天净沙系列

CAT#:931178

低温运输，-20℃保存

DNA Shuffling 试剂盒

DNA Shuffling Kit

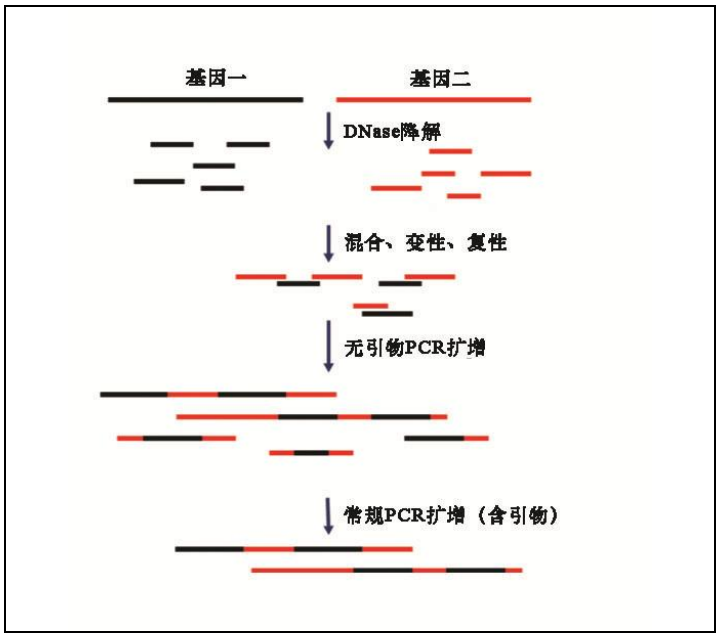
使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

DNA Shuffling 即 DNA 分子的体外同源重组，它是一种分子水平上的定向进化(directed evolution)技术。DNA Shuffling 以一个或多个基因为起始材料，通过先随机将这些基因断裂成 DNA 短片段，再进行互为模板和引物的 PCR（无外加引物），最后再进行常规 PCR（外加引物）等处理，最后得到含有大量 DNA 重组突变的 PCR 产物。DNA Shuffling 原理示意图如下:



本产品就是根据上述原理优化改进而成，它具有下列特点:

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板，无需单独准备各成分。
2. 可以用于对长度在 1000 bp 左右的同源片段进行 DNA shuffling。
3. 操作手册经过优化，只产生 DNA Shuffling，而将点突变的几率减低到最低，节省大量优化时间。
4. 本产品足够 10 次 DNA Shuffling 反应。
5. 本产品只适用于科研，不能用于临床。

规格及成分

本产品使用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
DNase I 溶液（1 U/μL）	931178a	10 μL	0.5 mL 红盖管
DNA Shuffling 专用反应液 A，10×	931178b1	100 μL	0.5 mL 绿盖管
DNA Shuffling 专用反应液 B，10×	931178b2	100 μL	0.5 mL 紫盖管
2×DNA Shuffling 专用无引物 PCR MasterMix	931178c	1 mL	1.5 mL 白盖管
2×DNA Shuffling 专用带引物 PCR MasterMix	931178d	1 mL	1.5 mL 黄色管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管

	使用手册	931178sc	1 份	无
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限一年。			
自备试剂	待突变基因片段、DNA Shuffling 引物（第二轮 PCR 引物）、胶回收试剂盒。			

使用方法

1. 提前开启 37℃和 90℃水浴或金属浴。

一：待突变基因片段的制备

2. 待突变基因片段可以用来源于多个物种的、含同源基因片段的 DNA。这些基因片段可以来于 PCR 制备，也可以来于限制性内切酶酶切法制备。
3. 这些含同源基因片段（或同源基因片段的一部分）的 DNA 片段总长度不要超过 1 kb，同时比 DNA shuffling 终产物（第二轮 PCR 产物）长 200-400 bp，因为第二轮 PCR 的引物位置在此步制备的模板 DNA 内侧 100-200 bp。
4. 每次 DNA Shuffling 实验需要 2-5 μg 起始 DNA 片段。如果使用几个同源基因片段，则其比例为 1:1:1，总量保证有 2-5 μg。
5. 起始模板 DNA 必须通过胶回收纯化，以便彻底去除残留的质粒模板、引物和非特异扩增产物等。如果不去除此步的引物，其将对后续 PCR 造成严重干扰。
6. 测 OD260 确定模板 DNA 浓度，此溶液为同源基因 DNA 模板，放冰上待用。

二：酶切和回收模板 DNA

7. 准备 10 μL DNase I 工作液 (0.1 U/μL)。将 1 μL 本试剂盒提供的 1 U/μL 的 DNase I 溶液和 8 μL 超纯水、1 μL DNA Shuffling 专用反应液 A 混合得浓度为 0.1 U/μL 的 DNase 工作液，放冰上待用。此溶液必须现配现用。
8. 在一个 PCR 管中，按顺序加入下列成分：

成分	用量
同源 DNA 片段（来于多个不同基因）	2-5 μg
DNA Shuffling 专用反应液 A，10×	10 μL
DNA Shuffling 专用反应液 B，10×	10 μL
DNase I 工作液（0.1 U/uL）	1 μL
补超纯水到	100 μL

9. 充分轻柔吹打混匀后 37℃保温，分别 5 分钟、6 分钟、7 分钟和 8 分钟取样（可以根据实际情况适当调整酶切时间），每次取 25 μL 到一个新的 PCR 管中，马上放 75℃（10 min）以灭活 DNase I。
10. 在 2-3%琼脂糖凝胶或 10% PAGE 胶上电泳上步所得的 4 个样品（每个 25 μL），根

据 DNA 电泳 Marker 锁定的分子量范围，回收 25-150 bp 范围的 DNA 并将其溶解在超纯水中，测 260 nm 得浓度，放冰上待用。

三：无引物 PCR

11. 在一干净 PCR 管中加入 0.5 μg 回收片段、50 μL DNA Shuffling 专用无引物 PCR MasterMix、补加超纯水到 100 μL。反应总体积为 100 μL。按下面的 PCR 反应参数进行第一轮无引物 PCR：PCR 前变性 94℃150 秒，PCR 循环 40 次（94℃ 30 s，47.5℃ 45 s，72℃ 10 s，每次循环后增加 5 s），最后 72℃ 10 分钟。
12. PCR 结束后，取 5-10 μL PCR 产物进行电泳检测，然后对预期长度区域的 PCR 产物进行回收（如果同源区域长度为 800 bp，则回收 600-1000 bp 范围的片段）。此步将去除小片段 DNA 对下轮 PCR 的干扰。
13. 预留 25%回收产物原液，剩余的 75%分三份，每份 25%。分别用超纯水将其分别稀释 10 倍、20 倍和 50 倍。

四：带引物 PCR

14. 分别用上步的原液、10 倍稀释液、20 倍稀释液和 50 倍稀释液各 1 μL 作为 PCR 模板，按下表设置 4 管带引物 PCR 反应：

成分	1 号管	2 号管	3 号管	4 号管
原液	1 μL			
10 倍稀释液		1 μL		
20 倍稀释液			1 μL	
50 倍稀释液				1 μL
自备 F 和 R 引物 均 10 pmol/μL	各 3 μL	各 3 μL	各 3 μL	各 3 μL
加超纯水	到 100 μL	到 100 μL	到 100 μL	到 100 μL
2×DNA Shuffling 专用带引物 PCR MasterMix	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL

15. 按下面的 PCR 反应参数进行第一轮无引物 PCR：PCR 前变性 94℃150 秒，PCR 循环 25 次（94℃ 30 s，47.5℃ 45 s，72℃ 60 s，每次循环后增加 5 s），最后 72℃ 10 分钟。
16. 电泳检测 4 个 PCR 产物，回收预期大小的 PCR 产物（根据引物位置估计预期大小），用于后续克隆和分析实验（略）。

关联产品 易突变 PCR 试剂盒，PAGE 胶 DNA 回收试剂盒，琼脂糖胶 DNA 回收试剂盒