

生物素标记试剂盒（EMSA 探针）

货号：BIOK2014

规格：20 次

产品简介

EMSA 探针生物素标记试剂盒(EMSA Probe Biotin Labeling Kit)是一种通过 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) 把生物素标记的 dUTP 添加到单链 DNA 3'末端，然后通过退火产生生物素标记的 EMSA 探针的试剂盒。通常 DNA 的 3'末端被标记后 不会干扰基于序列特异性蛋白结合的 EMSA 检测。

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。

试剂盒组成

| | |
|--|-------------|
| TdT Buffer (5X) | 250 μ l |
| TdT (10U/μl) | 20 μ l |
| Biotin-11-dUTP (5μM) | 100 μ l |
| Biotin-Control Oligo (0.4μM) | 100 μ l |
| Ultrapure water | 1ml |
| 探针标记终止液 | 200 μ l |
| TF | 15ml |

| | |
|------------|-------------|
| 退火缓冲液(10X) | 150 μ l |
| 说明书 | 1 份 |

使用说明:

1.准备工作:

(1) 取出 TdT Buffer (5X)、Biotin-11-dUTP 和 Ultrapure water 溶解, 并置于冰浴上备用。

(2) 取出待标记的单链 EMSA 探针, 用水稀释至 1 μ M, 并置于冰浴上备用。如果待标记的 EMSA 探针为双链, 95 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟, 然后立即放置到冰水浴中, 使双链的 EMSA 探针转变为单链的探针, 然后同样用水稀释至总的单链 DNA 浓度为 1 μ M, 即每条单链的浓度为 0.5 μ M, 相当于最初双链的 EMSA 探针浓度为 0.5 μ M。

2.DNA 探针的标记:

| | |
|----------------------------|------------|
| 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 |

(1) 参考上表设置反应体系。注: 对于双链的 EMSA 探针的标记反应, 建议一次做两管, 即总体积共 100 μ l, 以最终获得足够的生物素标记 EMSA 探针用于后续 EMSA 检测。

(2) 用枪轻轻吹打混匀, 切勿 vortex。37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

(3) 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:

探针标记反应终止后, 加入氯仿-异戊醇(24:1), vortex 使有机相和水相充分混合以抽提 TdT。离心 1-2 分钟, 吸取上清备用。上清即为被生物素标记的单链 DNA

探针。

4.生物素标记探针标记效率的检测:

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 滴加完所有的标准品和样品后, 将膜室温晾干。

(5) 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(例如碧云天的手提紫外检测仪(EUV002)), 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。

(6) 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。

(7) 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。

注意事项:

1. 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。

2. 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。

3.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

4.请将该产品置于 -20℃保存。

Beijing Biotyscience Co. Ltd.

QQ: 499854788

3494243873

WeChat: 13681256816; 17731100244

Email: info@biotyscience.com

Tel: 400-669-8850

17731100244; 13681256816