

研究用

Takara

***BcaBEST™* Labeling Kit**

説明書

BcaBEST Labeling Kit は、ハイブリダイゼーション等に用いる DNA を [α - 32 P]、 3 H] dCTP を用いてラベルし、短時間で DNA プローブを作製するためのキットです。本キットは 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。これまでよく用いられた Klenow Fragment の場合には反応時間が長く、GC 含量が高い鋳型 DNA あるいは高次構造を取りやすい鋳型 DNA を用いると取り込み率が低下しやすい欠点がありました。これに対し、*Bacillus caldotenax* 由来の *BcaBEST DNA Polymerase* は耐熱性で、かつ伸長性の高い酵素です。*BcaBEST DNA Polymerase* と 9 mer のランダムプライマーを用い、50 ~ 55°C で反応させることにより、高次構造を取るような DNA を鋳型にしても 10 分で DNA の標識ができます。また、*BcaBEST DNA Polymerase* は伸長性に優れているため、Klenow Fragment を用いた場合より長いプローブが合成されるほか、exonuclease 活性を欠失させているため、長時間反応させても取り込み率は低下しません (表 1)。

I. 内容 (40 回用)

1. Random Primer (9 mer)	80 μ l
2. 10 \times Buffer	100 μ l
3. dNTP Mixture (dGTP, dATP, dTTP) (各 0.2 mM)	100 μ l
4. <i>BcaBEST DNA Polymerase</i> (2 U/ μ l)	40 μ l
5. Control DNA (λ - <i>Hind</i> III Fragment) (25 ng/ μ l)	10 μ l

【キット以外に必要な試薬】

1. 滅菌精製水
2. TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA)
3. 標識 dCTP 水溶液
このキットは Perkin Elmer 社 Code No. NEG513H の [α - 32 P] dCTP (111 TBq/mmol, 370 MBq/ml)^注の使用を標準として組立てられていますが、 3 H] dCTP も使用できます。ただし、そのような場合は、dCTP 量が 16.5 pmol になるように調製してください。

注：現在の表記は dCTP, [α - 32 P]- 3000 Ci/mmol 10 mCi/ml

II. 保存

− 20°C

表 1. Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (製品コード 6045) との比較

	BcaBEST Labeling Kit	Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2
反応時間	10分	10分
プローブの比放射活性	~ 10 ⁹ dpm / μg	~ 10 ⁹ dpm / μg
鋳型 DNA	高次構造や、GC 含量の影響を受けない。	高次構造をとるものや GC 含量の多いものは、取り込み率が低下する場合がある。

注：両キットともに 300 bp 以下の鋳型 DNA を使用する場合は取り込み率が低下することがあります。

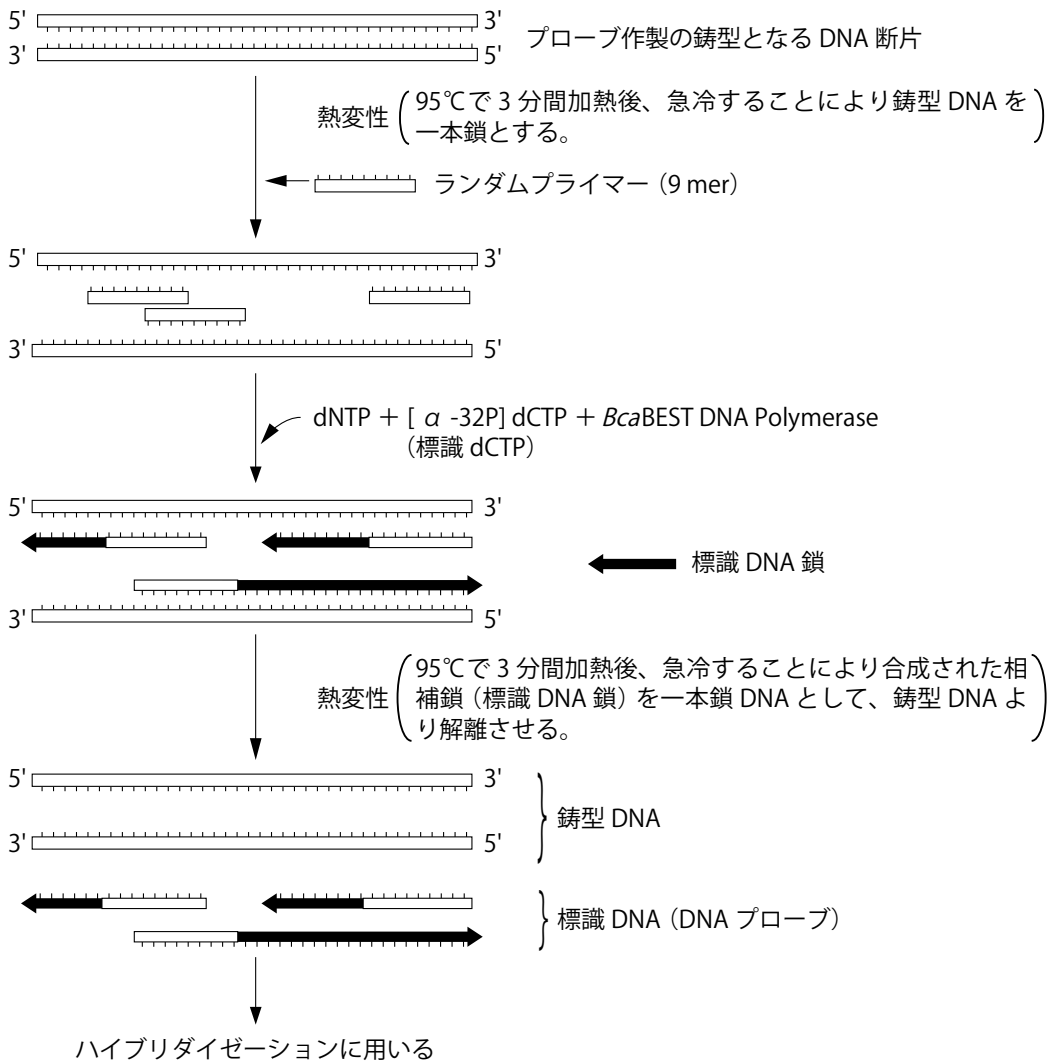


図 1. BcaBEST Labeling Kit の原理

III. 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)	14 μ l に fill up

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. BcaBEST DNA Polymerase を 1 μ l 加え、50 ~ 55°C で 10 分間*³ 保温する。
4. 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、ゲル濾過、スピнкаラム (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up : 製品コード 740609.10/.50/.250 など) あるいはエタノール沈殿で未反応の標識 dCTP を除去してください。

* 1 : 鋳型 DNA

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、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 : 標識 dCTP

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立てられていますが、[³H] 標識の dCTP も同様に使用できます。ただし、そのような場合は、dCTP 量が 16.5 pmol になるように調製してください。
また、標識 dATP を用いて標識を行うときには、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

反応時間は、10 分で十分高い比放射活性を持つプローブが得られます。
取り込み率が低い場合はオーバーナイト反応まで時間をのばすことも可能です。
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。

IV. 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 / μ g)	2.9×10^9	1.8×10^9	0.68×10^9	0.78×10^8

λ -Hind III 断片 [α -³²P] dCTP (111 TBq/mmol, 370 MBq/ml) 1.85 MBq (50 μ Ci) を用いた場合

V. 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 倍に希釈する。
2. 希釈した反応液 3 μ l を DE81 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 1 枚を、0.5 M 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。

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

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

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

VI. 参考文献

- 1) A. P. Feinberg and B. Vogelstein. *Anal.Biochem.* (1983) **132**: 6-13.
- 2) A. P. Feinberg and B. Vogelstein. *Anal.Biochem.* (1984) **137**: 266-267.

VII. 関連製品

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

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。
- ・BcaBEST、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