

Code No. 6030

研究用

TaKaRa

Deletion Kit For
Kilo-Sequencing

说明书

目 录

| 内 容 | 页 码 |
|--------|-----|
| ● 制品说明 | 1 |
| ● 制品内容 | 1 |
| ● 保 存 | 1 |
| ● 原 理 | 2 |
| ● 操作方法 | 2 |
| ● 参考文献 | 4 |
| ● 关联产品 | 5 |

● 制品说明

本制品是对 M13mp 系列噬菌体载体 (mp18、19) 和 pUC 系列质粒载体 (pUC18、19 和 pUC118、119) 多克隆位点中插入的数千个碱基片段进行测序的试剂盒。

同时本制品也可有效用于 DNA 片段末端的单向缺失。

本制品是 Steven Henikoff 法 (Gene(1984)28、351~359) 和 Celeste Yanision-Perron 法 (Gene(1985)33、103~119) 的改良品。

● 制品内容 (5 次量)

| | |
|------------------------------------|-------------|
| Exonuclease III (180 U/ μ l) | 10 μ l |
| Exo III Buffer | 500 μ l |
| Mung Bean Nuclease (25 U/ μ l) | 20 μ l |
| Mung Bean Nuclease buffer | 500 μ l |
| Klenow fragment (2 U/ μ l) | 10 μ l |
| Klenow Buffer | 250 μ l |
| Ligation Solution A | 500 μ l |
| Ligation Solution B | 60 μ l |

* Ligation solution A、Ligation solution B 与 DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021) 为同种制品。

【试剂盒以外所需试剂】

- 限制酶和适当的缓冲液
- TE* - 饱和苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1, v/v/v)
- 氯仿/异戊醇
- 3M 醋酸钠
- 乙醇 (100%和 70%)
- 大肠杆菌感受态细胞和 SOC 培养基

* TE buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

● 保 存: -20°C

● 原 理

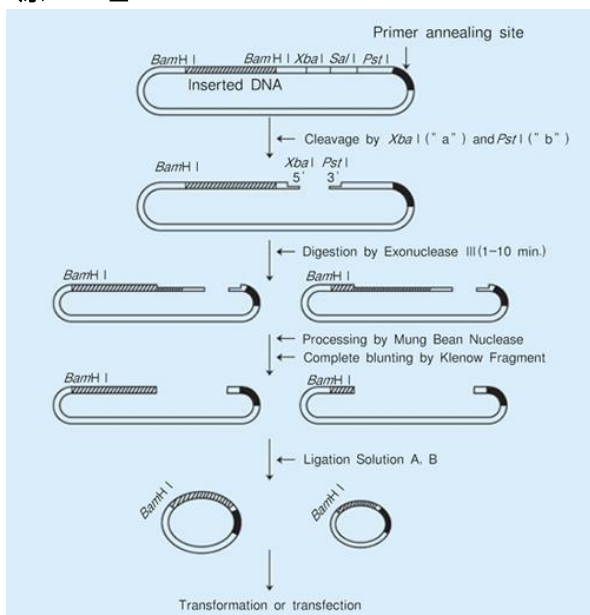


Figure 1. Outline of the protocol

本制品是利用 Exonuclease III 的 3' → 5' 外切酶活性制作连续的单向缺失 DNA 片段的试剂盒。Exonuclease III 从 5' 突出末端或平滑末端的 3' 端连续降解核苷酸，但对于 3' 突出末端的降解活性较低。基本上，插入的目的 DNA 是被连续消化的，但测序引物的退火结合位点通过连接 4 碱基的 3' 突出的限制酶切位点而避免被消化。分取不同时间间隔的 Exonuclease III 反应液，用 Mung Bean nuclease/buffer cocktail 处理，终止 Exonuclease III 反应并同时切断互补链的 5' 突出末端。使用 Klenow Fragment 进行平滑化后，进行连接环化，转化到感受态细胞中。

● 操作方法

1. 制备质粒和选择限制性内切酶

将待测序的碱基序列的 DNA 片段插入 M13mp 系列噬菌体载体和 pUC 系列质粒载体的多克隆位点克隆后制备成 cccDNA (covalently closed circular DNA)。为了使插入质粒 DNA 片段从靠近引物结合位点的一侧开始缺失，在引物结合位点和插入 DNA 片段之间利用 2 个限制性内切酶（假如插入 DNA 片段侧使用限制性内切酶 a，引物结合位点侧使用限制性内切酶 b）切成适当长度的质粒 DNA 片段。使用的 a, b 两种限制性内切酶均在插入 DNA 片段上无酶切位点。限制性内切酶 a：在插入 DNA 片段侧酶切后形成 5' 突出末端或平滑末端 (*EcoR* I、*Sma* I、*Xma* I、*Bam*H I、*Xba* I、*Sal* I、*Acc* I、*Hinc* II、*Hind* III 等)。限制性内切酶 b：酶切后形成 3' 突出末端 (*Sac* I、*Kpn* I、*Pst* I、*Sph* I 等，识别 8 个碱基的内切酶 *Sse*8387 I 可在 pUC18、19、118、119 和 M13mp18、19 的 *Pst* I 酶切位点切断。) 使用 ocDNA 制备缺失突变体时，由于 Exonuclease III 在切口处开始降解 DNA 形成非特异性缺失的突变体，因此必须使用 ocDNA 含量较低的质粒（或噬菌体）。ocDNA 含量较高时，可用 CsCl 密度梯度离心法分离 ocDNA。使用 *Sac* I 等限制性内切酶时，内切酶的 Star 活性可以使 DNA 质粒出现切口，Exonuclease III 沿切口向引物的结合位点方向降解 DNA。

[例]

在 M13 mp18 载体的 *Bam*H I 位点克隆 DNA 片段时, 限制性内切酶 a 可使用 *Xba* I、*Sal* I、*Acc* I 和 *Hinc* II, 限制性内切酶 b 可使用 *Sse*8387 I、*Pst* I 和 *Sph* I。

注意事项:

大部分 3' 突出末端不能被 Exo III 切断, 但有些限制酶如 *Apa* I、*Sac* II 或 *Sfi* I 切断后可以进行 Exo III 处理。因此, 这几种酶不能用作 b 酶, 否则不能保护载体免受外切酶酶切。

2. 缺失突变体的制备

- (1) 准备 5~10 μ g 插入了待测序碱基序列 (或制备单向缺失 DNA) 的 M13 RF DNA 或 pUC 质粒 (cccDNA) (1~2 pmol)。
- (2) 进行限制性内切酶 a、b 的酶切反应。
- (3) 加入等体积的 TE 饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (体积比为 25: 24: 1) 溶液抽提。离心后将上清液移至新的离心管, 再加入等体积的氯仿: 异戊醇 (体积比 24: 1) 溶液抽提。
- (4) 离心后将上清液移至新的离心管中, 加入 1/10 体积的 3 M 醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇后, -70°C 放置 10 分钟或 -20°C 放置 1 小时以上, 离心回收沉淀物。再加入 70%乙醇清洗沉淀后真空干燥。
- (5) 将 (4) 回收的 DNA 溶解于 100 μ l Exo III Buffer 中。
- (6) 将 100 μ l MB Nuclease Buffer 加入到新的离心管中。
- (7) 在 (5) 的 DNA 回收液中加入 1 μ l (180 U) 的 Exonuclease III, 振荡混合后 37°C 反应。每隔一分钟取 10 μ l 反应液加入到 (6) 的 100 μ l MB Nuclease Buffer 中, 终止反应。在上述条件下, 每分钟能降解约 300 bases。如果需要的缺失突变体在 300 bases 以下, 那么应在 25°C 每隔 30 秒将反应液加入到 100 μ l MB Nuclease Buffer 中。每隔 1 分钟 (共 10 分钟) 向 100 μ l MB Nuclease Buffer 中加入 10 μ l 含 Exonuclease III 的反应液, 最终体积为 200 μ l。
- (8) 65°C 热处理 5 分钟, 使 Exonuclease III 失活, 然后再将 tube 转移到 37°C 。
- (9) 加入 2 μ l (50 U) 的 Mung Bean Nuclease。
- (10) 37°C 反应 15~30 分钟。
- (11) 重复操作 (3) 和 (4)。
- (12) 将 (11) 回收的 DNA 溶解于 50 μ l Klenow Buffer^{*1}。
- (13) 加入 1 μ l (2 U) 的 Klenow Fragment, 37°C 反应 15 分钟。
- (14) 取上述 5~10 μ l DNA 溶液加入至 100 μ l Ligation Solution A 中。
- (15) 再加入 12 μ l Ligation Solution B, 振荡混合。
- (16) 16°C 反应 1 小时~过夜^{*2}。
- (17) 加入 1/10 体积的 3 M 醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇后, -70°C 放置 10 分钟或 -20°C 放置 1 小时以上, 离心回收沉淀物, 再加入 70%乙醇清洗沉淀后真空干燥。
- (18) 回收的 DNA 溶解于 40 μ l 限制性内切酶 a 的 Buffer 后, 再使用数 U 的限制性内切酶 a 的进行酶切反应。将酶切反应液直接转化至 200 μ l 以上的 *E. coli* 感受态细胞^{*3}。

*1: Mung Bean Nuclease 处理后的 DNA, 其末端大部分已平滑化, 但是在 Klenow Fragment 的完全末端修复后可提高连接效率。

*2: Ligation Solution A、B 的连接反应时间可以为 15 分钟~2 小时, 但过夜反应可提高连接效率。

*3: 使用限制性内切酶 a 进行酶切反应, 可降低 (2) 的未完全被切断的质粒以线性 DNA 形式转化时所造成的背景。

3. 缺失突变体的筛选

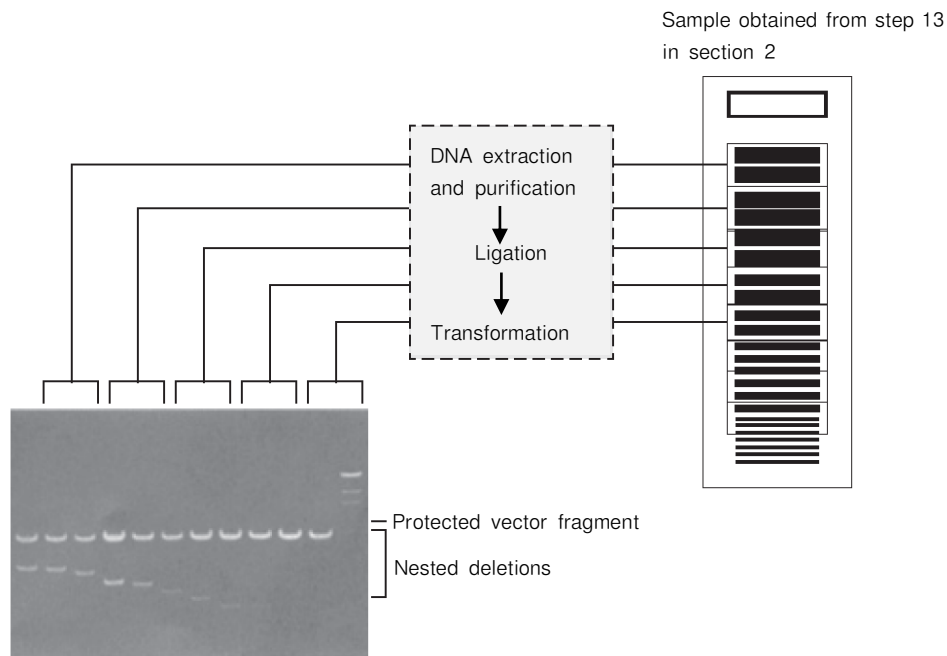
在完成操作 2 后, 每个平板可获得数十个至数百个菌落或噬菌斑, 挑选 50 个菌落 (插入 DNA 片段长时挑选 100 个克隆), 在 2 ml 培养液中进行小规模培养后制备 DNA 质粒。然后使用适当的限制性内切

酶酶切后进行凝胶电泳，确认DNA片段大小。挑选片段大小不同的缺失重组体克隆，制备Template DNA后进行测序。

[选择] DNA片段大小的选择

将2- (13) 的DNA溶液进行凝胶电泳后确认DNA片段的大小，按照DNA片段的大小可以调整[3. 缺失突变体的筛选]的DNA片段。

- (1) 将2-13的DNA溶液 (5~10 μg) 进行凝胶电泳。选择适当的片段切胶回收DNA，可使用方便快捷回收的试剂盒，如NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Cat. #740609.10/.50/.250)。
- (2) 在10 μl 的TE Buffer中溶解DNA，加入80 μl Ligation Solution A和15 μl Ligation Solution B。16 $^{\circ}\text{C}$ 保温15分钟。(可以延长保温时间，但通常情况下，如果DNA量小且是纯化的，那么15分钟就足够了。)
- (3) 取上述10 μl 连接液转化到100 μl *E. coli*感受态细胞中，冰中放置15分钟。然后42 $^{\circ}\text{C}$ 保温30秒。加入890 μl 的SOC培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 保温15分钟，涂板。



Analysis of the subclones (2 clones ea.)

Figure 2. Deletion mutation

● 参考文献

- 1) Henikoff S. *Gene*. (1984) **28**: 351-359.
- 2) Yanisch-Perron C, Vieira J, and Messing J. *Gene*. (1985) **33**: 103-119.
- 3) Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T. *Molecular Cloning*. (1989) A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 4) Ozkaynak E and Putney S D. *BioTechniques*. (1987) **5**: 770-773.

● 关联产品

| | |
|--|---------------|
| M13 mp18 RF DNA | Code No. 3118 |
| pUC18 DNA | Code No. 3218 |
| pUC19 DNA | Code No. 3219 |
| pUC118 DNA | Code No. 3318 |
| pUC119 DNA | Code No. 3319 |
| pTV118N DNA | Code No. 3328 |
| pHSG298 DNA | Code No. 3298 |
| pHSG299 DNA | Code No. 3299 |
| pHSG398 DNA | Code No. 3398 |
| pSTV28 DNA | Code No. 3331 |
| pSTV29 DNA | Code No. 3332 |
| pTWV228 DNA | Code No. 3333 |
| M13 primer M3 | Code No. 3831 |
| M13 primer M4 | Code No. 3832 |
| M13 primer RV | Code No. 3830 |
| NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Cat. #740609.10/.50/.250) | |

*: M13引物可用于对M13和pUC来源的载体多克隆位点插入片段进行测序。引物的位置分别在单链噬菌体和噬菌粒模板互补的正链和负链上。对于双链DNA模板，负链引物用于读取 $lacZ'$ 转录子同向的DNA序列，而正链引物用于读取相反方向的序列。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202103Da