天净沙系列

CAT#:220567

低温运输，-20℃保存

天净沙

高效核酸杂交液（不含甲酰胺）

Super Nucleic Acid Hybrid Solution(Formamide Free)

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

核酸杂交一般是指用一种标记的核酸探针与印迹膜上的核酸进行杂交，由此检测印迹膜上是否存在与探针同源的核酸分子（靶分子）。核酸杂交是分子生物学的基本技术之一，应用非常广泛。由于核酸杂交效率受印迹膜种类、杂交温度、探针浓度、杂交液离子强度、杂交液 pH 及杂交液粘度等因素影响，用户自己摸索和优化相关条件非常繁琐，因此本公司开发了不含甲酰胺的高效核酸杂交液，它具有下列特点：

1. 既可用于 Southern 杂交（靶分子为 DNA），也可用于和 Northern 杂交（靶分子为 RNA），还可以用于菌落杂交，基因芯片等杂交。
2. 既可以用于同位素探针的杂交，也可以用于非同位素探针的杂交。
3. 既可以使用 DNA（包括 DNA Oligo）探针，也可以使用 RNA 探针（包括 RNA Oligo）。
4. 含多种能够促进杂交的聚合物，使杂交反应能在 6~12 小时完成，而常规杂交反应一般需要 12~24 小时。
5. 含多种封堵剂，能阻印迹膜对探针分子的非特异性吸附，能有效降低背景信号，延长曝光时间以便检测到低拷贝的 RNA（Northern）和单拷贝的基因（Southern）。
6. 跟各种常用的印迹膜兼容，包括硝酸纤维素膜和尼龙膜。
7. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
高效核酸杂交液（不含甲酰胺）	220567	100 mL	125 mL 本色瓶
使用手册	220567sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。本产品属于高盐溶液，低温下产生沉淀，必须在 65℃加热溶解并充分摇匀后才能使用。

自备试剂

印迹膜、标记探针、6× SSC、2× SSC、0.1× SSC

使用方法

一、根据探针和靶分子的不同，分别按下面不同情况计算杂交分子的 Tm 值

1. 对 DNA-DNA 杂交，其 Tm = 81.5 + 16.6 × log10[Na^+] + 0.41 × GC% - 500/L

   说明：L 是探针或靶分子的长度（用两者中最短的一个）

   GC%是探针或靶分子中的 GC 百分比（用两者中最短的一个）

   Na^+浓度是本产品中 Na^+的浓度，为 0.75 M，16.6 × log10[Na^+] = (-2.07)
2. 对 DNA-RNA 杂交，其 Tm 值比 DNA-DNA 的 Tm 值要高 10-15℃。
3. 对 RNA-RNA 杂交，其 Tm 值比 DNA-DNA 的 Tm 值要高 20-25℃。

4. 对 Oligo 探针杂交，Tm = GC 数量 × 4℃ + AT 数量 × 2℃。

二、确定最佳杂交温度（预杂交温度跟杂交温度应该一样）

5. 对于大于 200 bp 的 DNA-DNA 杂交，最佳杂交温度一般比 Tm 低 15-25℃，一般选择 68℃。
6. 对 RNA-RNA 或 DNA-RNA 杂交，最佳杂交温度一般比 Tm 低 15-25℃。如果这样计算出的杂交温度很高（如高于 70℃），则 RNA 容易降解。
7. 对 Oligo 探针的杂交，最佳杂交温度一般比 Tm 低 5℃。由于 Oligo 较短，更容易受各种因素影响（如错配率、修饰碱基比例等），所以最佳温度需要适度摸索和优化。

三、确定洗膜温度

8. 一般使用 0.1× SSC 做洗膜液，在此条件下的最佳洗膜温度比 Tm 低 5-12℃，一般情况下可以在 55℃进行洗膜。Oligo 探针可以室温洗膜。

四、预杂交步骤

9. 预杂交就是用不含探针的本产品跟印迹膜进行孵育，其目的是用所含的非特异性 DNA 分子(鲑精 DNA 或小牛胸腺 DNA)及其它高分子化合物将印迹膜上会非特异地吸附探针分子的位点封闭，否则这些位点会吸附标记的探针，造成高背景。
10. 将结合了靶分子的硝酸纤维素印迹膜或尼龙印迹膜浸泡于自备的 6× SSC 溶液中，使其充分湿润。
11. 将湿润的印迹膜置于一塑料杂交袋中(塑料袋最好预先封口，再剪掉一角，留一个小口)，按每平方厘米印迹膜加 0.2 mL 高效核酸杂交液的比例沿小口加入高效核酸杂交液，然后用塑料封口机将口封牢。
12. 将此塑料袋浸没入温度设定在最佳杂交温度的恒温水浴中或杂交炉中，保温 1-2 小时，延长到 12-16 小时亦可。注意保温过程中塑料袋应在不停的摇动状态中，使高效核酸杂交液与印迹膜充分接触。

五、杂交步骤

13. 如果标记的探针是双链核酸，则需经变性处理。具体操作是将探针样品在沸水浴中加热 5 分钟，然后迅速置冰浴中。如果是单链 DNA 或 RNA 探针，则不需变性，直接使用。
14. 将单链探针或变性后的双链探针加入到完成了预杂交的杂交袋中（先用剪刀剪一小口，加入探针后用热封机封口）。探针的加入量视探针标记效率而定，一般要求终浓度不能低于 1-2 ng/mL。如果检测基因组中的单拷贝基因，探针的加入量应加大，而对于检测克隆的基因片段，则探针的量可减少。如果是放射性探针，应将此塑料袋套在另一塑

	料袋之中，以避免杂交袋发生遗漏、污染工作环境。 15. 在选定的杂交温度下继续保温，时间一般为 6-12 小时。 **六、洗膜步骤** 16. 注意在下面的所有操作过程中，一定不要使印迹膜干燥。此步是将与印迹膜非特异结合的探针分子洗去而只留下特异结合的探针分子。由于非特异性杂交的杂交分子解链温度较低，热稳定性较差，在一定的温度和较低的离子强度下，即可洗掉。 17. 杂交完毕，取出塑料袋，剪去一角，倒出所有的含探针的杂交液。此含探针的杂交液可以多次使用再倒弃。 18. 剪开杂交袋，用镊子取出印迹膜，浸没于大量的 2× SSC（含 0.5% SDS）溶液中，室温下振荡漂洗 15 分钟。 19. 重复上步操作一次。 20. 将印迹膜转移至 0.1× SSC（含 0.1% SDS）溶液中，在计算好的洗膜温度下振荡漂洗 30 分钟至 1 小时。 21. 重复上步操作一次。如果是同位素标记探针，则需要重复至用盖革计数器在无核酸区域检测不出放射信号为止。 22. 将印迹膜转移到滤纸上，吸去表面液体后印迹膜即可用于后续检测。
关联产品	高效核酸杂交液（Oligo 探针杂交用）