天净沙系列

CAT#:230102

低温运输，-20℃保存

天净沙

# PCR 法 DNA 探针标记试剂盒(不含标记底物)

# PCR DNA Probe Labeling Kit

## 使用手册 V1.0

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

## 产品及特点

PCR 标记的原理是用带标记的 dNTP 进行 PCR,最后得到的 PCR 产物将带有标记，可以直接用于杂交试验。本产品就是基于上述原理的基础上开发，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。
2. 一次标记可以得到μg 级的双链 DNA 探针或约 700 ng 的单链 DNA 探针，足够多次杂交实验用。
3. 既可用于制备双链探针，也可以用于单链探针。
4. A 型需自备含标记核苷酸的 dNTP，B 和 C 型分别含生物素和地高辛标记的底物。可用的自备标记底物包括 fluorescein-dUTP、hydroxycoμmarin-dUTP、resorμfin-dUTP 和 aminoallyl-dUTP 等。
5. 掺入率一般为 4-5%，有效降低了空间阻碍，检测效果最佳。
6. 标记探针可以用于 Southern 和 Northern Blot、原位杂交、菌落和斑点印迹杂交等分析。
7. 足够 10 次 50 μL 体系的常规 PCR（用于制备标记反应的模板和设置对照反应）和 5 次 50 μL 体系的标记反应。
8. 本产品只能用于科研。

## 规格及成分

本产品使用 5 孔盒包装

| 名称 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| 标记专用 PCR Mix(含酶) | 210701a | 500 μL | 0.5 mL 红盖管 |
| dATP，10 mM each | 220859 | 50 μL | 0.5 mL 白盖管 |
| dTTP，10 mM each | 220862 | 50 μL | 0.5 mL 绿盖管 |
| dGTP，10 mM each | 220860 | 50 μL | 0.5 mL 黄盖管 |
| dCTP，10 mM each | 220861 | 50 μL | 0.5 mL 本色管 |
| 使用手册 | 230102sc | 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 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。过短则地高辛标记掺入少，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 为模直接进行 PCR 标记反应。

3. 四种 10 mM 的 dNTP 是分开提供，用于制备 50 μL 非标记 dNTP（2 mM each，用于非标记 PCR，用于制备标记 PCR 的模板。配制方法是四种 10 mM 的 dNTP 各加 10 μL，再加水 10 μL 即可）和 25 μL 标记 dNTP（2 mM each，其中标记核苷酸和对应的非标记核苷酸的比例需要自行优化，假如是 biotin 或 DIG 标记的是 dUTP，则其对应的非标记核苷酸是 dTTP，两者的最佳比例一般为 1:3；如果是 BrdUTP，则两者的最佳比例为 1:1。配制方法是三种 10 mM 的 dNTP 各加 5 μL，再加标记核苷酸和其对应的标记核苷酸使其总的终浓度为 2 mM，再补水到 25 μL 即可）。

**二：非标记 PCR 产物的制备**

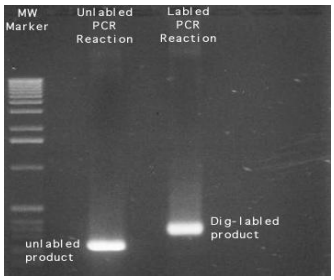
1. 设置 50 μL 非标记 PCR: 2×标记专用 PCR Mix 25 μL，dNTP Mix (2 mM each) 5 μL，自备的探针引物（10 pmol/μL）各 1 μL，1 μg 基因组 DNA 或 1 ng 质粒 DNA，补超纯水到 50 μL。
2. 按已经优化的 PCR 参数进行常规 PCR。
3. 胶回 PCR 产物并定量，胶回收可以避免残留引物干扰后续的标记 PCR。

**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。

| 成份 | 样品 | 非标记对照 |
|---|---|---|
| 2×标记专用 PCR Mix | 25 μL | 25 μL |
| 含标记核苷酸的 dNTP Mix（自备） | 5 μL | 不加 |
| dNTP Mix，2 mM | 不加 | 5 μL |
| 若单链标记：加探针引物其一 | 50 pmol | 50 pmol |
| 若双链标记：加探针引物一和引物二 | 各 50 pmol | 各 50 pmol |
| 胶纯化所得 PCR 产物<br>（单链标记可用 100 ng 模板） | 10 ng | 10 ng |
| 超纯水 | 补到 50 μL | 补到 50 μL |

1. 按第 5 步的 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。由于模板为纯化后的 PCR 产物，探针对扩增长度完整性要求不高（长度不均的探针由于能形成网络结构，效果反而更好），所以可以增加循环数；二是延伸时间增加 15 秒，因为标记 dUTP 参入到 DNA 的速度比常规的 dTTP 慢；

| | |
|---|---|
| | 三是降低复性温度 5-7℃，因为标记核苷酸参入到 DNA 后，新模板的 Tm 值将降低。<br>2. 标记探针的定量：取标记反应液和对照反应液 1-5 μL，在琼脂糖凝胶上跟浓度已知的 DNA Marker 一起电泳，并判断探针的浓度。由于标记产物中额外带有生物素，地高辛等、其泳动速度将慢于非标记 PCR 产物（但同位素标记不能用此法）。下图是一个典型的双链 PCR 产物电泳结果图：<br><br><br>标记的 DNA（右）与未标记的 DNA（左）电泳比较 |
| **关联产品** | DNA 探针生物素标记试剂盒（PCR 法） |