天净沙系列

CAT#：210701-3

低温运输，-20℃保存

天净沙

DNA 探针 Cy5 标记试剂盒（PCR 法）

DNA Probe Cy5 Labeling Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

原理及特点

用 PCR 对 DNA 进行 Cy5 标记的原理是用带 Cy5 标记的 dNTP 进行 PCR 扩增，这些 dNTP 掺入到 PCR 产物中之后，扩增得到的 DNA 片段自然就带有 Cy5 标记，可以直接用于杂交试验。本产品基于上述原理开发，它具有下列特点：

1. 一站式，本试剂盒经过精心优化，不需要用户自己摸索标记条件。
2. 优化的 Cy5 掺入率，能有效降低探针中 Cy5 分子之间的可能空间阻碍，检测效果佳。
3. 得到的 Cy5 标记 DNA 探针可以用于 Southern 杂交、Northern 杂交、原位杂交、菌落杂交和斑点印迹杂交等分析。
4. 既可用于制备双链 DNA 探针，也可以用于制备单链 DNA 探针。
5. 一次标记反应可以得到μg 级的 Cy5 标记双链 DNA 探针或约 700 ng Cy5 标记单链 DNA 探针，足够多次杂交实验用。
6. 本产品足够 5 次 Cy5 标记 PCR 反应（50 μL 体系）。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
标记专用 PCR Mix(含酶)	210701-3a	30 μL	0.5 mL 红盖管
dNTP Mix，2.5 mM each	210701-3b	25 μL	0.5 mL 白盖管
含 Cy5-dUTP 的 dNTP，2.5 mM each	210701-3c	25 μL	0.5 mL 绿盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	210701-3sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

DNA 模板和模板专一性引物，常规 PCR 反应所需试剂，琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒。

使用方法

一：准备工作

1. 按常规的方法设计 PCR 引物，使 PCR 产物（探针）长度在 400-800 bp 之间。过短则 Cy5 标记掺入少，探针杂交信号强度减弱；过长则非特异杂交增加，背景变强。
2. 为保证成功率，最好先用常规 PCR 产物制备 DNA 片段，再以之为模板进行标记 PCR 反应。不推荐以基因组 DNA 或其他背景复杂的 DNA 为模板直接进行 PCR 标记反应。

二：用常规 PCR 制备模板

3. 用自备的PCR试剂盒按下表配置50 μL的PCR反应以制备标记PCR模板：

成份	加入量
自备的2×PCR Mix（含酶，含dNTP）	25 μL
引物一和引物二（10 pmol/μL）	各5 μL
1 μg基因组DNA或1 ng质粒DNA	1 μL
超纯水	补到50 μL

4. 按引物Tm值设计的PCR参数进行常规PCR。

5. 用自备胶回收试剂盒回收常规 PCR 产物并定量。胶回收步骤可以去残留引物，避免这些引物干扰后续的标记PCR反应。

三：标记 PCR 反应

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，因此强烈推荐使用单链标记 PCR。在设置标记 PCR 时必须做一个常规 PCR 对照（本试剂盒足够 5 次标记 PCR 实验）。

成份	标记 PCR	常规 PCR（自备）
标记专用 PCR Mix（含酶）	6 μL	6 μL
含 Cy5-dUTP 的 dNTP，2.5 mM each	5 μL	不加
dNTP Mix，2.5 mM each	不加	5 μL
若双链标记，加引物一和引物二； 若单链标记，只加一条引物	各 50 pmol	各 50 pmol
胶回收所得 PCR 产物	10 ng（对双链标记） 100 ng（对单链标记）	10 ng（对双链标记） 100 ng（对单链标记）
超纯水	补到 50 μL	补到 50 μL

6. 由于此步所用的 PCR 引物和第 3 步的 PCR 引物完全一样，故可以参考第 3 步 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，使扩增得到的探针 DNA 片段参差不齐，杂交时这种 DNA 能形成网络结构，杂交效果比长度整齐的 DNA 更好；二是延伸步骤的时间增加 15 秒，因为标记 dUTP 掺入到 DNA 的速度比常规的 dTTP 慢，增加延伸步骤的时间可以保证更多的标记 dUTP 掺入到合成的 DNA 探针中；三是降低复性温度 5-7℃，因为标记核苷酸掺入到 DNA 后，含标记核苷酸的 DNA 的 Tm 值将比正常的 DNA 低。

7. PCR 结束后，取标记 PCR 反应液和对照反应液 3-5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳（必须用浓度已知的 DNA marker），检测标记是否成功。由于标记 DNA

	含有额外的标记物、分子量更大，其泳动速度将慢于常规 PCR 产物。 8. 探针的定量：电泳所用的 DNA marker 浓度已知（如果不确定，可以问供应商），上样体积已知，故上样量已知，就可通过双链探针 DNA 和 DNA marker 对应条带的相对亮度来估计探针 DNA 浓度。例如，如果探针长度为 500 bp，而 marker 中 500 bp 这条带的浓度是 10 ng/μL，共上样 10 μL，则 500 bp 这条带的上样量为 100 ng。标记的探针 DNA 在紫外下亮度只有它的一半，则探针 DNA 的上样量为 100/2=50 ng，如果上样量是 5 μL，则探针的浓度是 50/5=10 ng/μL。但是，如果制备的是单链 DNA 探针，则不能按此法估计浓度，因为单链 DNA 结合核酸染料（如 EB 和 SYBR GreenI）的能力远低于双链 DNA。但可采用银染法定量（跟 marker 比较）。一般 100 ng 模板经单链标记 PCR 扩增可得到 700 ng 左右的单链探针。 9. 单链 PCR 标记产物可不经纯化直接加到杂交液中，双链 PCR 标记产物需加热到 95-100℃ 5 分钟变性然后放冰上急冷后再加到杂交液中使用。 10. 如果探针不立即使用，需要放-20℃长期保存，不能放常温保存，否则 Taq DNA 酶的残留的外切酶活性会降解探针 DNA。如果需要纯化探针 DNA，请使用本公司的核酸探针纯化试剂盒（排阻层析法）（编号 220887）。
疑难解答	问题：这个合成的标记 DNA 探针能不能用来做 DNA pull down? 回答：可以。但由于标记核苷酸的掺入是随机的，大部分探针的结合位点处的核苷酸是不带标记分子的，但有少数探针该区域是带标记分子的，它们肯定会干扰该 DNA 区域与蛋白的结合，故实验时可能需要加入更多的探针 DNA。具体用量需要自行优化。
关联产品	DNA 探针生物素标记试剂盒（PCR 法）