天净沙系列

CAT#:220315

低温运输、-20℃保存

随机引物法 DNA 探针生物素标记试剂盒

DNA Probe Biotin Labeling Kit(Random Primer Method)

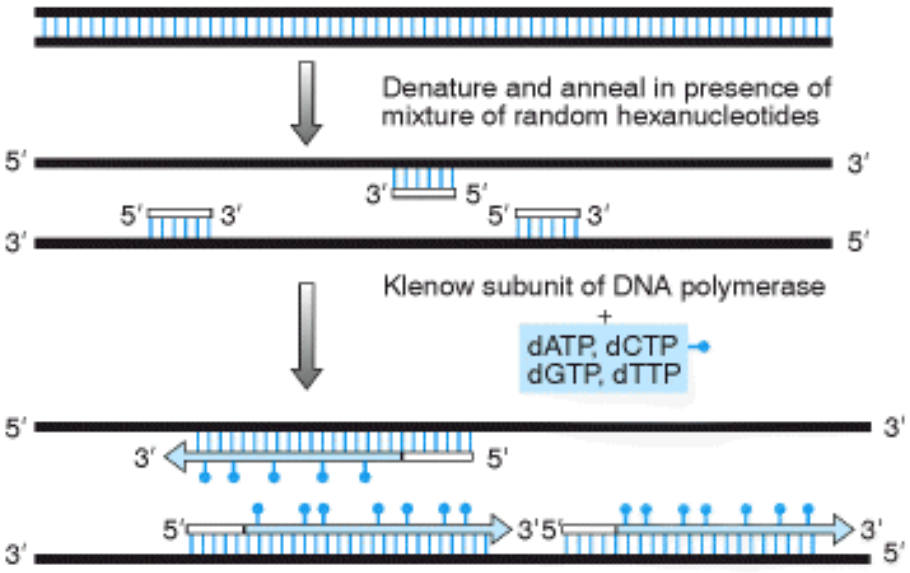
使用手册 V1.0

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

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，探针产量更高。
3. 快速，最快 1 小时即可完成标记反应。
4. 所需模版 DNA 量少，模板可以是线状或环状的、也可以是单链或双链的，但长度必须在 100 bp 以上。
5. 得到的探针长度一般在 200-400 nt 之间（如果模板长度在 1kb 以上），可以用于 Southern 杂交、Northern 杂交、原位杂交、菌落和斑点印迹杂交等。
6. 本产品足够 5 次 DNA 模板的生物素标记实验。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
2×随机引物生物素标记反应液	220315a	50 μL	0.5 mL 绿盖管
Klenow exo-聚合酶，2 U/uL	220315b	5 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管

	使用手册	220315sc	1 份	无
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。			
自备试剂	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×随机引物生物素标记反应液	10 μL
超纯水	补水到 19 μL

注意：非同位素标记基团（如生物素和地高辛）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，否则没有标记的模板 DNA 在杂交时会竞争性地抑制标记 DNA 跟靶分子的杂交，反而降低杂交信号强度。

2. 沸水浴 10 分钟，或在 PCR 仪上 100℃加热 10 分钟彻底变性模板 DNA，结束后需要立即放冰上待用。不能缓慢降温，否则变性的模板 DNA 单链又会杂交形成双链。
3. 离心数秒使所有液体集中在管底，再加入 1 μL Klenow exo DNA 聚合酶。
4. 轻柔吹打混匀。如有液滴沾在管壁上，离心数秒使所有液体集中在管底。
5. 37℃保温 1-20 小时。标记效率跟模板量和保温时间相关，杂交需要一定量的探针，同时在杂交时探针模板比越高，没有标记的模板 DNA 对杂交的竞争性抑制越低。用户需要在这两者之间进行折衷选择。具体可以参考下表：

模版 DNA 用量 (ng)	1 小时后探针合成量 /探针模板比	20 小时后探针合成量 /探针模板比
10	80 ng/8	900 ng/90
30	150 ng/5	1350 ng/45
100	350 ng/3.5	1650 ng/16.5
300	750 ng/2.5	2200 ng/7.3
1000	1300 ng/1.3	2600 ng/2.6
3000	1600 ng/0.53	2600 ng/0.87

6. 反应结束后加热 100℃ 5 分钟使 DNA 聚合酶变性，同时使 DNA 探针变性成单链。变性后的标记反应液可以放-20℃长期保存，也可以直接加入到杂交反应液中进行杂交。如果电泳检测，标记产物将是弥散状态。

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，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（如生物素或

	地高辛等）疏水性强，能使标记的 DNA 进入疏水的有机相而丢失。只能选择乙醇直接沉淀或 Sephadex G50 过柱回收（需另购柱式探针纯化试剂盒）。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。