上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

EMSA 探针生物素标记试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R32252-20T	EMSA 探针生物素标记试剂盒	20T

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。

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。

产品组成：

产品编号	产品名称	包装
R32252-20T	TdT Buffer (5X)	250μl
	TdT (10U/μl)	20μl
	Biotin-11-dUTP (5μM)	100μl
	Biotin-Control Oligo (0.4μM)	100μl
	Ultrapure water	1ml
	探针标记终止液	200μl
	TE	15ml
	退火缓冲液(10X)	150μl
—	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。

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：

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

b. 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° 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 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。

2. DNA 探针的标记：

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

a. 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 100μl，以最终获得足够的生物素标记 EMSA 探针用于后续 EMSA 检测。

b. 用枪轻轻吹打混匀，切勿 vortex。37ºC 孵育 30 分钟。

c. 加入 2.5μl 探针标记终止液，轻轻混匀终止反应。

3. TdT 的去除：

a. 探针标记反应终止后，加入 52.5μl 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：静止后有机相和水相会很快分层)。

b. 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单链 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：

a. 对于 100μl 标记好的探针，加入 1/4 体积即 25μl 的 5M 醋酸铵，再加入 2 体积即 200μl 的无水乙醇，混匀。

b. -70ºC 至-80ºC 沉淀 1 小时，或-20ºC 沉淀过夜。

c. 4ºC，12,000g-16,000g 离心 30 分钟。小心去除上清，切不可触及沉淀。

d. 4ºC，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。

e. 加入 50μl TE，完全溶解沉淀。标记好的探针可以-20ºC 保存。

5. 生物素标记探针标记效率的检测：

a. 取 5μl Biotin-Control Oligo (0.4μM)，加入 196μl 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。

b. 取 3μl 步骤 3B 所获得的生物素标记的 DNA 探针(100nM)，加入 27μl 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。

c. 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 2μl 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，探针的用量参考下表，浓度可以再稀释 50 倍，而所用体积可以相应放大 50 倍至 100μl。

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

d. 滴加完所有的标准品和样品后，将膜室温晾干。

e. 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。

f. 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。

g. 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 1μM，而实际被生物素标记的探针约为 0.5μM。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。

6. 生物素标记 EMSA 探针的制备：

a. 对于步骤 3B 标记好的单链 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。

b. 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 微升，则加入 11 微升退火缓冲液(10X)。

c. 如下设置 PCR 仪进行退火反应：

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

注 1：如果所用的 PCR 仪不具备下降 0.1ºC 的功能，也可以设置为每 90 秒下降 1ºC。

d. 退火反应结束后，-20ºC 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。