

# M5 Tn5 转座酶使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Tn5 转座酶	25U (1U/ul)	MF650-01

**【储存条件】:** -20℃

## 【产品简介】

概述: M5Tn5 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。M5 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。M5Tn5 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) 和二代测序文库等领域。

来源: 含有 M5 Tn5 转座酶序列的大肠杆菌菌株。

应用: 体外转基因 (外源基因整合到宿主细胞), 二代测序文库。

贮存溶液: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0 25 °C), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 和 50%甘油(V/V)。

反应缓冲液(随酶提供): 5x LM 缓冲液、10x TPS 缓冲液。

单位定义: 1 单位 M5 Tn5 转座酶指 37°C 条件下反应 1 小时, 完全切割 1 μg 含有识别序列的 DNA 片段所需要的酶量。

## 【产品组分】

M5 Tn5 转座酶 (1U/ul)	25ul
5x LM 缓冲液	1ml
10x TPS 缓冲液	0.1ml

## 【质量控制】

- 核酸外切酶活性: 50 μl 反应体系中, 20 U 本酶与 1 μg 的 Hind III 消化的λDNA 于 37°C 温育 4hr, DNA 的电泳条带无明显变化。
- RNase 活性: 50 μl 反应体系中, 100 U 本酶与 250 ng 大肠杆菌 rRNA 于 37°C 温育 2 hr, 琼脂糖电泳检测, 被降解的 rRNA 小于 1%。

## 【使用方法】

### 一、 体外转基因操作:

M5 Tn5 转座酶能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, M5 Tn5 转座酶同含有识别序列的目标基因片段 (一般包含选择标记) 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, 目标基因将会被整合到宿主细胞基因组中, 最后利用选择标记筛选成功整合目标基因的宿主细胞。



当识别序列为 ME 接头时, 上述双链 DNA 片段的正义链序列为:

5'-CTGTCTCTTATACACATCT+目标基因+AGATGTGTATAAGAGACAG-3'

### 1、 转座体 (Transposome) 的构建:

1) 准备如下反应体系 (该反应体系可根据需要进行放大):

成分	体积
目标基因片段(含成对识别序列,100 μg/ml)	2 μl
M5 Tn5 转座酶	4 μl
100%甘油	2 μl

2) 充分混匀, 室温 (25 °C ) 放置 30 分钟。

3) 取 1-4 μl 反应产物进行后续的转化实验, 反应产物也可放置于-20°C 备用 (转座体可以在-20°C 稳定储存一年时间)。

2、转化：请使用电击转化法进行转化。转化后利用选择性标记筛选成功整合目标基因的宿主细胞。

## 二、二代测序建库

### 1、转座体(Transposome)的构建

1) 准备如下的反应体系（识别序列以 ME 为例）

名称	体积
连接有 ME 序列的接头* (10 pmol/μl)	1.5-4 μl
10× TPS 缓冲液	2 μl
M5Tn5 转座酶	3-4 μl
水	至 20 μl

\* 接头中 ME 序列必须为双链，且末端磷酸化，例如：

接头 1 (Phos 表示磷酸化)：  
 5'-Phos-CTGTCTCTTATACACATCT  
 3'-GACAGAGAATATGTGTAGA+接头 1

接头 2 (Phos 表示磷酸化)：  
 5'-Phos-CTGTCTCTTATACACATCT  
 3'-GACAGAGAATATGTGTAGA+接头 2

2) 将反应物混匀，25°C 反应 30 分钟。

3) 反应后的 Transposome 转座体可立即进行后续反应，也可-20°C 保存（转座体可以在-20°C 稳定储存一年时间）。

### 2、片段化反应 (Tagmentation)

1) 准备如下的反应体系（对照反应中的转座体用水代替）

名称	体积
人基因组 DNA	~50 ng
5× LM 缓冲液	6 μl
转座体 (Transposome)	4 μl
水	至 30 μl

2) 37°C 反应 2h 或 55°C 反应 10~15 分钟。

3) 如果片段化反应结果不理想（如片段较大），可以在转座体构建步骤变更 ME 序列和转座酶的用量，或者在片段化反应步骤变更转座体的用量，也可以在片段化反应中添加 1-5 mM 的 Mg<sup>2+</sup>离子 (MgCl<sub>2</sub>)。

3、片段纯化：上步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。

4、PCR 富集：PCR 富集步骤包括缺刻平移和 PCR 循环，缺刻平移步骤一般为 72°C、3 分钟，PCR 循环数根据初始 DNA 的量来确定，一般进行 5-15 个循环。PCR 富集的产物经纯化等步骤后可上机进行测序。

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。