

製品コード 6070

研究用

Takara

MEGALABEL™

説明書

v201908

MEGALABEL は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と T4 Polynucleotide Kinase を用いて DNA の 5' 末端を効率よく標識するためのキットです。

本製品は、T4 Polynucleotide Kinase を用いたリン酸化反応、交換反応それぞれに、独自の Buffer 系を採用し、末端形状によらず 10^6 cpm/pmol 以上の高標識を可能にしました。

特に交換反応では、DNA の脱リン酸化・精製等の前処理を行わずに、交換反応用の Buffer を用いて直接標識反応を行うことができます。リン酸化反応による DNA、プライマー、プローブ等の通常標識反応についても、リン酸化反応用の Buffer を用いて同様に高標識が可能です。標識を行わずに DNA のリン酸化を行う場合も、この反応 Buffer で行うことができます。

I. 内容 (20 回分)

1. T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ l)	20 μ l
2. 5 × Exchange Reaction Buffer	100 μ l
3. 10 × Phosphorylation Buffer	50 μ l
4. Control DNA (λ -BstPI Fragment) (0.5 μ g/ μ l)	20 μ l

このほか $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ [Perkin Elmer 社; Code NEG502A (111 TBq/mmol, 3,000 Ci/mmol)] が必要です。また、5'-P 末端の DNA をリン酸化反応で標識する場合には、5' 末端の脱リン酸のために、アルカリホスファターゼ (BAP; 製品コード 2120A または CIAP; 製品コード 2250A) を用意してください。

未反応の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を除去する場合は、後述のように CHROMA SPIN Column、DEAE-Cellulose (DE-52) カラム、または Sephadex G-50 などのゲルろ過カラムや、その他ヌクレオチド除去用カラム等が別途必要です。

II. 保存

− 20°C

III. 操作

1. 交換反応で標識する場合

- (1) マイクロチューブに以下の反応液を調製し、全量を 25 μ l とする。

試薬	使用量
5'-Phosphorylated DNA fragments in TE Buffer (\leq 5 pmoles 5'-end)	14 μ l
5 \times Exchange Reaciton Buffer	5 μ l
[γ - ³² P] ATP (370 MBq/ml, 10 mCi/ml)	5 μ l
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ l)	1 μ l

- (2) 37°Cで 30 分間保温する。
(3) 70°Cで 5 ~ 10 分間加熱して、酸素を失活させる。
(4) 10 μ l の 7 M 酢酸アンモニウム (pH4.5) を加える。
※酢酸ナトリウムを用いる場合は、終濃度 300 mM となるように加えてください。
(5) 87.5 μ l (2.5 倍量) の冷エタノールを加え、- 20°Cで 30 ~ 60 分間保冷する。
(6) 遠心して沈殿を回収し、チューブの 2/3 容に 70% 冷エタノールで 2 回洗浄後、脱気乾燥する。
(7) 適当な Buffer に溶解する。
(4) ~ (7) の操作で未反応の [γ -³²P] ATP はほぼ除去されますが、更に完全に除く必要のあるときは、エタノール沈殿後に、Sephadex G-50 などのカラムを用いてゲルろ過精製を行ってください。
※フェノール処理で除タンパクをする場合は、(7) の操作の後で行ってください。

2. リン酸化反応で標識する場合

A. 脱リン酸化反応

- (1) マイクロチューブに次の反応液を調製し、全量を 150 μ l にする。

試薬	使用量
DNA fragments in TE Buffer	\leq 20 pmol
10 \times Alkaline Phosphatase buffer (500 mM Tris-HCl (pH9.0)、10 mM MgCl ₂)	15 μ l
Bacterial Alkaline Phosphatase (0.3~0.6 U/ μ l)	2 μ l
滅菌精製水	up to 150 μ l

- (2) 30 分間保温する。
(5' 突出末端の場合 ; 37°C、平滑または 3' 突出末端の場合 ; 55 ~ 60°C)
(3) 150 μ l のフェノール/クロロホルム (1 : 1) を加え、よく攪拌する。
(4) 遠心して上層を別のチューブに移す。
(5) (3) と (4) をもう一度繰り返す。
(6) 7.5 μ l の 3 M NaCl を加える (最終濃度 150 mM)。
(7) 375 μ l (2.5 倍量) の冷エタノールを加えて、- 20°Cで 30 ~ 60 分間保冷する。
(8) 遠心して沈殿を回収し、1 ml の 70% 冷エタノールで洗浄後、脱気乾燥する。
(9) 20 μ l 以下の TE Buffer で、沈殿を溶解する。

※ BAP の代わりに CIAP (10 ~ 30 U/ μ l) をお使いになる場合は、上記反応液に 2 μ l の CIAP を加え、50°Cで 30 分間保温してください。

B. リン酸化反応

(1) マイクロチューブに以下の反応液を調製し、全量を 25 μ l にする。

試薬	使用量
脱リン酸化 DNA	≤ 5 pmoles 5' end
10 \times Phosphorylation Buffer	2.5 μ l
[γ - 32 P] ATP (370 MBq/ml, 10 mCi/ml)	1 μ l
T4 Polynucleotide Kinase	1 μ l
滅菌精製水	up to 25 μ l

(2) 37°C で 30 分間保温する。

(3) 以下の操作は、1. (3) ~ (7) と同様に行う。

3. 合成 DNA (Primer、Linker Probe 等) を標識する場合

(1) マイクロチューブに次の反応液を調製し、全量を 10 μ l にする。

試薬	使用量
5'-OH 合成 DNA (5 ~ 10 pmoles)	3 μ l
10 \times Phosphorylation Buffer	1 μ l
[γ - 32 P] ATP (370 MBq/ml, 10 mCi/ml)	5 μ l
T4 Polynucleotide Kinase	1 μ l

(2) 37°C で 30 分間保温する。

(3) 以下の操作は、1. (3) ~ (7) と同様に行う。

※ 未反応の [γ - 32 P] ATP を完全に除く必要がある場合は、エタノール沈殿の代わりに続けて以下の (3)' ~ (7)' の操作を行ってください。

(3)' 70°C で 5 ~ 10 分間加熱して、酸素を失活させる。

(4)' 10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.3 M NaCl、1 mM EDTA で平衡化した DE52 カラム (100 ~ 200 μ l) を用意する。

(5)' 5 μ g のキャリア DNA を加え、容量を 100 μ l にした (3) の溶液をカラムにチャージする。

(6)' 平衡化バッファーでカラムをよく洗ったあと (通常カラム容量の 5 倍量以上)、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、2 M NaCl、1 mM EDTA で溶出する。

(7)' 500 μ l ずつ分画し、ピーク両分を集める。

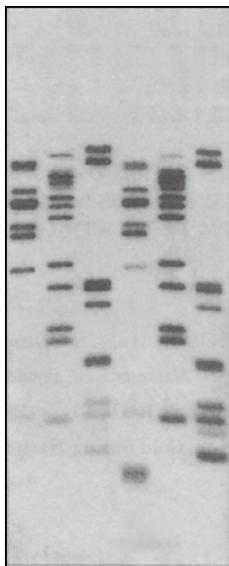
このほか CHROMA SPIN™ Column、Sephadex G-50、Bio-Gel P-60 などのカラムを用いたゲルろ過精製もあります。

IV. 使用例

- 「III. 操作 1.2.」に従い、 λ DNA-*Bst*P I fragments (5' 末端突出)、 λ DNA-*Hpa* I fragments (平滑末端)、 λ DNA-*Eco*T22 I fragments (3' 末端突出) 各 3 pmol を 111 TBq/mmol、3,000 Ci/mmol の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いて、リン酸化反応、交換反応で標識した。エタノール沈殿で回収した各 DNA フラグメントのアガロース電気泳動後のオートラジオグラムを示す。

また標識反応後、DE81 フィルター吸着画分に取りこまれた ^{32}P を液体シンチレーションカウンターで計測した。

lane 1 2 3 4 5 6



lane 1: λ -*Hpa* I fragments
 2: λ -*Bst*P I fragments
 3: λ -*Eco*T22 I fragments
 4: λ -*Hpa* I fragments
 5: λ -*Bst*P I fragments
 6: λ -*Eco*T22 I fragments

交換反応
 リン酸化反応

	交換反応	リン酸化反応
λ - <i>Bst</i> P I fragments	5.4×10^6 cpm/pmol	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

※ 交換反応で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を 370 KBq、10 μCi 用いた場合の標識効率、1.85 MBq、50 μCi 用いた場合の 1/3 ~ 1/4 になります。

- 「III. 操作 3.」に従い、17 mer の合成 DNA オリゴヌクレオチドを標識し、DE81 フィルター吸着画分に取り込まれた ^{32}P を液体シンチレーションカウンターで計測した。

DNA 量	ATP : DNA	取り込まれた ^{32}P	^{32}P count
5 pmol	2 : 1	49.8%	10.6×10^6 cpm/pmol
10 pmol	1 : 1	71.2%	7.8×10^6 cpm/pmol

※ DNA の末端をすべて標識するには、DNA の末端数の 1.5 倍量以上の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP が必要です。

V. 製品に関する注意

1. Buffer は室温で融解させてください。融解後は速やかに氷冷水中に移し、お使いになる直前にボルテックスなどにより、よく攪拌してください。
2. Buffer を -20°C で保存すると、凍結により白濁する事がありますが、標識反応には影響ありません。
3. 反応に用いる DNA はエタノール沈殿などで精製してください。制限酵素反応液組成のまま用いると標識効率が低下します。
4. 5 pmoles 以上の DNA (約 1,000 bp 以上) を標識反応に供すると標識効率が 10^6 cpm/pmol 以下に低下する事があります。
5. 交換反応で DNA フラグメントを標識する場合、数百 bp 以下のフラグメントは標識効率が低下する事があります。
6. RI 標識をおこなわず、単に 5' 末端リン酸化反応に本キットを使用される場合は [γ - 32 P] ATP のかわりに 10 mM ATP を 5 μ l 反応系に加えてください。
7. リン酸化反応の場合のみ 32 P のかわりに [γ - 35 S] ATP も使用可能です。

VI. 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.

VII. 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 はタカラバイオ株式会社の、CHROMA SPIN は Takara Bio USA, Inc. 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