

生物素 3'末端 DNA 标记试剂盒

Product Number	Product Name	Packing
BIOK2010	生物素 3'末端 DNA 标记试剂盒	20 次

PRODUCT INTRODUCTION

- 生物素 3'末端 DNA 标记试剂盒(Biotin 3' End DNA Labeling Kit)是一种通过 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)把生物素标记的 dUTP 添加到 DNA 3'末端的试剂盒。通常 DNA 的 3'末端被标记后不会干扰杂交反应，也不会干扰基于序列特异性蛋白结合的 EMSA 检测；因此生物素标记的 DNA 探针可以用于常规的 Northern、Southern、EMSA(即 gel shift)以及 colony hybridization 或原位杂交等。
- Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)可以在不依赖于模板的情况下催化在 DNA 的 3' -OH 端加上 dNTP 的反应。关于 TdT 催化双链 DNA 末端加 dNTP 的反应效率，3'端突出的双链 DNA 要比平端或 3'端缩进的双链 DNA 高很多。TdT 催化单链 DNA 末端加 dNTP 的反应效率要比双链 DNA 高很多。在适当的条件下，TdT 也可以催化 RNA 3'末端加 NTP 的反应。
- 本试剂盒适合标记纯化的单链 DNA，如果用于标记 EMSA 探针，可以在单链标记后再进行退火。
- 本试剂盒中提供了已经用生物素标记好的 Biotin-Control Oligo，可以用作检测 DNA 标记效率的对照。
- 如果每个标记反应的探针量为 5pmol，本试剂盒可以用于 20 个标记反应。

PACKING LIST

Product Name	Packing
TdT Buffer (5X)	250μl
TdT (10U/μl)	20μl
Biotin-11-dUTP (5μM)	100μl
Biotin-Control Oligo (0.4μM)	100μl

Ultrapure water	1ml
探针标记终止液	200 μ l
TE	15ml
说明书	1 份

SAVE CONDITION

-20 $^{\circ}$ C 保存。

MATTERS NEEDING ATTENTION

- 需自备用于检测探针标记效率的带正电荷尼龙膜，以及用于生物素检测的相关试剂。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

INSTRUCTIONS

1. 准备工作：

- a. 取出 TdT Buffer (5X)、Biotin-11-dUTP 和 Ultrapure water 溶解，并置于冰浴上备用。
- b. 取出待标记的 DNA 探针，用水稀释至 1 μ M，并置于冰浴上备用。

2. DNA 探针的标记：

- a. 如下设置反应体系：

Ultrapure water	29 μ l
TdT Buffer (5X)	10 μ l
待标记探针(1 μ M)	5 μ l
Biotin-11-dUTP (5 μ M)	5 μ l
TdT (10U/ μ l)	1 μ l
总体积	50 μ l

- b. 用枪轻轻吹打混匀，切勿 vortex。37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。
- c. 加入 2.5 μ l 探针标记终止液，轻轻混匀终止反应。

3. TdT 的去除：

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 010-5365 2239 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

- a. 探针标记反应终止后, 加入 52.5 μ l 氯仿-异戊醇(24:1), vortex 使有机相和水相充分混合以抽提 TdT(说明: 静止后有机相和水相会很快分层)。
- b. 12000-14000g 离心 1-2 分钟。吸取上清备用。上清即为被生物素标记的 DNA 探针。

4. 探针的纯化(选做):

通常为实验简便起见, 可以不必纯化标记好的探针。有些时候, 纯化后的探针会改善后续实验的结果。如需纯化, 可以按照如下步骤操作:

- a. 对于 100 μ l 标记好的探针, 加入 1/4 体积即 25 μ l 的 5M 醋酸铵, 再加入 2 体积即 200 μ l 的无水乙醇, 混匀。
- b. -70 $^{\circ}$ C 至 -80 $^{\circ}$ C 沉淀 1 小时, 或 -20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。
- c. 4 $^{\circ}$ C, 12,000g-16,000g 离心 30 分钟。小心去除上清, 切不可触及沉淀。
- d. 4 $^{\circ}$ C, 12,000g-16,000g 离心 1 分钟。小心吸去残余液体。微晾干沉淀, 但不宜过分干燥。
- e. 加入 50 μ l TE, 完全溶解沉淀。标记好的探针可以 -20 $^{\circ}$ C 保存。

5. 生物素标记探针标记效率的检测:

- a. 取 5 μ l Biotin-Control Oligo (0.4 μ M), 加入 196 μ l TE, 混匀, 稀释成 10nM Biotin-Control Oligo(作为标准品)。取出适量 10nM Biotin-Control Oligo, 依次稀释成 5nM、2.5nM、1nM、0.5nM 和 0.25nM。
- b. 取 3 μ l 步骤 3B 所获得的生物素标记的 DNA 探针(100nM), 加入 27 μ l TE, 混匀, 稀释成 10nM 生物素标记的探针(作为待测样品)。取出适量的 10nM 生物素标记的探针, 依次稀释成 5nM、2.5nM、1nM、0.5nM 和 0.25nM。
- c. 参考下面的表格, 取一适当大小的带正电荷尼龙膜, 在膜上做好相应标记。对于经过梯度稀释的标准品和待测样品, 分别取 2 μ l 滴加到膜上。在膜上滴加标准品或待测样品时, 请注意使液滴充分被膜吸收, 在膜上形成一个湿的圆形小斑点。

说明: 如果条件许可, 可以使用专门用于点杂交或狭缝杂交的设备进行探针标记效率的检测, 探针用量也参考下表, 浓度可以稀释 50 倍, 而所用体积可以相应放大 50 倍至 100 μ l。

探针浓度	10nM	5nM	2.5nM	1nM	0.5nM	0.25nM
Biotin-Control Oligo	2 μ l					
生物素标记的探针	2 μ l					

探针量	20fmol	10fmol	5fmol	2fmol	1fmol	0.5fmol
-----	--------	--------	-------	-------	-------	---------

- d. 滴加完所有的标准品和样品后，将膜室温晾干。
- e. 用紫外交联仪(UV-light cross-linker)选择 254nm 紫外波长，120mJ/cm²，交联 30-45 秒。如果没有紫外交联仪可以使用普通的手提式紫外灯，距离膜 5-10 厘米左右照射 1-5 分钟。也可以使用超净工作台内的紫外灯，距离膜 5-10 厘米左右照射 1-10 分钟。最佳的交联时间可以使用标准品自行摸索。
- f. 随后可以立即采用各种生物素检测试剂盒，检测出样品的生物素标记效率；也可以室温存放数天直至进行后续检测。
- g. 如果最后采用的是 ECL 类试剂或其它类似试剂进行检测，则可以对比样品和标准品的灰度，从而计算出探针的标记效率。例如 2fmol 量的待测样品探针的灰度和 1fmol 标准品的灰度相同，则说明探针的标记效率大致为 50%，待测样品中总探针的浓度约为 1 μ M，而实际被生物素标记的探针约为 0.5 μ M。探针的标记效率也可以通过建立标准曲线进行比较精确的计算。用于后续检测时通常要求标记效率不低于 30%。有文献报道标记效率和 3'末端的碱基无关，但和整个待标记探针的序列有关。由于在 TdT 的催化下可以在待标记探针的 3'端加上多个 Biotin 标记的 dUTP，因此有时会出现标记效率大于 100%的情况。

Contact Us**QQ:**499854788

3494243873

WeChat: 13681256816

15511114213

Email: info@biotyscience.com**Tel:** 010-5365 2239

13681256816

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 010-5365 2239 **Email:** info@biotyscience.com**Address:** 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号