

Code No. 6045

研究用

TaKaRa

Random Primer
DNA Labeling Kit Ver.2

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 原 理	1
● 使用方法	2
● 模板 DNA 用量的影响	3
● DE81-亲和力分析对掺入量的测定	3
● 参考文献	4
● 关联产品	4

● 制品说明

本试剂盒利用 [α - 32 P]或 3 H]dCTP 标记 DNA, 制备具有高比活性的杂交用 DNA 探针。本试剂盒的设计以 Feinberg 和 Vogelstein^{1)、2)}法为基础加以改进, 利用 9 个碱基的随机寡聚核苷酸引物和 *E.coli* DNA Polymerase I 的 Exonuclease-free Klenow Fragment (无 3' → 5' 外切酶活性), 在短时间内 (2-3 分钟) 即能得到比活性为 1×10^9 dpm/ μ g 的探针。它克服了表 1 中切口平移法的许多缺点。

● 制品内容

Random Primer (9 mer)	60 μ l
10 \times Buffer	75 μ l
dNTP Mixture (dGTP, dATP, dTTP 各 0.2 mM)	75 μ l
Exo-free Klenow Fragment (2 U/ μ l)	30 μ l
Control DNA solution (λ -Hind III Fragment (25 ng/ μ l))	10 μ l

试剂盒外所需试剂

灭菌水

TE buffer(10 mM Tris-HCl,pH8.0 和 1 mM EDTA)

标记的 dCTP solution; 本试剂盒设计使用 [α - 32 P]dCTP (~111 TBq/mmol), 也可使用 [3 H]dCTP。

● 保 存: -20 $^{\circ}$ C。

● 原 理

利用杂交法检定具有特异序列的 DNA 时, 必须使用高比放射活性的 DNA 探针。Feinberg 和 Vogelstein^{1)、2)}发表的随机引物标记法从少量 DNA(10-20 ng)制得的探针具有很高的比活性。原理如图 1 所示。首先通过热变性使模板 DNA 变为单链 DNA, 然后使随机引物与单链 DNA 退火, 再利用 Klenow Fragment 合成互补链形成标记和未标记的核苷酸。

表 1

	切口平移法	随机引物法
反应时间	延长反应时间会降低标记效率。	短时间内即可得到高比活性的探针。即使反应时间延长也不受影响。
探针比活性	$\sim 10^8$ dpm/ μ g	$\sim 10^9$ dpm/ μ g
模板纯度	琼脂糖等抑制反应	琼脂糖对反应没有影响
反应后纯化	需要除去未反应的 dNTP	不需要除去未反应的 dNTP
模板量要求	≥ 1 μ g	≥ 25 ng

以上对比数据的依据: 以 50 μ Ci 的 [α - 32 P]dCTP(370 MBq/ml)标记 λ -Hind III Fragment, 以此为模板进行多重对照实验。

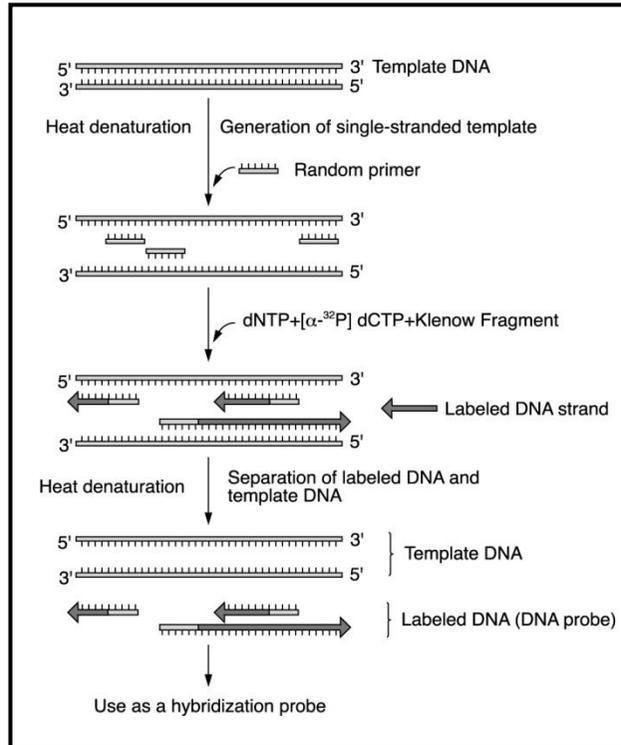


图 1. Random Primer Labeling 原理

● 使用方法

1. 在微量离心管中配制下列反应液，用灭菌水或 TE buffer 加至总量为 14 μ l。

模板 DNA	10 ng~1 μ g ^{*1}
Random Primer	2 μ l
灭菌水或 TE Buffer	up to 14 μ l

2. 95°C加热 3 分钟后迅速置于冰中冷却，放置 5 分钟。
3. 加入 2.5 μ l 的 10×Buffer，2.5 μ l 的 dNTP Mixture，5 μ l 标记的 dCTP^{*2}(1.85 MBq, 50 μ Ci)。
4. 加入 1 μ l Exo-free Klenow Fragment，37°C反应 10 分钟^{*3}。
5. 65°C加热 5 分钟使酶失活或者加入 EDTA 使其终浓度为 30 mM。
6. 95°C加热 3 分钟后迅速置于冰中冷却。
7. 取适量的反应液直接作为探针使用（如果需要，可用凝胶过滤法或乙醇沉淀法除去未反应的标记用 dCTP）。

*1 长度大于 300 bp 的模板 DNA 适合使用本试剂盒标记。低于 300 bp 的建议使用用于 5' 末端标记的 MEGALABEL (Code No. 6070) 试剂盒。

低熔点琼脂糖凝胶中的 DNAs 可以直接使用而不需除去琼脂糖。合适的有 PrimeGel™ Agarose LMT 1-20K GAT (Code No. 5806A) 或 PrimeGel Agarose LMT PCR-Sieve GAT (Code No. 5815A)。操作方法如下：

- (1) 琼脂糖凝胶电泳后，将含有目的 DNA 片段的胶块切出。
- (2) 加入 3 倍于胶块重量的灭菌水。
- (3) 65°C加热使胶块融解。
- (4) 取约含 25 ng DNA 的溶液直接作为 DNA 模板进行反应。

*2 在本试剂盒中使用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ($\sim 111\text{ TBq/mmol}$, 370 MBq/mL) 来标记 DNA, 但同样也可以使用 $[\text{H}^3]\text{dCTP}$ 。当使用 dATP 进行标记时, 使用含 dGTP, dCTP 和 dTTP 各 0.2 mM 的溶液来替代试剂盒中的 dNTP 混合液。

*3 反应时间为 2~3 分钟时即可得到较高比活性的探针。反应时间为 10~20 分钟时能够获得比活性最高的探针。此外即使进行过夜反应, 摄入率也不太降低。(见图 2)

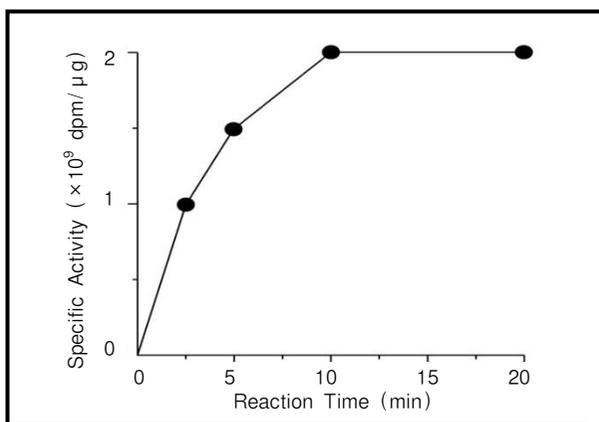


图 2. 反应时间与探针比活性的关系
(Template DNA: $\lambda\text{-Hind III}$ 片段 25 ng)

● 模板 DNA 用量的影响

模板 DNA 量 (ng)	10	25	100	1000
探针比活性 (dpm/ μg)	3.0×10^9	1.9×10^9	0.68×10^9	0.77×10^9

以 $\lambda\text{-Hind III}$ Fragment 为模板, 使用 1.85 MBq ($50\ \mu\text{Ci}$) 的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (111 TBq/mmol , 370 MBq/mL) 进行 DNA 标记。

● DE81-亲和力分析对掺入量的测定

1. 用 TE buffer 或灭菌水 20 倍稀释反应混合液。
2. 取 $3\ \mu\text{l}$ 稀释液, 分别点在两张 DE81 纸片上 (Whatman) 并干燥。
3. 取一张 DE81 纸片, 用 100 ml 5% 的磷酸钠反复洗涤 6 次, 每次 5 分钟, 再用灭菌水洗涤两次, 每次 1 分钟, 乙醇再清洗两次之后干燥。用液体闪烁计数器测量放射性。
4. 测量另一张 DE81 纸片上的放射性。
5. 摄入量与探针的比活性通过以下公式计算:

$$\text{摄入量 (\%)} = \frac{\text{count of washed DE81 disc: cpm}}{\text{count of unwashed DE81 disc: cpm}} \times 100$$

$$\text{理论产量 (ng)} = \frac{\mu\text{Ci added} \times 4 \times 330\text{ ng/nmol}}{\text{dNTP 的比活性} (\mu\text{Ci/nmol})}$$

如果使用推荐量的标记 dCTP ($50\ \mu\text{Ci}$ 的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 比活性 3000 Ci/mmol), 标记探针的理论产量将会达到 22 ng 。

$$\text{探针总量 (ng)} = \text{模板 DNA (ng)} + \text{摄入量} \times \text{理论产量} \times 10^{-2}$$

$$\text{探针比活性 (dpm}/\mu\text{g}) = \frac{2.2 \times 10^6 \times \mu\text{Ci added} \times \text{摄入量} \times 10^{-2}}{\text{探针总量 (ng)} \times 10^{-3}}$$

● 参考文献

- 1) Feinberg A P and Vogelstein B. *Anal. Biochem.* (1983) **132**: 6–13.
- 2) Feinberg A P and Vogelstein B. *Anal. Biochem.* (1984) **137**: 266–267.
- 3) Clark J M , Joyce C M, and Beardsley G P. *J Mol Biol.* (1987) **198**: 123–127.

● 关联产品

DNA 标记相关产品

*Bca*BEST™ Labeling Kit (Code No. 6046)

MEGALABEL™ (Code No. 6070)

PrimeGel, MEGALABEL, and *Bca*BEST are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201811Da