

## iCloning

克劳宁(北京)生物科技有限公司

**产品名称:** Tn5 转座酶

**Cat #:** TN5-100, TN5-200

**储存条件:** -20°C保存

### 制品说明:

MCLAB的Tn5转座酶是一种Tn5转座酶突变体的酶。这种酶可使Tn5转座子在体外随机插入靶DNA。有效的转座反应需要在Tn5转座子的每一端都存在一个特定的19bp转座酶识别序列 (Mosaic End或ME序列)。

Tn5转座酶催化反应过程涉及多步“剪切和粘贴”机制。最初,该酶与转座子的19bp ME结合,形成一种称为转座子的复合物。随后,转座子对靶DNA的磷酸二酯骨架随机切割。最后, Tn5转座酶催化转座子3'-OH末端与靶DNA暴露的5'-磷酸化末端进行共价连接。该转座反应使得转座子插入位点的侧翼产生9-bp的重复序列。

### Illumina平台生成转座子操作步骤:

#### 一、制备Adapter混合物

1、Illumina平台参考引物的名称和序列:

Primer A: 5' -TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

Primer B: 5' -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

Primer ME: 5'-pCTGTCTCTTATACACATCT-3

2、用退火缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 将引物Primer A、Primer B、Primer ME溶解至终浓度为100 $\mu$ M。

3、制作反应体系:

反应1		反应2	
Primer A (100 $\mu$ M):	10 $\mu$ l	Primer B (100 $\mu$ M):	10 $\mu$ l
Primer ME (100 $\mu$ M):	10 $\mu$ l	Primer ME (100 $\mu$ M):	10 $\mu$ l
总体积:	20 $\mu$ l	总体积:	20 $\mu$ l

4、将所有试剂震荡混匀,短暂离心将液体收集到管底,然后放置于PCR仪上,执行下面程序:

热盖105°C	时间
75°C	15分钟
50°C	10分钟
50°C	10分钟
40°C	10分钟
25°C	30分钟

5、反应完成后,请将反应1和反应2产物等体积混合,称为Adapter混合物,请于-20°C储存。

#### 二、制备转座子

1. 请将以下组分准备到无菌PCR试管中:

## iCloning

克劳宁(北京)生物科技有限公司

组分	浓度	体积
Adapter Mix (50 $\mu$ M)	50 $\mu$ M	4 $\mu$ l
Tn5转座酶	10 pmol/ $\mu$ l	20 $\mu$ l

2. 用移液管吸打20次, 充分混合。
3. 室温 (25°C) 孵育1小时, 获得的转座子可以直接用于DNA标记, 也可以放在-20°C储存。

### 三、DNA 标签

- 1、请室温下解冻每个试剂, 使用前请轻轻上下摇以保证试剂完全混匀。
- 2、请将以下组分准备到无菌PCR试管中:

组分	体积/数量
5X Reaction Buffer	4 $\mu$ l
转座子	1 $\mu$ l
DNA 模板	50-100 ng
ddH <sub>2</sub> O	补至终体积为 20 $\mu$ l

- 3、用移液管吸打20次, 充分混合。
- 4、在55°C条件下孵育10分钟, 然后加入5 $\mu$ L的10XStop Solution, 混匀, 然后, 在55°C下再孵育5分钟。标记产物可用于片段分布分析、二代测序文库构建的纯化。如果片段太长, 可增加转座子的数量以减小片段的大小, 否则, 会减少转座子的数量以增加片段的大小。

该产品仅限于实验科学研究用, 若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途, 本公司概不承担任何责任。