天净沙系列

CAT#:220316

低温运输、-20℃保存

天净沙

随机引物法 DNA 探针地高辛标记试剂盒

DNA Probe DIG Labeling Kit(Random Primer Method)

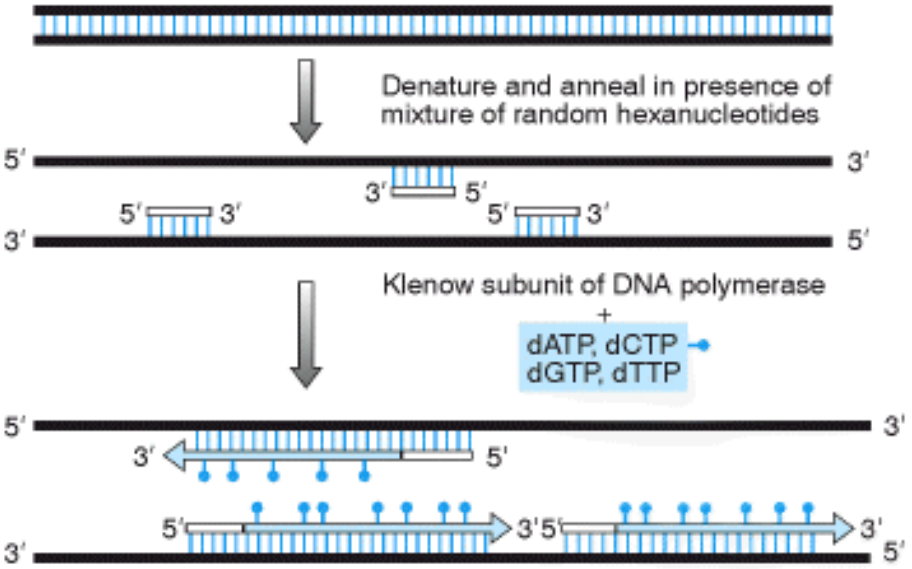
使用手册 V1.0

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 1 kb 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 探针地高辛标记实验。
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
5×随机引物地高辛标记反应液	220316a	20 µL	0.5 mL 绿盖管
随机引物(6 碱基，无修饰)干粉	220574	5 次	0.5 mL 本色管
Klenow 片段 (3-5 exo－)，5 U/µL	221021	5 µL	0.5 mL 红盖管

超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	220316sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

模板 DNA。

使用方法

1. 首次使用本产品时，需要在随机引物干粉管子中加入 25 μL 超纯水，涡旋震荡 30 秒，短暂离心 10 秒。得随机引物溶液，放冰上待用。
2. 在一干净的塑料离心管中加入下列成分：

成分	用量
模板 DNA (PCR 回收片段,长度 100-1000 bp)	50-150 ng
5×随机引物地高辛标记反应液	4 μL
随机引物溶液	4 μL
超纯水	补水到 19 μL

注意：模板 DNA 并非越多越好，因为模板 DNA 没有标记，新合成的 DNA 才带有标记，因此模板 DNA 越多，在杂交反应时这些没有标记的 DNA 对标记 DNA 的竞争性抑制就越强，最后降低杂交信号强度。

3. PCR 仪上 100℃加热 10 分钟使模板 DNA 彻底变性。
4. 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。
5. 离心数秒使所有液体集中在管底。
6. 加入 1 μL Klenow 片段 (3-5 exo－，5 U/μL)，轻柔吹打混匀。此时反应总体积为 20 μL。
7. 37℃保温 1-20 小时。标记效率跟模板 DNA 和保温时间相关，模板越多，新合成探针多，但新合成探针/模板比例低，杂交信号低。模板越少，新合成探针少，但探针/模板比例高，杂交信号高。但探针少到一定程度，也不会有杂交反应发生。因此用户需要探针合成量和杂交信号强弱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/模板比例)	20 小时后探针合成量 (探针/模板比例)
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）

8. 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，也可以直接将变性后的探针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）。

相关产品 柱式探针纯化试剂盒。