

# 生物素 3'端标记试剂盒

## 产品简介:

生物素 3'末端 DNA 标记试剂盒(Biotin 3' End DNA Labeling Kit)能够利用终端脱氧核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)将生物素标记的脱氧尿嘧啶三磷酸(dUTP)添加到 DNA 分子的 3'末端。这种标记的优点是:不干扰杂交反应,不影响 EMSA 检测。该试剂盒标记的生物素化 DNA 探针适用于常见的核酸实验,包括 Northern 印迹、Southern 印迹、EMSA 凝胶迁移实验(也称为 gel shift)、菌落杂交或原位杂交等。

终端脱氧核苷酸转移酶(TdT)能够在不依赖模板的情况下催化 DNA 分子 3'末端与脱氧核苷三磷酸(dNTP)之间的连接反应。在 TdT 催化下,单链 DNA 分子 3'末端与 dNTP 反应效率最高,其次依次是:3'末端凸出的双链 DNA 分子,平端 DNA 分子。所以,我们尽可能让 DNA 处于单链的情况下进行标记,特别是对于 EMSA 实验,可先单链标记再进行退火步骤。

参照实验标准步骤标记,每次标记反应的 DNA 探针量约为 5pmol。

## 产品优势:

1. 标记速度快,30 分钟内完成标记;
2. 避免了使用同位素的危害和污染物的处理;
3. 标记产物稳定,可以长期存放一年;
4. 本试剂盒标记产物适合于多种分子生物学实验,干扰小。

## 主要组分:

组分名称	组分说明	
	12T	25T
TdT Buffer(5X)	150ul	300ul
TdT(10U/μl)	15ul	30ul
Biotin-11-dUTP(5μM)	65ul	130ul
标记终止液	200ul	200ul
TE	1ml	1ml
ddH <sub>2</sub> O	1ml	1ml
说明书	1 份	

## 储存条件:

本试剂盒低温运输,收到后请置于-20°C保存,保存时间 24 个月。

**其他需要准备的材料:**

- 超纯水;
- 待标记 DNA (1 $\mu$ M) ;
- PCR 仪器, 水浴锅或可设置 37°C 的金属浴;
- 氯仿/异戊醇 Chloroform: isoamyl alcohol (24:1);
- 吸头和离心管

**操作说明:****1. 准备工作:**

将试剂盒中的各个组分恢复至室温 (TdT 酶务必放在 -20°C, 使用时放在冰盒上) ; 待标记的 DNA 片段调整至 1 $\mu$ M; 如果 DNA 为双链, 请先变性为单链, 标记效果会更好。

**2. DNA 探针的标记:**

以下示例为每次标记 5pmol DNA 3'-OH 末端最优配制。Mg<sup>2+</sup>、蛋白质和残留琼脂糖的存在可能会降低标记效率。在以下反应中仅使用纯化的 DNA。再次强调: 对于双链 DNA 的标记, 需要先将其变性后, 标记效果会更好, 使用之前将其退火复性。

## 2.1 按照以下体系配置反应体系

50ul 反应体系设置如下:

ddH <sub>2</sub> O	29 $\mu$ l
TdT Buffer (5X)	10 $\mu$ l
待标记 DNA 探针(1 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Biotin-11-dUTP (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
TdT (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<b>总体积</b>	<b>50<math>\mu</math>l</b>

2.2 配制好以后轻轻混匀反应体系, PCR 仪或者水浴锅上 37°C 反应 30 分钟。

2.3 加入 2.5 $\mu$ l 标记终止液, 轻轻混匀终止反应。

2.4 加入 52.5 $\mu$ l 氯仿-异戊醇(24:1), 振荡混匀; 12,000-g 离心 3 分钟。吸取上清即为被生物素标记的 DNA 探针。

**3. 探针的纯化(可做步骤):**

标记好的探针可以直接用于实验, 但是为了追求更好是实验效果, 可以按如下步骤进行纯化:

3.1 50ul 标记好的探针, 加入 1/4 体积 (即 12.5 $\mu$ l) 的 5M 醋酸铵, 再加入 2 体积 (100 $\mu$ l) 的冰冻无水乙醇, 轻

轻混匀;

3.2 -20°C沉淀过夜;

3.3 4°C, 12,000g 离心 30 分钟; 离心完毕后, 小心去除上清, 保留沉淀, 微晾干沉淀;

3.4 加入 25µl TE, 待其完全溶解沉淀; 标记好的探针可以放在-20°C保存。

**\*本试剂仅供实验室研究使用**