天净沙系列

CAT#：210703

低温运输，-20℃保存

天净沙

DNA 探针荧光素标记试剂盒（PCR 法）

DNA Probe Fluorescein 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 进行荧光素标记的原理是用带荧光素标记的 dNTP 进行 PCR，这些 dNTP 掺入到 PCR 产物中之后，扩增得到的 DNA 片段自然就带有荧光素标记，可以直接用于杂交试验。本产品就是基于上述原理开发，它具有下列特点：

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标记条件。
2. 优化的荧光素掺入率，能有效降低探针中荧光素分子之间的可能空间阻碍，检测效果佳。
3. 所得的荧光素标记 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，也可以用于单链 DNA 探针。
5. 一次标记反应可以得到μg 级的荧光素标记双链 DNA 探针或约 700 ng 荧光素标记的单链 DNA 探针，足够多次杂交实验用。
6. 本产品足够 5 次非标记 PCR 反应和荧光素标记 PCR 反应（均指 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)	210701a	60 μL	0.5 mL 红盖管
dNTP Mix，2.5 mM each	210701b	25 μL	0.5 mL 白盖管
含荧光素-12-dUTP 的 dNTP，2.5 mM	210703a	25 μL	0.5 mL 绿盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	210703sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备物品

DNA 模板和模板专一性引物，常规 PCR Mix。

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。过短则荧光素标记掺入少，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 试剂盒按下表设置 50 μL 的常规 PCR 反应以制备标记 PCR 模板：

成份	加入量
自备的 2×PCR Mix（含酶含的 NTP)	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。扩增 1 Kb 的 DNA 片段的可用此 PCR 参数作参考：(95℃ 10 秒，55℃ 30 秒，72℃ 1 分)30 个循环。

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，避免这些引物对后续的标记 PCR 反应的干扰。

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 和 5 次常规 PCR 对照)。

成份	标记 PCR	常规 PCR
标记专用 PCR Mix（含酶）	6 μL	6 μL
含荧光素-12-dUTP 的 dNTP, 2.5 mM	5 μL	不加
dNTP Mix，2.5 mM	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
胶纯化所得 PCR 产物	10 ng（对双链标记） 100 ng（对双链标记）	10 ng（对双链标记） 100 ng (对双链标记）
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℃，因为标记核苷酸参入到 DNA 后，含标记核苷酸的 DNA 的 Tm 值将比正常的 DNA 降低。 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（一定要使用浓度已知的 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 Green I）的能力远低于双链 DNA。但可以采用银染法定量（跟 marker 比较）。一般 100 ng 模板经单链标记 PCR 扩增可得到 700 ng 左右单链探针。 9. 单链 PCR 标记产物可以不经过纯化直接加入到杂交液中，双链 PCR 标记产物需要加热到95-100℃ 5分钟变性然后放冰上急冷后再加入到杂交液中使用。 10. 如果不立即使用，需要放-20℃长期保存，不能放常温保存，否则 Taq DNA 酶有残留的外切酶活性，探针 DNA 可能会被降解。如果需要纯化，请使用乙酸铵/乙醇沉淀法纯化（参考分子克隆手册）。
关联产品	柱式探针纯化试剂盒