTP/标记 dUTP 混合物中 dTTP 和标记的 dUTP 的总浓度为 2mM, dTTP 与标记 dUTP 的比例在 65: 35 为最佳。但如果使用自备的其他标记核苷酸, 如 fluorescein、hydroxycoumarin、resorufin 和 aminoallyl 标记的 dUTP, 则用户需要自己摸索其与 dTTP 之间的最佳比例, 如果使用 ³²P 标记的 dUTP, 则比活最好为 3000Ci/mmol, 浓度为好为 10uCi/uL, 并且不需要加入 dTTP。

- 轻柔吹打混匀。如有液滴沾在管壁上, 高速离心数秒使所有液体集中在管底。
- 37℃保温 1-20 小时。标记效率跟模板量和保温时间相关, 具体见下表:

模版 DNA 用量 (ng)	1 小时后探针合成量 (ng)	20 小时后探针合成量 (ng)
10	80	900
30	150	1350
100	350	1650
300	750	2200
1000	1300	2600
3000	1600	2600

- 加 1 uL 自备的 0.5M EDTA (pH 8.0) 终止反应, 加热 100℃ 5 分钟使 DNA 探针变性成单链, 然后直接加入到杂交反应液中即可。如果电泳检测, 标记产物将是弥散状态。立即放冰上待用或放 -20℃ 保存一年。用前需要

注意: 本方法标记核苷酸掺入率极高, 因此可以不经纯化直接使用。如果需要纯化, 注意不要用酚抽提法纯化非同位素标记的 DNA 探针, 因为这些标记分子疏水性强, 能使标记的 DNA 进入疏水的有机相而丢失, 但可以用乙醇沉淀和 Sephadex G50 回收 (可另购柱式探针纯化试剂盒, 产品编号 121122)。对比活高的同位素标记探针, 由于同位素其极其不稳定, 因此应该立即使用, 不要长久放置。

相关产品

柱式探针纯化试剂盒 (121122)。