

Code No. 6046

研究用

---

**TaKaRa**

*Bca*BEST™ Labeling Kit

---

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
● 操作方法	2
● 探针比活性和模板 DNA 量的关系	3
● 摄入率、比活性的测定	3
● 参考文献	4

## ● 制品说明

*BcaBEST*<sup>™</sup> Labeling Kit 是一种在 DNA 上标记 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]、<sup>3</sup>H] dCTP 后, 可在短时间内合成 DNA 探针的试剂盒。本试剂盒的设计以 A.P.Feinberg 和 B.Vogelstion 法为基础并对其进行了改良, 操作十分简便, 合成后的探针比活性高。目前我们经常使用的 Klenow fragment 存在反应时间长、对 GC 含量高的 DNA 模板或具有高级结构的 DNA 摄入效率低等缺点。*Bacillus caldotenax* 来源的 *BcaBEST*<sup>™</sup> DNA Polymerase 是一种耐热性的、高延伸性的 DNA 聚合酶。*BcaBEST*<sup>™</sup> DNA Polymerase 和随机引物 (9-mer) 在 50°C~55°C 条件下反应 10 分钟, 即可对具有高级结构的 DNA 模板进行标记。

*BcaBEST*<sup>™</sup> DNA Polymerase 具有优良的延伸性, 与 Klenow fragment 相比, 可以合成更长的探针, 同时因 *BcaBEST*<sup>™</sup> DNA Polymerase 不具备 exonuclease 活性, 反应时间长也不会导致摄入效率下降 (表 1)。

表 1. 与 Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 比较

	<i>BcaBEST</i> Labeling Kit	Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2
反应时间	10 分钟	10 分钟
探针的比放射活性	~10 <sup>9</sup> dpm/μg	~10 <sup>9</sup> dpm/μg
模板 DNA	不受高级结构、GC 含量的影响	高级结构或 GC 含量高时可导致摄入效率下降

注: 两种试剂盒使用 300 bp 以下的 DNA 模板时, 可导致摄入效率下降。

## ● 制品内容 (40 次量)

Random Primer (9 mer)	80 μl
10× Buffer	100 μl
dNTP Mixture (dGTP, dATP, dTTP) (各 0.2 mM)	100 μl
<i>BcaBEST</i> <sup>™</sup> DNA Polymerase (2 U/μl)	40 μl
Control DNA ( $\lambda$ - <i>Hind</i> III fragment) (25 ng/μl)	10 μl

### 【试剂盒以外所需试剂】

1. 灭菌水
2. TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA)
3. 标记用 dCTP 溶液

该试剂盒设计用于 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (111 TBq/mmol, 370 MBq/ml) \*,

同时也可以使用 [<sup>3</sup>H] dCTP。使用 [<sup>3</sup>H] dCTP 时, 将标记的 dCTP 的量调整至 16.5 pmol。

\* 现在的名称是 dCTP, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-3000 Ci/mmol 10 mCi/ml。

## ● 保 存

-20°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 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, 并且可以直接在低熔点琼脂糖凝胶中标记 DNA 片段。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 *BcaBEST* DNA Polymerase 合成互补链形成标记和未标记的核苷酸。

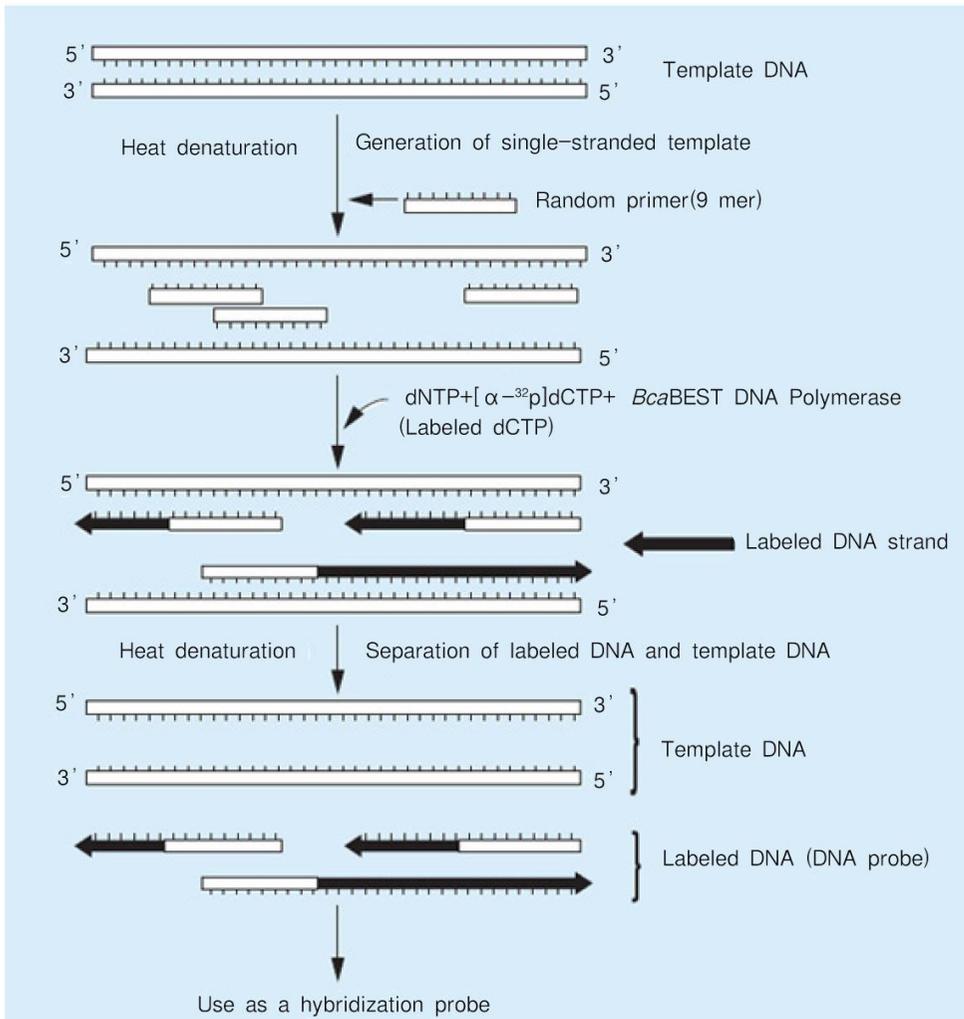


图 1. *BcaBEST*<sup>™</sup> Labeling Kit 的原理

## ● 操作方法

1. 在微量离心管中配制下列反应液。

试剂	使用量
模板 DNA* <sup>1</sup>	10 ng~1 μg
Random Primer	2 μl
H <sub>2</sub> O (或 TE Buffer)	up to 14 μl

2. 95°C加热 3 分钟后迅速置于冰中冷却，放置 5 分钟。

3. 在 2. 的微量离心管中按下列顺序加入各种试剂配制反应液。

试剂	使用量
10× Buffer	2.5 μl
dNTP Mixture	2.5 μl
111 TBq/mmol[α- <sup>32</sup> P] dCTP* <sup>2</sup>	5 μl *
<i>BcaBEST</i> <sup>™</sup> DNA Polymerase	1 μl

\* 5 μl=1.85 MBq, 50 μCi。

4. 50°C~55°C反应 10 分钟\*3。
5. 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、Spin Column（NucleoSpin Gel and PCR Clean-up: Code No. 740609.10/.50/.250）或乙醇沉淀法除去未反应的 dCTP）。

**\*1 模板 DNA**

使用本试剂盒时，DNA 模板可以直接使用低熔点琼脂糖凝胶中的 DNA，无需除去琼脂糖（可以使用 PrimeGel™ Agarose LMT 1–20K GAT（Code No. 5806A）和 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 标记用 dCTP**

在本试剂盒中使用[α-<sup>32</sup>P]dCTP（111 TBq/mmol, 370 MBq/ml）来标记 DNA，同样也可以使用 [<sup>3</sup>H]dCTP。使用 [<sup>3</sup>H] dCTP 时，dCTP 的浓度调整至 16.5 pmol。

另外使用 dATP 进行标记时，dNTP Mixture 的组成应配制为 dGTP、dCTP、dTTP 各 0.2 mM。

**\*3 反应时间**

反应时间为 10 分钟即可得到较高比活性的探针。

摄入率较低时，可延长反应时间至过夜反应。

进行过夜反应很少出现摄入率的下降。

**● 探针比活性和模板 DNA 量的关系**

模板 DNA 量 (ng)	10	25	100	1000
探针比活性 (dpm/μg)	2.9 × 10 <sup>9</sup>	1.8 × 10 <sup>9</sup>	0.68 × 10 <sup>9</sup>	0.78 × 10 <sup>8</sup>

\* 以 λ-Hind III 为模板，使用 5 μl (1.85 MBq, 50 μCi)的[α-<sup>32</sup>P]dCTP(111 TBq/mmol, 370 MBq/ml) 进行 DNA 标记。

**● 摄入率、比活性的测定**

1. 取少量反应液，用 TE Buffer 或灭菌水稀释 20 倍。
2. 将 3 μl 稀释后的反应液分别点加在两张 DE81 paper disc(GE Healthcare)上，风干。
3. 其中一张 DE81 paper disc 用 100 ml 的 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 每隔 5 分钟清洗一次，共清洗 6 次，再用灭菌水每隔一分钟清洗一次，共 2 次，最后用乙醇清洗 2 次，风干。
4. 未清洗过的 DE81 paper disc 与清洗过的 DE81 paper disc 分别用液体闪烁计数器测定放射线量。
5. 根据下列算式计算出摄入率和探针比活性。

$$\text{摄入率 (\%)} = \frac{\text{洗净的 DE81 disc count; cpm}}{\text{未洗净的 DE81 disc count; cpm}} \times 100$$

$$\text{探针总量 (ng)} = 0.22 \times \text{摄入率 (\%)} + \text{模板 DNA 量 (ng)}$$

$$\text{探针比活性 (dpm/μg)} = \frac{110 \times \text{摄入率 (\%)} \times 10^7}{\text{探针总数; ng}}$$

## ● 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) Uemori, T., Ishino, Y., Fujita, K., Asada, K. and Kato, I. *FASEB J.* (1992) **6**:A216.

*Bca*BEST is a trademark 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](http://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.takara.com.cn>