

双链 DNA 探针随机引物合成法

随机引物合成双链探针是使寡核苷酸引物与 DNA 模板结合,在 Klenow 酶的作用下,合成 DNA 探针。合成产物的大小、产量、比活性依赖于反应中模板、引物、dNTP 和酶的量。通常,产物平均长度为 400-600 个核苷酸。利用随机引物进行反应的优点是: (1)Klenow 片段没有 5'→3'外切酶活性,反应稳定,可以获得大量的有效探针。(2)反应时对模板的要求不严格,用微量制备的质粒 DNA 模板也可进行反应。(3)反应产物的比活性较高,可达 4×10^9 cpm/ μg 探针。(4)随机引物反应还可以在低熔点琼脂糖中直接进行。

材料: 待标记的 DNA 片段。

设备: 高速台式离心机, 恒温水浴锅等。

试剂:

(1)随机引物 (随机六聚体或断裂的鲑鱼精子 DNA)。

(2)10×随机标记缓冲液: 900mmol/L HEPES (pH6.6); 10mmol/L MgCl_2 。

(3)Klenow 片段。

(4)20mmol/L DTT。

(5)未标记的 dNTP 溶液: dGTP、dCTP 和 dTTP 溶液, 各 5mmol/L。

(6)[α -32 P] dATP: 比活性 >3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ 。

(7)缓冲液 A: 50mmol/L Tris·Cl (pH7.5) ; 50mmol/L NaCl; 5mmol/L EDTA (pH8.0) ; 0.5% SDS。

操作步骤:

(1) 200ng 双链 DNA(1 μl)和 7.5ng 随机引物(1 μl)混合后置于 eppendorf 管内,水浴煮沸 5 分钟后, 立即置于冰浴中 1 分钟。

(2) 与此同时,尽快在一置于冰浴中的 0.5ml eppendorf 管内混合下列化合物:

20mmol/L DTT 1 μl

未标记的 dNTP 溶液 1 μl

10×随机标记缓冲液 1 μl

[α -32 P] dATP(比活性 >3000 Ci/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) 3 μl

ddH₂O 1 μl

(3) 将步骤(1)eppendorf 管中的溶液移到步骤(2)管中。

(4) 加入 5 单位(约 1 μ l) Klenow 片段, 充分混合, 在微型离心机中以 12000g 离心 1-2 秒, 使所有溶液沉于试管底部, 在室温下保温 3-16 小时。

(5) 在反应液中加入 10 μ l 缓冲液 A 后, 将放射性标记的探针保存在-20 $^{\circ}$ C 下备用。同时计算放射比活性。