

Tn5 转座酶

T745702

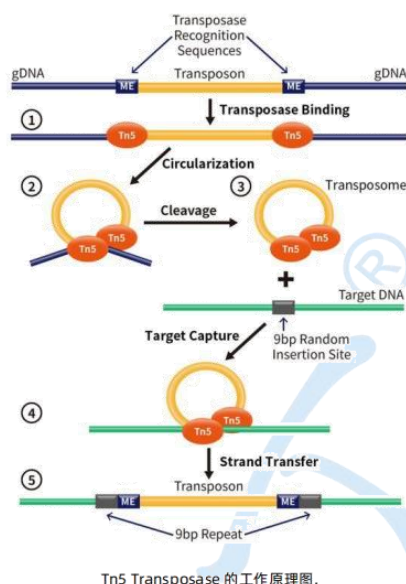
储存条件

长期储存 -20℃ (24 个月) ; 避免反复冻融。

产品简介

本公司生产的 Tn5 转座酶, 即 Tn5 Transposase, 是一种来源于 E.coli、经过改造具有极高活性的 Tn5 转座酶突变体, 可以高效地将 Tn5 转座子 (Transposon) 随机插入到目标序列, 对于真核和原核生物的 DNA 都有极高的转座插入效率。本产品可以特异性识别两端含有嵌合末端序列(Mosaic End sequence, ME)的 DNA 片段(包括含有 ME 序列的引物), 最终形成 Tn5 转座体(Tn5 Transposome), 该转座体可以随机结合靶 DNA 并切割插入其携带的 DNA 片段。Tn5 转座酶被广泛用于体外转基因(外源基因整合到宿主细胞)和二代测序(Next Generation Sequencing, NGS)建库等领域。转座子(Transposon), 也称为转座元件(Transposable elements, TEs)、跳跃基因(Jumping genes), 是一种可以在基因组中“跳跃”到不同位置的遗传元件(Genetic elements)。尽管转座子经常被称为跳跃基因, 转座子还是会相对比较稳定地存在于相应的整合位点, 并且大部分转座子最终会变得没有跳跃活性。转座子最早由 Barbara McClintock 在玉米中发现, 并在 1983 年获得了诺贝尔生理医学奖。后续研究发现转座子系统广泛存在于生物界, 并逐渐研究开发成为基因分析的有效工具。Tn5 转座酶是本公司技术平台表达、纯化获得的重组蛋白, 与野生型 Tn5 转座酶相比, 其插入效率至少提升 1000 倍, 具有转座随机性好、稳定性高、插入位点易测序等特点。

来源 (Source)	转座子 Tn5
外观 (Appearance)	无菌液体
保存液 (Storage Buffer)	50mM HEPES(pH7.2),100mM NaCl,0.1mM EDTA,1mM DTT,0.1% Triton X-100,50%(v/v) Glycerol。
酶浓度 (Enzyme Concentration)	40μM
纯度 (Purity)	≥90%
活性定义 (Activity Definition)	基础活性, 快速反应



组分

T745702	Component	800pmol	5*800pmol	Storage
T745702A	Tn5 Transposase (40μM)	20μl	5*20μl	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.
T745702B	Reaction Buffer (5X)	200μl	5*200μl	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.
T745702C	Stop Buffer (5X)	300μl	5*300μl	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.
T745702D	Annealing Buffer (5X)	1ml	5*1ml	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.

产品应用

本产品可用于二代测序(NGS)文库构建时的片段化和加接头；将测序引物引入克隆 DNA 或质粒；细菌基因敲除库的建立；新型细菌菌株工程改造；目的基因的插入失活；将 T7 转录启动子、抗性标记等插入靶 DNA 等。

产品优势

具有转座随机性好、稳定性高、插入位点易测序等特点。

使用说明

1. 体外转座子插入反应和转化。

a.Tn5 转座子的设计。Tn5 转座子是两侧带有 19bp ME 序列的 DNA 片段，可以使用含有 ME 序列的上下游引物进行 PCR 合成。为了获得最佳的转座效率，在两端的 PCR 引物中需要添加一个 5'磷酸基团。典型的 Tn5 转座子参考图 2。

ME 序列: 5'-[phos]CTGTCTCTTATACACATCT-3

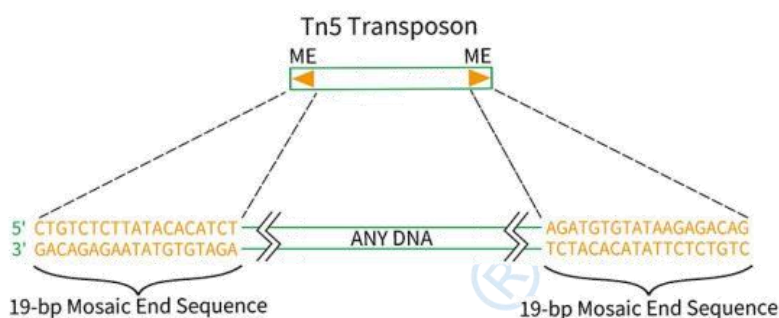


图 2. Tn5 转座子示意图。Tn5 转座子其两端为 19bp ME 序列，ME 序列可被 Tn5 转座酶特异性识别。

b.按照下表制备转座子插入混合物。配制过程中需要注意目标 DNA 纯度，确保无外源核酸污染。

Component	Volume
Reaction Buffer (5X)	2μl
Target DNA*	0.2μg
molar equivalent Tn5 Transposon	x μl
Tn5 Transposase (40μM)	1μl
ddH ₂ O	To 10μl

*注：为了避免多余片段的插入，需要计算反应中使用的目标 DNA 摩尔数，并加入等摩尔量的 Tn5 转座子片段以减少产生过多插入的可能性。 $\mu\text{mol target DNA} = \mu\text{g target DNA} / [(\text{base pairs in target DNA}) \times 660]$ ，例如：0.2μg 5000bp 的目标 DNA = $0.2\mu\text{g} / [5000\text{bp} \times 660] = 0.06 \times 10^{-6} \mu\text{mol} = 0.06\text{pmol}$ 。

c.混匀后 37℃孵育 2 小时。

d.加入 2μl Stop Buffer (5X)，混匀后 55℃孵育 10 分钟终止反应。

e.取 1μl 混合物电击转化到感受态细胞中，根据抗性标记筛选阳性菌株。未使用的混合物可以-20℃保存。推荐的电击转化条件：50μl 感受态细胞，1μl 混合物，2 毫米电击杯，2500V，电击时间 5 毫秒。转化条件可根据该条件的转化效果进行优化。转座的克隆数主要取决于所转化的宿主细胞、内源性的限制修饰系统及感受态细胞的转化效率。

2.Tn5 转座体复合物(Tn5 Transposome complex)的构建和转化后的体内插入。

a.按照下表依次加入相应试剂，制备 Tn5 转座体复合物混合物。

Tn5 Transposon DNA (100μg/ml in TE Buffer)	2μl
Tn5 Transposase (40μM)	4μl
Glycerol (100%)	2μl
Total Reaction Volume	8μl

注 1：本反应无须 Mg^{2+} 催化，请勿使用 Reaction Buffer (5X)。

注 2：参考 1a 中 Tn5 的转座子设计，Tn5 Transposon DNA 为含选择标记(如抗性标记)、成对识别序列(如 ME 序列)和目标基因的双链 DNA，可通过 PCR 等方法获得。

注 3：本反应体系可根据实际需要进行放大或缩小。

b.混匀后室温孵育 0.5-1 小时。

c.取 1 μ l 的转座体复合物电击转化到感受态细胞中，在体内进行插入，并根据抗性标记筛选阳性菌株。推荐的电击转化条件：50 μ l 感受态细胞，1 μ l 转座体复合物，2 毫米电击杯，2500V，电击时间 5 毫秒。转化条件可根据该条件的转化效果进行优化。转座的克隆数主要取决于所转化的宿主细胞、内源性的限制修饰系统及感受态细胞的转化效率。

d.构建好的转座体复合物-20 $^{\circ}$ C 可以保存 1 年。

3.构建二代测序所需的 Tn5 转座体(Tn5 Transposome)。

a.ME 和接头(Adapters)的序列。

ME: 5'-[phos]CTGTCTCTTATACACATCT-3'

Primer 1: 5'-TCGTCCGCGAGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

Primer 2: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

b.制备 Adapter 1 和 Adapter 2。

按照下表分别配制 Adapter 1 和 Adapter 2 退火反应体系。退火反应后 Adapter 1 或 Adapter 2 的终浓度为 200 μ M。

Component	Volume
Annealing Buffer (5X)	10 μ l
ME (500 μ M)	20 μ l
Primer-1 or 2 (500 μ M)	20 μ l
Total Reaction Volume	50 μ l

在 PCR 仪设置退火反应程序：

Step	Temperature
1	95 $^{\circ}$ C, 2min
2	95 $^{\circ}$ C, 8s, -0.1 $^{\circ}$ C per cycle
3	GOTO step 2, 700 cycles
4	4 $^{\circ}$ C forever

c.Tn5 转座体的制备。

按照下表，将 Tn5 转座酶、Adapter 1 和 Adapter 2 按摩尔比 1:0.5:0.5 混合，吹打混匀，室温孵育 1 小时。

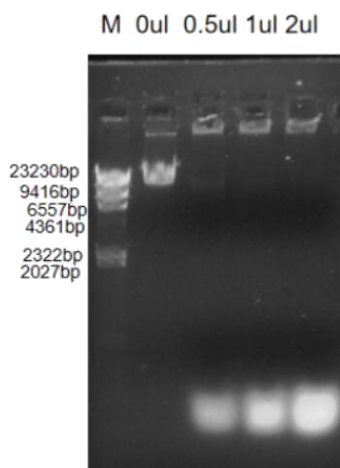
注：可根据实验需要适当提高 Tn5 转座酶的混合比例，但 Adapter 1 和 Adapter 2 的浓度需要保持一致。制备好 Tn5 转座体可直接用于 DNA 片段化实验，也可以 -20 $^{\circ}$ C 保存。

Component	Volume
Transposase	10 μ l
Adapter 1 (200 μ M)	1 μ l
Adapter 2 (200 μ M)	1 μ l

d.片段化(Tagmentation)效果测试。按照下表配制反应体系，轻轻吹打混匀后，55 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 分钟。随后加入 5 μ l Stop Buffer (5X)，混匀后 55 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟终止反应，片段化的产物可用于检测或纯化后建库，效果参考图 3。根据打断片段的大小调整复合体用量，如果片段过长，增加转座体的使用量；如果片段过短，则减少转座体的使用量。

Component	Volume
DNA	50-100ng

Tn5 转座体	0.5-2μl
Reaction Buffer (5X)	4μl
ddH ₂ O	To 20 ul



在 20μl 反应体系中，加入 100ng Lambda DNA 及相应量的 Tn5 转座体，55℃孵育 10 分钟，反应完毕加入 5μl Stop Buffer (5X)，混匀后 55℃孵育 5 分钟终止反应，加入 5μl DNA 上样缓冲液(6X)，使用琼脂糖预制胶进行电泳检测。实际效果会因样品种类、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

注意事项

- (1) Tn5 Transposase (40μM)含 50%甘油，在-20℃保存不会冻结。须避免-80℃保存，否则会冻结，反复冻融可能会影响 Tn5 转座酶的活性。
- (2) Tn5 Transposase (40μM)较为粘稠，吸取时注意取样量准确，加样后请注意充分吹打混匀，避免产生气泡。
- (3) Tn5 Transposase 催化的底物为 DNA，不能用于 RNA 实验。
- (4) 本产品用于转座子插入时只适用于细菌，真核细胞由于核膜的阻挡导致转座子难以插入。具体的反应条件请根据相关文献自行设计和调整。
- (5) 用于细菌相关研究时，请勿使用化学感受态细胞，化学转化的成功概率极低。推荐使用电转化效率不低于 10⁶cfu/μg 的电转感受态细胞。
- (6) 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- (7) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。