

天
净
沙
系
列

CAT#:131178-10
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

DNA Shuffling 试剂盒

DNA Shuffling Kit

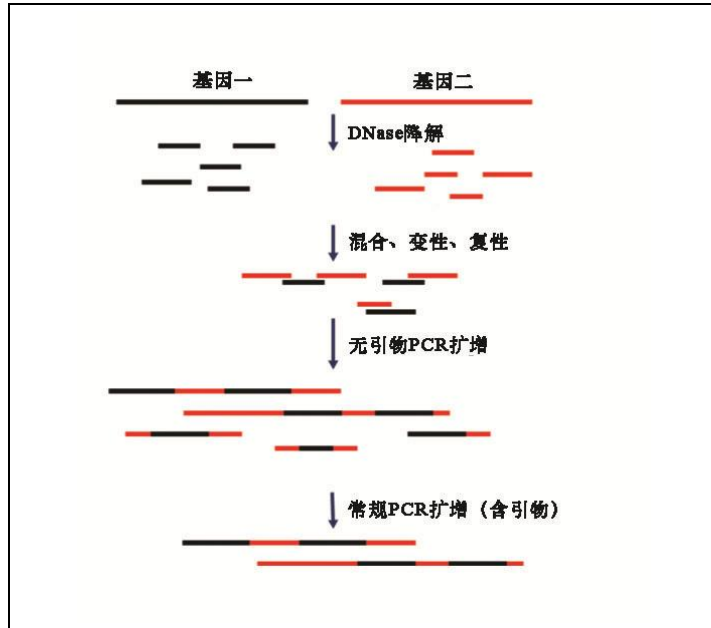
使用手册 V1.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506
网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.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，它以一个或多个基因为起始材料，通过先随机断裂成小片段，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。其原理示意图如下：



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 的同源片段进行 shuffling。
3. 操作手册经过优化，1-2 天即可完成，节省大量优化时间。
4. 本产品足够 10 次 DNA Shuffling 反应，只适用于科研，不能用于临床。

规格及成分

成分	编号	十孔盒包装
PCR MagicMix	90805	1 mL × 3
DNase I 溶液 (0.1U/μL)	90903a	10 μL
DNA Shuffling 试剂盒溶液 A, 10×	131178a	100 μL
DNA Shuffling 试剂盒溶液 B, 10×	131178b	100 μL
超纯水	100935	1 mL
使用手册	131178sc	1 份

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°C 和 75°C 水浴或金属浴。
2. 待突变基因片段的制备: 待突变基因片段可以用多个含同源片段的质粒为模板、用 PCR 法或酶切法制备。制备时需保证含起始同源片段 (或此同源片段的一部分) 的 DNA 片段总长度要比 DNA shuffling 终产物 (第二轮 PCR 产物) 长 200-400 bp, 即第二轮 PCR 的引物位置要在此步模板制备引物内侧 100-200bp, 第二轮 PCR 产物的长度在 1000bp 以下。每次 DNA Shuffling 实验至少需要 2 μg 起始同源片段 (如果含两个以上同源片段, 则彼此的比例为 1:1:1), 最多可以使用 5 μg 起始同源片段, 并且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)。最后需用分光光度法准确定量, 此溶液即为同源片段, 放冰上待用。
3. 准备 DNase I 工作液, 将 1 μL 本试剂盒提供的 DNase I 溶液、8 μL 超纯水、1 μL DNA Shuffling 试剂盒溶液 A 混合得 DNase 工作液, 放冰上待用。DNase 工作液必须现配现用。
4. 设置同源片段碎片化反应: 在一个 PCR 管中, 按顺序加入下列成分:

成分	用量
同源片段 (来自两个以上不同基因)	2-5 μg
DNA Shuffling 试剂盒溶液 A, 10×	5 μL
DNA Shuffling 试剂盒溶液 B, 10×	5 μL
DNase 工作液	2 μL
补超纯水到	50 μL

5. 充分轻柔吹打混匀后 37°C 水浴 8 分钟, 然后立即放 75°C 水浴处理 10 分钟以灭活 DNase I。
6. 在 2-3% 琼脂糖凝胶上电泳, 用常规的胶回收法回收 25-150 bp 范围的所有片段, 分光光度法精确测定回收片段的浓度。此即为回收片段, 放冰上待用。注意: 一定要加合适的 DNA marker 以便确定片段范围。
7. 回收片段重组反应: 在一干净 PCR 管中加入 0.5 μg 回收片段、50 μL PCR Mix 3.0、补加超纯水到 100 μL。反应总体积为 100 μL
8. 按下面的 PCR 反应参数进行第一轮无引物 PCR:

过程	温度	时间
PCR 前变性	94°C	150 s
PCR 反应 (40 循环)	94°C	30 s
	47.5°C	45 s
	72°C	10 s, 每次循环后增加 5s

PCR 后延伸	72°C	10 min
---------	------	--------

- 取 5-10 μL 进行电泳检测 (本 PCR Mix 含上样成分, 可以直接上样。红色示踪剂的泳动速度相当于 50bp DNA), 然后对预期长度区域的 PCR 产物进行回收 (如果 Shuffling 的同源区域长度为 800bp, 则回收 600-1000bp 范围的片段), 得到第一轮 PCR 回收产物。
- 留部分第一轮 PCR 回收产物之后, 用超纯水将其分别稀释 10 倍、20 倍和 50 倍, 放冰上待用。
- 取第一轮 PCR 回收产物原液、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 管第二轮 PCR 反应 (100 μL 体系)。

成分	1-4 号管
PCR 模板 (4 种)	各 1 μL (1 号加原液、2 号加 10 倍稀释液、以此类推)
PCR MagicMix 3.0	50 μL
自备 DNA Shuffling 引物	每管各加 30 pmol
超纯水	加到 100 μL

12. 按下列 PCR 参数进行 PCR:

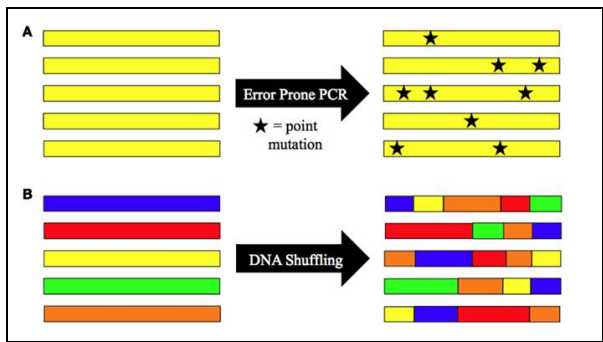
过程	温度	时间
活化	94°C	150 s
PCR 反应 (25 次循环)	94°C	30 s
	47.5°C	45 s
	72°C	60 s, 每次循环后增加 5s
PCR 后延伸	72°C	10 min

- 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)。

答客问

Q: 易错 PCR 和 DNA Shuffling 有何区别?

A: 前者引入的是点突变, 后者引入的是重组突变。示意图如下:



关联产品

即用型易错 PCR 试剂盒 (CAT#:101005-100)