

製品コード 6045

研究用

Takara

Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2.0

説明書

v201810Da

Random Primer DNA ラベリングキットは、ハイブリダイゼーションに用いる DNA を [α - 32 P]、 3 H] dCTP を用いてラベルし、DNA プローブを作製するためのキットです。

A. P. Feinberg と B. Vogelstein の方法^{1),2)}に改良を加えたもので、簡単な操作で高比放射活性の DNA プローブが得られます。また、本キットでは遺伝子工学的に 3' → 5' exonuclease 活性の欠失した Exo-free Klenow Fragment³⁾と 9 mer の Random Primer を用いています。このために、 1×10^9 dpm/ μ g の高比活性プローブを、短時間 (10 分以内) で得ることができます。

I. キットの内容 (30 回分)

1. Random Primer (9 mer)	60 μ l
2. 10 × Buffer	75 μ l
3. dNTP Mixture 各 0.2 mM dGTP、dATP、dTTP	75 μ l
4. Exo-free Klenow Fragment (2 U/ μ l)	30 μ l
5. Control DNA (λ -Hind III Fragment) (25 ng/ μ l)	10 μ l

【キット以外に必要な試薬】

- ・滅菌精製水
- ・TE Buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA)
- ・標識 dCTP 水溶液

(このキットは PerkinElmer 社 Code No. NEG513H の [α - 32 P] dCTP) (111 TBq/mmol、370 MBq/ml) 水溶液の使用を標準として組み立てられていますが、 3 H] dCTP も使用できます。

II. 保存

− 20°C

III. 原理

ハイブリダイゼーション法により DNA 中に存在する特異的配列を検出する際には、非常に高い比放射活性を持つ DNA をプローブとして用います。

この DNA プローブ作製の為に用いられる DNA 標識法としては、従来はニックトランスレーション法が用いられていましたが、このニックトランスレーション法には、次のような欠点があることが知られています。

1. 放射性物質の取り込み率が比較的低い。
2. 長時間の反応を行うと、DNA ポリメラーゼ I のエキソヌクレアーゼ活性により既に取り込まれた放射性物質が遊離し、取り込み率が低下する。
3. 鋳型となる DNA が高純度であることが必要である。
4. 反応後に未反応の放射性 dNTP を除去する必要がある。

1983 年に A. P. Feinberg と B. Vogelstein により発表されたランダムプライマーと Exo-free Klenow Fragment を用いて DNA の標識を行う方法は、これらの欠点をもたない DNA 標識法です (表 1)。その原理を図 1. に示しました。本キットでは、鋳型 DNA を熱変性により一本鎖 DNA とし、この一本鎖 DNA に対し 9 mer のランダムプライマーをアニールさせた後、Exo-free Klenow Fragment を用いて相補鎖合成を行います。この時、 $[\alpha$ - 32 P]、 3 H] などの標識化合物を用いると、合成される相補鎖が標識されます。この相補鎖は熱変性により一本鎖とし、ハイブリダイゼーションプローブとして用いることができます。

表 1

	ニックトランスレーション法	ランダムプライマー DNA ラベリング法
反応時間 および 反応モニター	長時間の反応により取り込み率が低下する。このため反応モニターを行い取り込み率を測定する必要がある。	短時間で高比活性プローブが得られる。また、長時間の反応を行っても取り込み率は低下しない。
プローブの比活性	~ 10 ⁸ dpm/μg	~ 10 ⁹ dpm/μg
鋳型 DNA 中の不純物の影響	アガロース等の混入によって反応が阻害される。	アガロース等の混入によってほとんど阻害されない。
鋳型 DNA	1 μg 程度	25 ng
反応後の処理	ゲル濾過による未反応 dNTP の除去が必要。	反応液から未反応 dNTP の除去をすることなくハイブリダイゼーションに用いることができる。

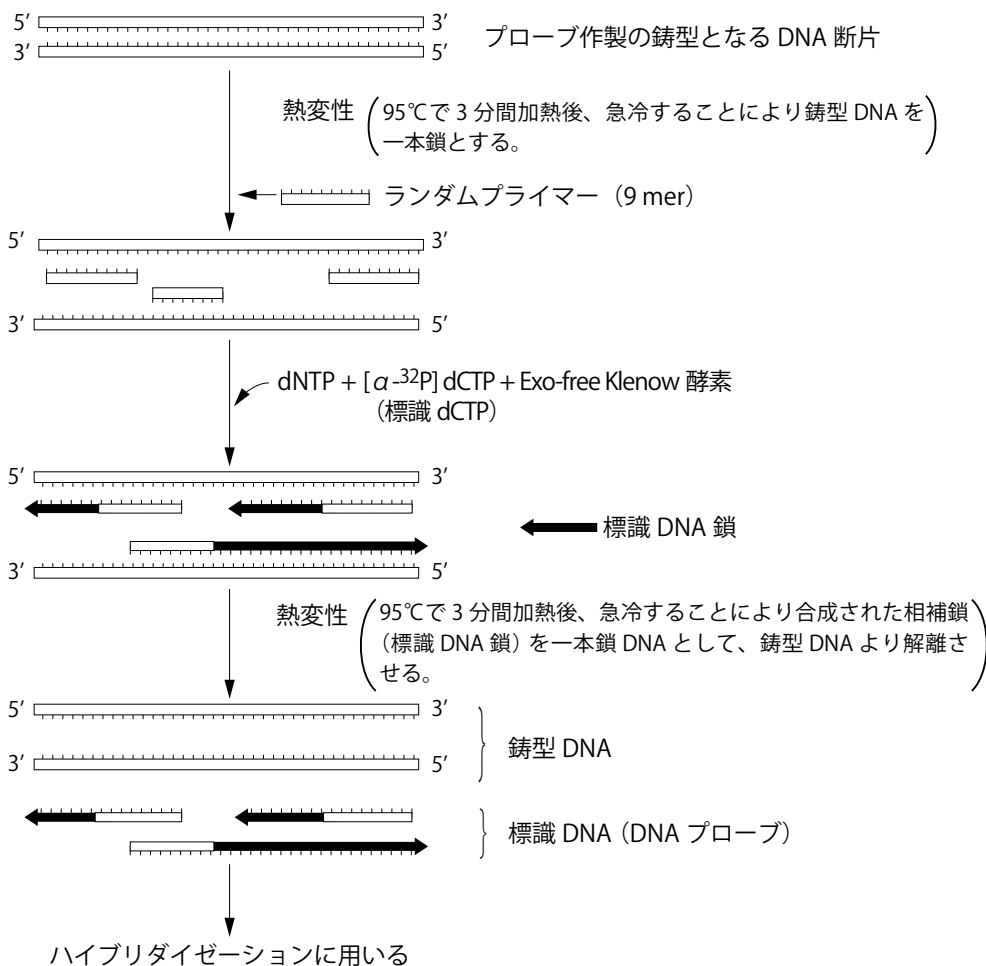


図 1. ランダムプライマー DNA ラベリングの原理

IV. 操作

1. マイクロチューブ (エッペンドルフ型、ポリプロピレン製) に次の反応液を調製する。95°C で 3 分間加熱した後、氷中で急冷し、5 分間放置する。

鋳型 DNA*1	10 ng ~ 1 μ g
Random Primer	2 μ l
滅菌精製水 (または TE Buffer)	up to 14 μ l

2. 10 \times Buffer、dNTP Mixture を各 2.5 μ l、標識 dCTP*2 (1.85 MBq、50 μ Ci) を 5 μ l 加える。
3. Exo-free Klenow Fragment 1 μ l を加え、37°C で 10 分間*3 保温する。
4. 65°C で 5 分間加熱し、酵素を失活させる。(または EDTA を最終濃度が 30 mM になるように加える。)
5. 95°C で 3 分間加熱した後、氷中で急冷する。
6. そのまま適量をハイブリダイゼーションプローブ液として用いる。
必要ならば、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)、ゲル濾過あるいはエタノール沈殿で未反応の標識 dCTP を除去して下さい。

* 1 : 鋳型 DNA の長さは 300 bp 以上が適しています。300 bp 以下のフラグメントのラベリングには、5' 末端を標識する MEGALABEL™ (製品コード 6070) の使用をお勧めします。

このキットでは、アガロースを除かずに低融点アガロースゲル中の DNA を反応に使用することも可能です。(この場合の、アガロースには、PrimeGel™ Agarose LMT 1-20K GAT (製品コード 5806A) や PrimeGel Agarose LMT PCR-Sieve GAT (製品コード 5815A) が適しています。) 手順は次の通り行ってください。

- (1) アガロースゲル電気泳動を行い、目的とする断片を含むアガロースゲル片を切り出す。
- (2) ゲル片の重量の 3 倍量の滅菌精製水を加える。
- (3) 65°C でアガロースを溶解させる。
- (4) DNA 25 ng 分の溶液を、そのまま鋳型 DNA として反応に用いる。

* 2 : このキットは [α -³²P] dCTP (111 TBq/mmol、370 MBq/ml) を用いて標識するように組み立てられていますが、[³H] 標識の dCTP も同様に使用できます。比活性の異なる [α -³²P] dCTP、あるいは [³H] dCTP を使用する場合は反応溶液中の dCTP の濃度が変化しないように、標識 dCTP の量を調節してください。また、放射性 dATP を用いて標識を行う時には、dNTP 混合液として dGTP、dCTP、dTTP 各 0.2 mM の溶液を用いてください。

* 3 : 反応時間は 2 ～ 3 分間でも十分高い比活性をもつプローブが得られますが、10 ～ 20 分間程度の反応で最も比活性の高いプローブが得られます (図 2.)。また、オーバーナイト反応においても、取り込み率の低下はごくわずかです。

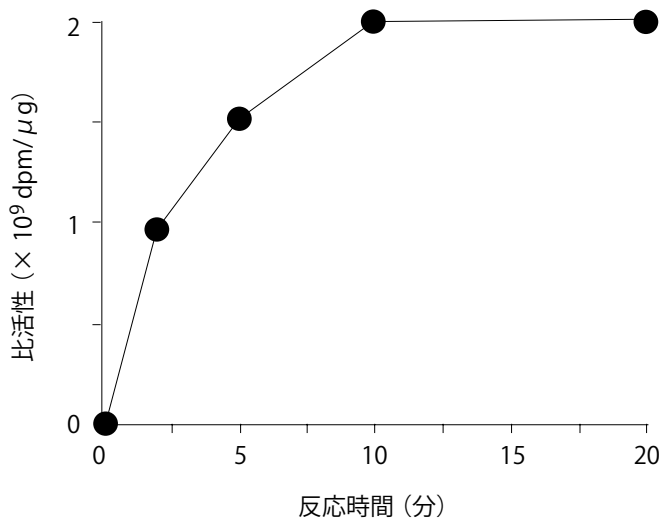


図 2. 反応時間と得られるプローブの比活性
λ-Hind III Fragment 25 ng をテンプレートに用いた。

V. 鋳型 DNA 量の変化によるプローブ比活性の変化

鋳型 DNA 量 (ng)	10	25	100	1,000
プローブの比活性 (dpm/μg)	3.0×10^9	1.9×10^9	0.68×10^9	0.77×10^8

λ-Hind III Fragment を [α -³²P] dCTP (111 TBq/mmol、370 MBq/ml) 1.85 MBq (50 μCi) を用いてラベルした場合。

VI. 取り込み率・比活性の測定

1. 反応液の少量を TE Buffer または滅菌精製水で 20 倍希釈する。
2. 希釈した反応液 3 μ l を DE 81 paper disc (Whatman 社製) 2 枚にスポットして、風乾する。
3. 2. の DE81 disc のうちの 1 枚を、5% Na₂HPO₄ 100 ml 程度で 5 分間ずつ 6 回、さらに滅菌精製水で 1 分間ずつ 2 回、エタノールで 2 回洗浄し風乾する。
4. 2. の未洗浄の DE81 disc と 3. で洗浄した DE81 disc のそれぞれを、液体シンチレーションカウンターで測定する。
5. 次の式により、取り込み率、プローブの比活性を求める。

$$\text{取り込み率 (\%)} = \frac{(\text{洗浄した DE81 disc のカウント ; cpm})}{(\text{未洗浄の DE81 disc のカウント ; cpm})} \times 100$$

$$\text{プローブの総量 (ng)} = 0.22 \times (\text{取り込み率 ; \%}) + (\text{鑄型 DNA 量 ; ng})$$

$$\text{プローブの比活性 (dpm/\mu g)} = \frac{110 \times (\text{取り込み率 ; \%})}{(\text{プローブの総量 ; ng})} \times 10^7$$

VII. 参考文献

- 1) A. P. Feinberg and B. Vogelstein. (1983) *Anal Biochem.* **132**, 6-13.
- 2) A. P. Feinberg and B. Vogelstein. (1984) *Anal Biochem.* **137**, 266-267.
- 3) J. M. Clark, C. M. Joyce, and G. P. Beardsley. (1987) *J Mol Biol.* **198**, 123-127.

VIII. 注意

- 本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- MEGALABEL、PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社