

Code No. 6070

研究用

TaKaRa

MEGALABEL™

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒之外须备试剂	1
● 使用方法	1
1. 交换反应	1
2. 磷酸化反应标记	2
3. 合成 DNA 寡核苷酸的标记	2
4. 除去未反应的标记 (可选)	3
● 使用例	3
● 注意事项	4
● 参考文献	4

● 制品说明

本试剂盒利用 T4 Polynucleotide Kinase 和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ，对粘性末端或平末端的 DNA 或 RNA⁴⁾ 的 5' 末端进行高效标记反应。使用本试剂盒之前，不需要对 5' 末端的磷酸基团进行去磷酸化处理，因为使用的 kinase 能使 5' 末端的磷酸与 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的 γ -磷酸进行交换。另外，合成的单链或双链寡核苷酸的 5' 末端游离的 OH 基团都能通过 Kinase 反应被标记（或者只是简单的磷酸化）。提供的两种反应液使交换反应和磷酸化反应都能高效进行，而且，两种方法都能得到大于 10^6 cpm/pmol(5' -end)的高标记。

● 制品内容 (20 次量)

Cloned T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μl)	20 μl
5×Exchange Reaction Buffer	100 μl
10×Phosphorylation Buffer	50 μl
Control DNA (λ -BstP I Fragment 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	20 μl

● 保 存: -20°C

● 试剂盒之外须备试剂

1. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 或其它的标记、未标记的 ATPs。例如 Perkin Elmer, Code No. NEG502A (111 TBq/mmol, 3,000 Ci/mmol)。
2. Alkaline phosphatase (如果磷酸化反应之前需要对 5' 末端去磷酸化) (Code No. 2120A, Code No. 2250A)。
3. 移除未反应 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的柱子。如 DEAE-Cellulose (DE-52) column、Gelfilter column、CHROMA SPIN Column, Sephadex G-50。

● 使用方法

1. 交换反应

操作者自行准备试剂: 7 M 醋酸铵、100%乙醇和 70%乙醇。

- (1) 在微量离心管中制备下列反应液。

试剂	使用量
5' -phosphorylated DNA fragment in TE Buffer (≤ 5 pmoles, 5' 末端*)	≤ 14 μl
5×Exchange Buffer	5 μl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (370 MBq(10 mCi)/ml)	5 μl
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μl)	1 μl
灭菌水	up to 25 μl

*: 5 pmoles 的 5' 末端等于约 0.17 μg 的长 100 bp 的双链 DNA。

- (2) 37°C 反应 30 分钟。
- (3) 70°C 加热 5~10 分钟使酶失活。
- (4) 加入 10 μl 的 7 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH4.5)。如使用 CH_3COONa 做乙醇沉淀时使其终浓度达到 300 mM。
- (5) 加入 87.5 μl (2.5 倍) 的冷无水乙醇，-20°C 放置 30~60 分钟。
- (6) 离心回收沉淀，用 70% 的冷乙醇清洗沉淀，真空干燥。
- (7) 用适当 Buffer 溶解沉淀。

(通过(4)~(7)操作可以除去大部分未反应的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ，如要完全将其除去时，乙醇沉淀后用凝胶过滤等方法精制即可。)

如需用苯酚抽提除去蛋白质时，请在(7)之后进行。

2. 磷酸化反应标记

A. 去磷酸化反应

操作者自行准备试剂
TE 饱和酚/氯仿、3 M NaCl
100%乙醇和 70%乙醇、Bacterial Alkaline Phosphatase
TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0)

(1) 在微量离心管中制备下列反应液。

试剂	使用量
DNA in TE Buffer ($\leq 10 \mu\text{g}$)	$\leq 133 \mu\text{l}$
1 M Tris-HCl, pH8.0	15 μl
Bacterial Alkaline Phosphatase*(0.5~1.0 U/ μl)	2 μl
灭菌水	up to 150 μl

(2) 65°C反应 30 分钟。

*: 如需 CIAP, 加入 2 μl 的 CIAP(10~20 U/ μl)替代 Bacterial Alkaline Phosphatase, 50°C 反应 30 分钟。

(3) 加入 150 μl 的 TE 饱和酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1), 充分混匀。

(4) 离心, 取上层 (水层) 移到另一个微量离心管中。

(5) 重复操作(3)~(4)。

(6) 加入 7.5 μl 的 3 M NaCl (最终浓度 150 mM)。

(7) 加入 375 μl (2.5 倍量) 的冷无水乙醇, -20°C放置 30~60 分钟。

(8) 离心回收沉淀, 用 1 ml 70%的冷乙醇清洗后, 沉淀真空干燥。

(9) 使用 20 μl 的 TE Buffer 溶解沉淀。

B. 磷酸化反应 (前反应)

(1) 在微量离心管中制备下列反应液。

试剂	使用量
Dephosphorylated DNA ($\leq 5 \text{ pmoles}$, 5' -end)	$\leq 20.5 \mu\text{l}$
10× Phosphorylation Buffer	2.5 μl
[γ - ^{32}P] ATP (370 MBq(10 mCi)/ml)	1 μl
T4 Polynucleotide Kinase(10 U/ μl)	1 μl
灭菌水	up to 25 μl

(2) 37°C反应 30 分钟。

(3) 以后的操作与 1.的(3)~(7)操作相同。

3. 合成 DNA 寡核苷酸的标记

(1) 在微量离心管中制备下列反应液。

Oligonucleotide DNA with free 5' -OH(5~10 pmoles)	$\leq 3 \mu\text{l}$
10× phosphorylation buffer	2.5 μl
[γ - ^{32}P]ATP(111MBq(3,000 Ci)/mmol,370 MBq(10 mCi)/ml)	1 μl
T4 Polynucleotide Kinase(10 U/ μl)	1 μl
灭菌水	up to 25 μl

(2) 37°C反应 30 分钟。

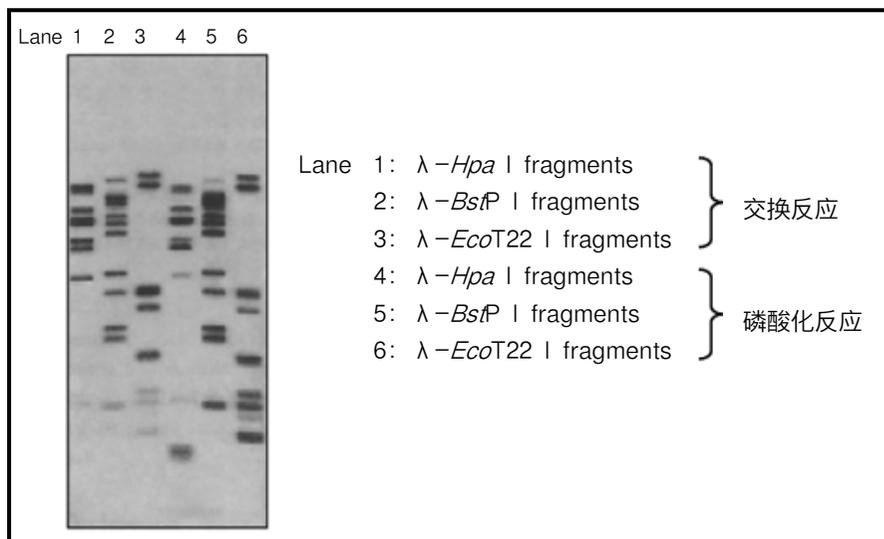
(3) 以后的操作与 1.的(3)~(7)操作相同。

4. 除去未反应的标记（可选）

当掺入水平很低的时候，需要使用本步骤，即通过体积排阻色谱³⁾或过滤试剂盒除去未反应的标记。Sephadex G-50 层析柱对于去除未掺入的 dNTPs 效果很好，它还能大幅减少小于 20 个碱基的 DNA 寡核苷酸和小于 20 bp 的双链 DNA 的量。使用之前需要在 70°C 加热 5~10 分钟以使 T4 Polynucleotide Kinase 失活³⁾。Sephadex G-25 层析柱可以用来纯化长度不小于 10 个碱基的寡核苷酸。

● 使用例

1. 依据使用方法 1.和 3.的实验操作，取 λ -*Bst*P I, λ -*Hpa* I, λ -*Eco*T22 I 各 3 pmoles, 用 111 TBq(3,000Ci)/mmol [γ -³²P] ATP 通过正向磷酸化反应或交换反应标记。各 DNA 片段的放射自显影结果如下所示。



使用 DE81 Filter 测定掺入的 ³²P 的放射线量，结果如下：

DNA 样品	交换反应	磷酸化反应
λ - <i>Bst</i> P I Fragments	5.4×10^6 cpm/pmo	5.3×10^6 cpm/pmol
λ - <i>Hpa</i> I Fragments	4.6×10^6 cpm/pmol	3.3×10^6 cpm/pmol
λ - <i>Eco</i> T22 I Fragments	4.4×10^6 cpm/pmol	2.9×10^6 cpm/pmol

* 在交换反应中，当 [γ -³²P] ATP 在 370 KBq、10 μ Ci 下使用时，标记效率为 1.85 MBq，是使用 50 μ Ci 时的 1/3~1/4。

2. 按照推荐的使用方法，对合成的 DNA 寡聚核苷酸(17-mer)进行标记，使用 DE81 Filter 和液体闪烁计数器测定掺入的 ³²P 的放射线量。

DNA 量 (5' 末端)	ATP: DNA	摄入的 ³² P	³² P count
5 pmoles	2: 1	49.8%	10.6×10^6 cpm/pmol
10 pmoles	1: 1	71.2%	7.8×10^6 cpm/pmol

* 如想把 DNA 末端全部进行标记时，必须使用摩尔数为 DNA 5' 末端数 1.5 倍以上的 [γ -³²P]ATP。

● 注意事项

1. 缓冲液可在室温融解。融解后立即置于冰中，使用前充分混匀。
2. 5 × 交换反应缓冲液于-20℃冻结保存时会有白色浑浊出现，但不影响反应效果。
3. 酶切得到的 DNA 片段需经乙醇沉淀等方法纯化。
4. 当用于交换反应的 DNA 在 5 pmoles 以上(约 1,000 bp 以上)时, 标记效率有时会低于 10⁶ cpm/pmol。
5. 如果交换反应所用 DNA 低于 500 bp 时, 标记效率有时会有所降低。
6. 若不进行放射线标记, 仅使用本试剂盒做 5' 末端磷酸化反应时, 反应体系中的 [γ-³²P] ATP 可用 5 μl 的 10 mM ATP 代替。
7. 磷酸化反应时的 [γ-³²P] ATP 可用 [γ-³⁵S] ATP 替代。

● 参考文献

1. Harrison B and Zimmerman S B. *Anal. Biochem.* (1986) **158**: 307-315.
2. Maxam A M and Gilbert W. *Methods in Enzymology.* (1980) **65**: 499-560.
3. Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T. *in Molecular Cloning* . (1989) A Laboratory Manual Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory.

MEGALABEL is a trademark of Takara Bio Inc.

CHROMA SPIN is a trademark of Takara Bio USA, Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v201909Da