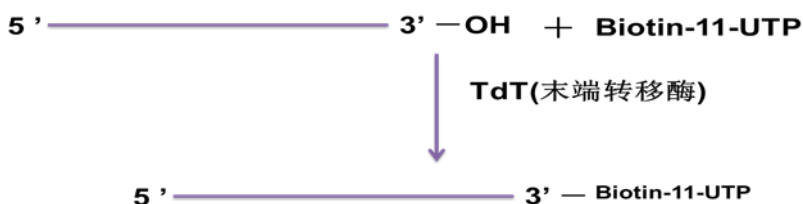


生物素 3' 端标记试剂盒

产品简介：

EMSA 探针生物素标记试剂盒是一种通过 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) 催化生物素标记的 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。通常 DNA 3' 末端被标记后不会干扰序列特异性蛋白结合的 EMSA 检测。Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) 可以在不依赖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。



生物素末端标记核酸示意图

适用范围：

本试剂盒适合标记纯化的单链 DNA 在标记后再进行退火。本试剂盒中提供了已经用生物素标记好的 Biotin-control Oligo, 可以用作检测标记效果的对照。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。

主要组分：

产品编号	产品名称	规格 (20T)
ATB01008-1	TdT Buffer (5×)	250μl
ATB01008-2	TdT(10U/μl)	20μl
ATB01008-3	Biotin-11-dUTP(5μM)	100μl
ATB01008-4	Biotin-control Oligo(0.4μM)	100μl
ATB01008-5	超纯水	1ml
ATB01008-6	探针标记终止液	200μl
ATB01008-7	TE	15 ml
ATB01008-8	氯仿/异戊醇 (24:1)	1ml
ATB01008-9	5M 的醋酸铵	1ml
ATB01008-10	退火缓冲液	150μl

武汉安特柏科技有限公司 Wuhan ANTBDY Technology Co.,LTD

咨询热线 Tel: 15377047856

邮箱: tech@antbdy.com

QQ: 657047932

ATB01008-11	尼龙膜 (10cm*2cm)	5 张
—	说明书	1 份

储存条件：

本试剂盒低温运输，收到后请置于-20℃保存，保存时间 24 个月。

标记前准备工作：

- 1) 取出 TdT Buffer (5X)、Biotin-11-dUTP 和超纯水溶解，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 1μM，并置于冰浴上备用。如果待标记的 EMSA 探针为双链，95℃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 1μM，即每条单链的浓度为 0.5μM，相当于最初双链的 EMSA 探针浓度为 0.5μM。

实验步骤：

1、DNA 探针的标记

标记体系中各成分	体积
超纯水	29μl
TdT Buffer(5X)	10μl
待标记探针(1μM)	5μl
Biotin-11-dUTP(5μM)	5μl
TdT(10U/μl)	1μl
总体积	50μl

- (1) 参考上述设置反应体系加入各试剂，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 100μl，以最终获得足够的生物素标记核酸探针用于后续检测。
- (2) 用枪轻轻吹打混匀，**记住切勿涡旋**。37℃孵育 30 分钟。
- (3) 加入 2.5μl 探针标记终止液，轻轻混匀终止反应。

2、TdT 的去除：

- (1) 探针标记反应终止后，加入 52.5μl 氯仿-异戊醇(24:1)，涡旋，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)。
- (2) 12000-14000g 离心 1~2min。吸取上清备用。上清即为被生物素标记的单链 DNA 探针。

3、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。但是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：

- (1) 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。
- (2) -70℃至-80℃沉淀 1h，或-20℃沉淀过夜。
- (3) 4℃，12,000g-16,000g 离心 30min。小心去除上清，切不可触及沉淀。
- (4) 4℃，12,000g-16,000g 离心 1min。小心吸去残余液体。微晾干沉淀，但不宜过分干燥。
- (5) 加入 50 μ l TE，完全溶解沉淀。标记好的探针可以-20℃保存。

4、生物素标记探针标记效率的检测：

- (1) 制样：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。

取 3 μ l 步骤 3 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。

- (2) 点样：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。滴加完所有的标准品和样品后，将膜室温晾干。

探针浓度	10nM	5nM	2.5nM	1nM	0.5nM	0.25nM
Biotin-Control Oligo	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
生物素标记的探针	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
探针量	20fmol	16fmol	5fmol	2fmol	1fmol	0.5fmol

- (3) 交联：用紫外交联仪(UV-light cross-linker)选择 254nm 紫外波长，120mJ/cm²，交联 30-45s。可以使用普通的手提式紫外灯，距离膜 5-10cm 左右照射 1-5min。也可以使用超净工作台内的紫外灯，距离膜 5-10cm 左右照射 1-10min。最佳的交联时间可以使用标准品自行摸索。
- (4) 封闭：37-50℃水浴 Blocking Buffer，封闭 30min，洗膜。
- (5) 加入含有链霉亲和素-HRP 的 Blocking Buffer 孵育 20min。
- (6) 洗涤，平衡。

(7) 底物显色：取 5ml ECL A 液和 5ml ECL B 液混匀，配制成 ECL 工作液。进行底物显色。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%。

5、生物素核酸标记探针的制备：

(1) 标记好的探针直接作分子杂交等检测，则可以直接使用步骤 3 合成的单链探针

(2) 标记好的探针若将用于 EMSA 检测，则需要退火合成双链。

① 将步骤 3 标记好的纯化的单链 DNA 探针，把正义链和反义链等体积混合(不可根据标记效率调整摩尔比例)。对于最初使用变性的双链 EMSA 探针进行探针标记的情况，直接进入下一步。

② 加入退火缓冲液(10X)，使退火缓冲液的最终浓度为 1X，混匀。例如待退火探针的体积为 100 μ l，则加入 11 μ l 退火缓冲液(10X)。

③ 如下设置 PCR 仪进行退火反应：

步骤	温度	时间	说明
1	95℃	2min	让 oligo 充分变性
2	每 8 秒下降 0.1℃，降至 25℃(注 1)	90min	退火
3	4℃	长时间保持	暂时存放

(4) 退火反应结束后，-20℃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。

***本试剂仅供实验室研究使用**