

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

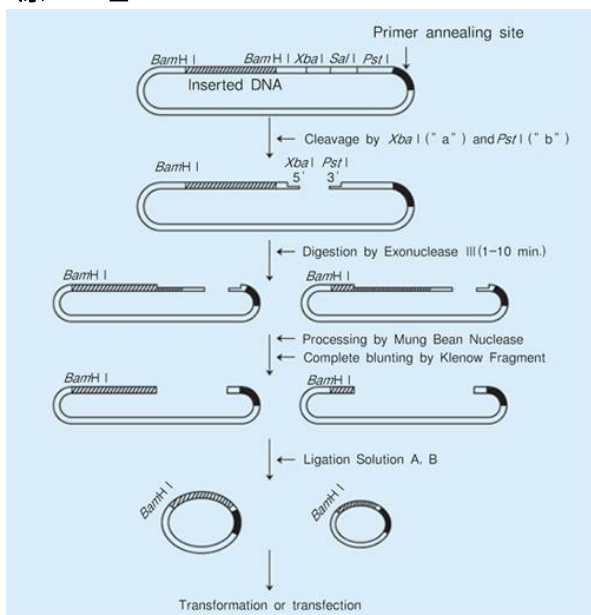


Figure 1. Outline of the protocol

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

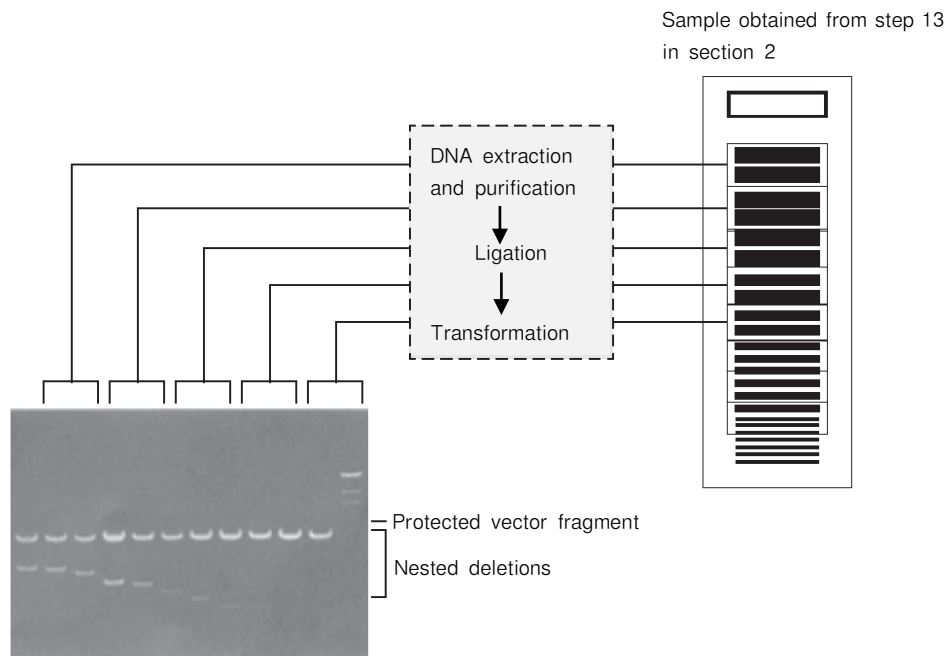
在完成操作 2. 后, 每个平板可获得数十个至数百个菌落或噬菌斑, 挑选 50 个菌落 (插入 DNA 片段长时挑选 100 个克隆), 在 2 ml 培养液中进行小规模培养后制备 DNA 质粒。然后使用适当的限制性内切

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