|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:931178-10****低温运输，-20℃保存** |  |
| **DNA Shuffling试剂盒****DNA Shuffling Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **江苏天净沙基因诊断技术有限公司****网址：**[**www.bingene.com**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6005850；电邮：order@bingene.com** |
| **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：

|  |
| --- |
| 131178原理图 拷贝 |

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1000bp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5孔盒包装

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 规格 | 包装材料 |
| DNase I溶液（1U/μL） | 931178a | 10 μL | 0.5mL红盖管 |
| DNA Shuffling专用反应液A，10× | 931178b1 | 50 μL | 0.5mL绿盖管 |
| DNA Shuffling专用反应液B，10× | 931178b2 | 50 μL | 0.5mL绿盖管 |
| 2×DNA Shuffling专用无引物PCR MasterMix  | 931178c | 1 mL | 1.5mL白盖管 |
| 2×DNA Shuffling专用带引物PCR MasterMix | 931178d | 1 mL | 1.5mL黄色管 |
| 超纯水 | 100935 | 1 mL | 2.0mL蓝盖管 |
| 使用手册 | 131178sc | 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**1. 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。
2. 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1kb，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100-200bp。
3. 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。
4. 起始模板DNA必须通过胶回收的方法回收，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。
5. 最后需用分光光度法对模板DNA进行准确定量，此溶液即为同源基因DNA模板，放冰上待用。

**二：酶切和回收模板DNA**1. 准备10 μL DNase I工作液（0.1U/uL）。将1 μL本试剂盒提供的1U/uL的DNase I溶液和8uL超纯水、1 μL DNA Shuffling专用反应液A混合得浓度为0.1U/uL 的DNase工作液，放冰上待用。此溶液必须现配现用。
2. 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× | 5 μL |
| DNA Shuffling专用反应液B，10× | 5 μL |
| DNase I工作液（0.1U/uL） | 2 μL |
| 补超纯水到 | 100 μL |

1. 充分轻柔吹打混匀后37℃保温，分别在2分钟、4分钟、6分钟和8分钟取样，每次取25μL到一个新的PCR管中，马上放75℃以灭活DNase I。
2. 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25μL），用相应的胶回收法，根据DNA 电泳Marker锁定的分子量范围，回收25-150 bp范围的所有DNA片段，最后将回收的DNA溶解在超纯水中，最后用分光光度法在260nm精确测定其浓度，放冰上待用。

**三：无引物PCR**1. 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100μL。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℃ 30s，47.5℃ 45s，72℃ 10 s，每次循环后增加5s），最后72℃ 10 分钟。
2. 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800bp，则回收600-1000bp范围的片段）。此步将去除小片段DNA对下轮PCR的干扰。
3. 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**1. 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1uL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 | 1μL |  |  |  |
| 10倍稀释液 |  | 1μL |  |  |
| 20倍稀释液 |  |  | 1μL |  |
| 50倍稀释液 |  |  |  | 1μL |
| 自备F和R引物均10pmol/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 |

1. 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℃ 30s，47.5℃ 45s，72℃ 60 s，每次循环后增加5s），最后72℃ 10 分钟。
2. 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 |

20220310dx