

MDmaker®Tn5 转座酶



适用于 Illumina 平台的二代测序建库酶

Catalog # MD-3001

规格: 25U、100U

公司网址: www.mdtkbio.com

服务电话: 18601040016

企业邮箱: support@mdtkbio.com

[产品描述]

概述

MDmaker®Tn5 转座酶是野生型 Tn5 转座酶的高活性突变体, 可以高效的将 Tn5 转座子插入到目标序列。MDmaker®Tn5 转座酶识别 Tn5 转座子酶序列的内端 (inside end, IE)、外端 (outside end, OE)、和嵌合端 (mosaic end, ME) 序列, 含有 ME 序列片段的体外转座效率最高。MDmaker®Tn5 转座酶的插入位点具有很高的随机性, 因此被广泛的用于体外转基因 (外源基因整合到宿主细胞) 和二代测序建库等领域。

来源

含有 MDmaker®Tn5 转座酶序列的大肠杆菌菌株。

应用

- 1) 体外转基因操作
- 2) 二代测序建库

[组分&说明]

储存: -20°C可保存 24 个月; 避免反复冻融。

组成:

MDmaker®Tn5 转座酶组分

| 组分 | 25U pack size | 125U pack size |
|-------------------------|---------------|----------------|
| MDmaker®Tn5 转座酶 (1U/uL) | 25uL | 25uL×5 |
| 5×LM 缓冲液 | 100uL | 100uL×5 |
| 10×TPS 缓冲液 | 100uL | 100uL×5 |

Buffer 组分:

- 1) 贮存溶液: 50mM Tris-HCL (pH 8.0 at 25°C), 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.1%Triton X-100 和 50%甘油 (v/v);
- 2) 反应缓冲液: (随酶提供) 5×LM 缓冲液;
- 3) 10×TPS 缓冲液: 100mM Tris, pH7.5-8.0, 500mM NaCl。

单位定义:

1 单位 MDmaker®Tn5 转座酶指 37°C条件下反应 1 小时, 完全切割 1ug 含有识别序列的 DNA 片段所需要的酶量。

[使用方法]

1. 体外基因操作

MDmaker®Tn5 转座酶可以将含有成对识别序列的双链 DNA 片段（如下图所示）随机整合到宿主细胞的基因组中。整合的过程分为两步；

首先，MDmaker®Tn5 转座酶同含有选择标记和识别序列的目标基因片段结合，形成转座体 (Transposome)；之后，通过转化的方式将转座体导入宿主细胞，利用选择标记筛选成功整合目标基因的宿主细胞。



1.1 转座体的构建，将下面组分加入到反应体系中：

| 组分 | 体积 |
|--------------------------------|-----|
| MDmaker®Tn5 转座酶 | 4uL |
| 目标基因片段（含有选择标记和成对识别序列，100ug/ml） | 2uL |
| 100%甘油 | 2uL |

1.2 充分混匀，室温（25℃）放置 30 分钟；

1.3 反应产物也可放置于-20℃备用；

1.4 取 1-4uL 反应产物进行后续的转化实验。

2 二代测序建库

2.1 转座体 (Transposome) 的构建

2.1.1 将下列组分加入到反应体系中（识别序列以 ME 为例）；

注：其中 ME 序列必须为双链，且末端磷酸化，接头序列按照二代测序仪器的要求进行配置。

| 组分 | 体积 |
|-------------------------|---------|
| 连接有 ME 序列的接头（10pmol/uL） | 1.5-4uL |
| 10×TPS 缓冲液 | 2uL |
| 无菌水 | 至 20uL |

2.1.2 充分混匀于 PCR 管内；

2.1.3 将管子至于 95℃恒温箱内 2min；

2.1.4 然后，逐渐平衡到 25℃；

2.1.5 加入 1-2uL Tn5 转座酶；

2.1.6 充分混匀并孵育在 25℃，30min；

2.1.7 反应后的 Transposome 转座体可立即进行后续反应，也可-20℃保存。

2.2 片段化反应 (Tagmentation)

2.2.1 将下列组分加入到反应体系中

| 组分 | 体积 |
|-------------------|-------|
| 人基因组 DNA | ~50ng |
| 5×LM 缓冲液 | 6uL |
| 转座体 (Transposome) | 4ul |

无菌水 至 30uL

2.2.2 对照体系中的转座体 (Transposome) 用水代替

2.2.3 充分混匀, 孵育 37°C, 2 小时, 或 55°C, 10~15min;

如果片段化反应结果不理想 (如片段较大), 可采取下面三种方式:

1. 在转座体构建步骤变更 ME 序列和 Tn5 转座酶的用量
2. 在片段化反应步骤变更转座体的用量
3. 在片段化反应中添加 1-5mM 的 Mg^{2+} 离子 ($MgCl_2$)

2.2.4 测序前, 所得片段可以用试剂盒或者磁珠进行纯化。如果片段不经纯化直接进行 PCR 富集, 片段中的转座酶可能会影响 PCR 过程

[质量控制]

核酸外切酶活性: 50uL 反应体系中, 20U 本酶与 1ug 的 HindIII 消化的 λ DNA 于 37°C 温育 4 小时, DNA 的电泳条带无明显变化。

RNase 活性: 50uL 反应体系中, 100U 本酶与 250ug 大肠杆菌 rRNA 于 37°C 温育 2 小时, 经琼脂糖电泳检测, 被降解的 rRNA 小于 1%。

消化结果如图:

The relationship between fragment size and amount of enzyme

