

DNA 探针生物素末端标记试剂盒

产品货号: E4001

储存条件: -20°C保存, 冰袋运输。Biotin-11-dUTP 请于 4°C避光保存

产品组分

组分	20T	40T
5× TdT buffer	200 ul	400 ul
TdT (20U/ul)	11 ul	22 ul
Biotin-11-dUTP (5μM)	100 ul	200 ul
探针标记终止液	70 ul	140 ul
退火缓冲液	300 ul	600 ul
ddH ₂ O	0.8 ml	1.6 ml

1. 产品简介

DNA 探针生物素末端标记试剂盒是一款对 DNA 探针进行高效末端标记的试剂盒。试剂盒采用基因工程改造优化的 TdT, 可以在 DNA 片段 3' 末端标记多个生物素集团, 与普通生物素标记试剂盒相比, 可以大幅提升后续生物素检测反应的灵敏度。由于生物素标记于 DNA 片段的末端, 不会影响该 DNA 片段与特定蛋白质或互补核酸序列的结合, 因而可广泛应用于 EMSA 检测、Northern 杂交、Southern 杂交、斑点杂交和原位杂交等实验研究。

2. 实验步骤:

2.1 准备工作:

取出 5×TdT buffer、Biotin-11-dUTP 和 ddH₂O, 解冻后置于冰上备用。

准备待标记探针:

- 单链 DNA: 直接用水稀释至 1μM, 置于冰上备用。
- 双链 DNA: 95°C加热 2min, 迅速置于冰水浴变性为单链, 再用水稀释至 1μM, 置于冰上备用。

注: 1μM DNA 双链质量浓度换算公式: 质量浓度 (ng/ul) = 碱基对数 × 0.66。例: 300bp 的 DNA 双链, 摩尔浓度为 1μM, 则对应的质量浓度为 300 × 0.66 = 198ng/ul。

下表为常见 bp 长度的摩尔浓度与质量浓度换算表:

DNA 长度	1μM 对应质量浓度 (ng/μL)
50 bp	33
100 bp	66
500 bp	330
1000 bp (1KB)	660
3000 bp (3KB)	1980

2.2 DNA 探针标记

根据下表配制 50ul 反应体系:

组分	体积
ddH ₂ O	29.5 ul
5× TdT buffer	10 ul
待标记探针 (1μM)	5 ul
Biotin-11-dUTP	5 ul
TdT	0.5 ul
Total	50 ul

用移液器轻轻吹打混匀, 切勿涡旋振荡。37°C孵育 30min。反应结束加入 2.5ul 探针标记终止液, 轻轻混匀, 终止反应。

2.3 TdT 的去除(EMSA 须此步, 分子杂交不须)

探针标记反应终止后, 加入 52.5 μl 氯仿-异戊醇(24:1), 涡旋振荡使有机相和水相充分混合, 静置等待有机相和水相分层。

13,000g 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。

2.4 生物素标记检测 (可选)

取带正电荷尼龙膜裁剪成合适大小, 做好标记。用灭菌双蒸水浸泡 10min, 再用 2×SSC 缓冲液浸泡 30min, 室温晾干。

取 2μl 待测探针滴加至尼龙膜毛面, 确保液滴完全吸收, 在膜上形成一个圆形小斑点。

将尼龙膜放在干净的滤纸上, 室温干燥 30min, 再将尼龙膜放在烘箱中, 120°C烘烤 30min。

使用生物素检测试剂盒 (货号 EM001) 检测生物素信号, 检测前用 TBST 洗膜 5min。





2.5 生物素标记 EMSA 探针的制备

对于步骤 2.3 标记好的单链 DNA 探针，把正义链和反义链等体积混合。若待标记探针为双链 DNA 探针，标记后直接进入下一步。

加入 10×退火缓冲液，使终浓度为 1×（例：100μl 探针液加 11μl 缓冲液），混匀。

退火条件：金属浴或水浴 95°C 变性 2min 后，取出静置 30min 左右，直至自然冷却至室温。

退火反应结束后，-20°C 保存标记好的 EMSA 探针。此时的 EMSA 探针已经可以直接用于后续的 EMSA 检测，也可以对探针进行适当纯化后再进行 EMSA 检测。

注意事项：

- 1、本试剂盒可用于 DNA 单链探针或 DNA 双链探针的 3'末端生物素标记。推荐使用 PCR 合成的 DNA 双链作为待标记探针，避免互补链量不一致导致多余单链的形成。
- 2、如果使用双链 DNA 作为待标记探针，使用前需 95°C 加热 2min，迅速置于冰水浴变性后再进行末端标记。标记结束后需要进行退火以形成完整的双链探针。
- 3、标记探针一般不需要进一步纯化，确需纯化的，建议采用乙醇沉淀法。标记探针暂不使用的，请保存于-20°C，使用时在冰上解冻。
- 4、实验需自备氯仿、异戊醇、带正电荷尼龙膜及生物素检测相关试剂（推荐 EMSA 检测试剂盒，货号 EM001）。
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

