

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:931178-10  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

DNA Shuffling 试剂盒

DNA Shuffling Kit

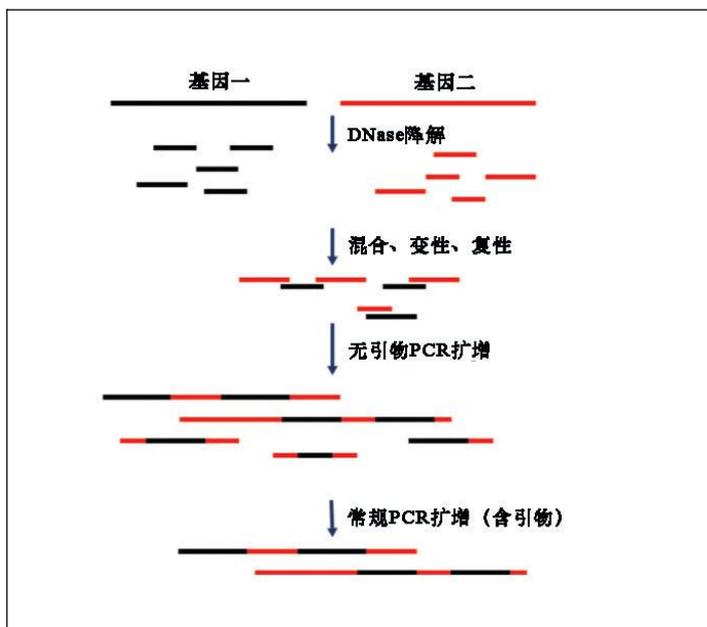
使用手册 V1.0

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](mailto: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 (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 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/ $\mu$ L)	931178a	10 $\mu$ L	0.5mL 红盖管
DNA Shuffling 专用反应液 A, 10 $\times$	931178b1	50 $\mu$ L	0.5mL 绿盖管
DNA Shuffling 专用反应液 B, 10 $\times$	931178b2	50 $\mu$ L	0.5mL 绿盖管
2 $\times$ DNA Shuffling 专用无引物 PCR MasterMix	931178c	1 mL	1.5mL 白盖管
2 $\times$ 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												
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，保存期限一年。															
<b>自备试剂</b>	待突变基因片段、DNA Shuffling 引物（第二轮 PCR 引物）、胶回收试剂盒。															
<b>使用方法</b>	<p>1. 提前开启 37℃和 90℃水浴或金属浴。</p> <p><b>一：待突变基因片段的制备</b></p> <p>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。</p> <p>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 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。</p> <p>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。</p> <p>5. 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。</p> <p>6. 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。</p> <p><b>二：酶切和回收模板 DNA</b></p> <p>7. 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。</p> <p>8. 在一个 PCR 管中，按顺序加入下列成分：</p> <table border="1" data-bbox="636 1619 1326 2002"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>用量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>同源 DNA 片段（来于多个不同基因）</td> <td>2-5 μg</td> </tr> <tr> <td>DNA Shuffling 专用反应液 A，10×</td> <td>5 μL</td> </tr> <tr> <td>DNA Shuffling 专用反应液 B，10×</td> <td>5 μL</td> </tr> <tr> <td>DNase I 工作液 (0.1U/uL)</td> <td>2 μL</td> </tr> <tr> <td>补超纯水到</td> <td>100 μL</td> </tr> </tbody> </table> <p>9. 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。</p>				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
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															

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  $\mu\text{L}$ )，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

11. 在一干净 PCR 管中加入 0.5  $\mu\text{g}$  回收片段、50  $\mu\text{L}$  DNA Shuffling 专用无引物 PCR MasterMix、补加超纯水到 100  $\mu\text{L}$ 。反应总体积为 100 $\mu\text{L}$ 。按下面的 PCR 反应参数进行第一轮无引物 PCR：PCR 前变性 94 $^{\circ}\text{C}$  150 秒，PCR 循环 40 次 (94 $^{\circ}\text{C}$  30s, 47.5 $^{\circ}\text{C}$  45s, 72 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 每次循环后增加 5s)，最后 72 $^{\circ}\text{C}$  10 分钟。

12. PCR 结束后，取 5-10  $\mu\text{L}$  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。

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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$			
10 倍稀释液		1 $\mu\text{L}$		
20 倍稀释液			1 $\mu\text{L}$	
50 倍稀释液				1 $\mu\text{L}$
自备 F 和 R 引物 均 10pmol/ $\mu\text{L}$	各 3 $\mu\text{L}$	各 3 $\mu\text{L}$	各 3 $\mu\text{L}$	各 3 $\mu\text{L}$
加超纯水	到 100 $\mu\text{L}$	到 100 $\mu\text{L}$	到 100 $\mu\text{L}$	到 100 $\mu\text{L}$
2 $\times$ DNA Shuffling 专用带引物 PCR MasterMix	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

15. 按下面的 PCR 反应参数进行第一轮无引物 PCR:PCR 前变性 94 $^{\circ}\text{C}$  150 秒，PCR 循环 25 次 (94 $^{\circ}\text{C}$  30s, 47.5 $^{\circ}\text{C}$  45s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 每次循环后增加 5s)，最后 72 $^{\circ}\text{C}$  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)。
<b>关联产品</b>	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