



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

生物素3'末端DNA标记试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D3106	生物素3'末端DNA标记试剂盒	20次

产品简介:

- 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。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D3106-1	TdT Buffer (5X)	250μl
D3106-2	TdT (10U/μl)	20μl
D3106-3	Biotin-11-dUTP (5μM)	100μl
D3106-4	Biotin-Control Oligo (0.4μM)	100μl
D3106-5	Ultrapure water	1ml
D3106-6	探针标记终止液	200μl
D3106-7	TE	15ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 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。带正电荷尼龙膜(FFN10/FFN11/FFN13/FFN15)可以向碧云天订购。
- 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。

使用说明:

1. 准备工作:

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

2. DNA探针的标记:

- 如下设置反应体系:

Ultrapure water	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

- 用枪轻轻吹打混匀，切勿vortex。37°C孵育30分钟。
- 加入2.5μl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:静止后有有机相和水相会很快分层)。
- 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:

- 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。
- 70 $^{\circ}$ C至-80 $^{\circ}$ C沉淀1小时,或-20 $^{\circ}$ C沉淀过夜。
- 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。
- 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。
- 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:

- 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。
- 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	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	10fmol	5fmol	2fmol	1fmol	0.5fmol

- 滴加完所有的标准品和样品后,将膜室温晾干。
- 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,产品编号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。
- 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。
- 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。

使用本产品的文献:

- Lu J, Zhao J, Liu K, Zhao J, Yang H, Huang Y, Qin Z, Bai R, Li P, Ma J, Yan W, Zhao M, Dong Z. MAPK/ERK1/2 signaling mediates endothelial-like differentiation of immature DCs in the microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Jun;67(12):2091-106.
- Zhang P, Li ST, Liu TT, Fu CH, Zhou PP, Zhao CF, Yu LJ. Overexpression of a 10-deacetylbaecatin III-10 β -O-acetyltransferase gene leads to increased taxol yield in cells of *Taxus chinensis*. *PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE*. 2011;106(1):63-70.
- Zhang P, Liu TT, Zhou PP, Li ST, Yu LJ. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr Microbiol*. 2011 Apr;62(4):1315-20.
- Li ST, Fu CH, Zhang M, Zhang Y, Xie S, Yu LJ. Enhancing Taxol Biosynthesis by Overexpressing a 9-Cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase Gene in Transgenic Cell Lines of *Taxus chinensis*. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER*. 2012 Oct;30(5):1125-1130.
- Li S, Zhang P, Zhang M, Fu C, Yu L. Functional analysis of a WRKY transcription factor involved in transcriptional activation of the DBAT gene in *Taxus chinensis*. *Plant Biol (Stuttg)*. 2012 Jul 25;503(2):200-7.
- Li F, Jiang Z, Wang K, Guo J, Hu G, Sun L, Wang T, Tang X, He L, Yao J, Wen D, Qin X, Zhang L. Transactivation of the human NME5 gene by Sp1 in pancreatic cancer cells. *Gene*. 2013 Jan;15(1):19-26.
- Xu A, Zhao Z, Chen W, Zhang H, Liao Q, Chen J, Carr JP, Du Z. Self-interaction of the cucumber mosaic virus 2b protein plays a vital role in the suppression of RNA silencing and the induction of viral symptoms. *Mol Plant Pathol*. 2013 Oct;14(8):803-12.
- Dai L, Xu Y, Yu W, Liu S, Gao Y, Zhang L, Yuan B, Chen J, Ma T, Zhang J. Naturally occurring genetic mutations in the 5'-upstream regulatory region of bovine FSHB generate a novel cis-regulatory element that affects its expression. *Anim Genet*. 2015 Dec;46(6):693-6.
- Chen B, Ye Q, Zhou K, Wang Y. Adsorption and separation of HCV particles by novel affinity aptamer-functionalized adsorbent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016 Apr 1;1017-1018:174-8.
- Liu Q, Qu X, Xie X, He P, Huang S. Repression of Akt3 gene transcription by the tumor suppressor RIZ1. *SCI REP-UK*. 2018 Jan 24;8(1):1528
- An JP, Yao JF, Xu RR, You CX, Wang XF, Hao YJ. An apple NAC transcription factor enhances salt stress tolerance by modulating the ethylene response. *PLANT PHYSIOL BIOCH*. 2018 Mar 12. doi: 10.1111/pp1.12724. [Epub ahead of print]
- Ji X, Du Y, Li F, Sun H, Zhang J, Li J, Peng T, Xin Z, Zhao Q. The basic helix-loop-helix transcription factor, OsPIL15, regulates grain size via directly targeting a purine permease gene OsPUP7 in rice. *Plant Biotechnol J*. 2019 Aug;17(8):1527-1537

13. Long Liu, Feiyu Li, Li Xu, Jingjie Wang, Moran Li, Jie Yuan, Hui Wang, Ruiping Yang, Bei Li. Cyclic AMP-CRP Modulates the Cell Morphology of *Klebsiella pneumoniae* in High-Glucose Environment *Front Microbiol.* 2020 Jan 21;10:2984.;doi: 10.3389/fmicb.2019.02984
14. Chao Gao, Yang Liu, Chunjie Jiang, Liang Liu, Juan Li, Dan Li, Xiaoping Guo, Zhu Wang, Yuexin Yang, Liegang Liu, Ping Yao, Yuhang Tang. Intensive Running Enhances NF- κ B Activity in the Mice Liver and the Intervention Effects of Quercetin Nutrients. 2020 Sep 11;12(9):2770.;doi: 10.3390/nu12092770
15. Xin-Ai Chen, Xian He, Min Zhang, Xu-Ming Mao, Yong-Quan Li. An efficient genetic transformation system for Chinese medicine fungus *Tolypocladium ophioglossoides* *J MICROBIOL METH.* 2020 Sep;176:106032.;doi: 10.1016/j.mimet.2020.106032

Version 2021.09.01