

使用说明书

Tn5 Transposase(10pmol/μl)

Cat. No. PC047(20 μl)、PC048(100 μl)

产品内容	产品编号	规格
Tn5 Transposase	PC047-01	20 μl
5× Tn5 Reaction Buffer	PC047-02	200 μl
5×Stop Buffer	PC047-03	200 μl

保存条件：-20℃保存 12 个月，请注意避免反复冻融。

■ 产品说明

Tn5转座酶可以高效地将Tn5转座子（Transposon）随机插入到目标序列，对于真核和原核生物的DNA都具有极高的转座插入效率。Tn5转座酶特异性识别转座子两端反向重复的ME（Mosaic End）序列，识别两端含有嵌合ME序列的DNA片段（包括含有ME序列的引物），最终形成Tn5转座体（Tn5 Transposome），该转座体可以随机结合靶DNA并切割插入其携带的DNA片段。Tn5转座酶被广泛用于体外转基因和二代测序建库等领域。

■ 来源

E.coli 重组蛋白。

■ 品质保证

无宿主DNA残留，无核酸内、外切酶污染。

■ 应用范围

- ① 用于二代测序文库片段化与加接头；
- ② 体外或体内构建转座子随机插入突变库；
- ③ 大分子DNA（如BAC克隆）的快速测序；
- ④ 抗性标记插入靶DNA。

■ 推荐反应条件

1. 体外转座子插入反应

1) Tn5转座子的两侧是带有19bp ME序列的DNA片段，可以使用含5' 磷酸基团的ME序列为上下游引物进行PCR合成。

ME序列：5'-pCTGTCTCTTATACACATCT-3'

2) 按照下表制备转座子插入混合物

5× Reaction buffer	4 μl
Target DNA *	200-400ng
Tn5 Transposase	1 μl
同等molar转座子	X μl
ddH ₂ O	To 10 μl

*注：需要计算反应体系中目标DNA的摩尔数，并加入等摩尔数量的Tn5转座子片段，避免多余片段的插入。 $\mu\text{mol target DNA} = \mu\text{g target DNA} / [(\text{base pairs in target DNA}) \times 660]$ ，例如：0.2μg 1000bp的目标DNA = $0.2\mu\text{g} / [1000\text{bp} \times 660] = 0.3 \times 10^{-6} \mu\text{mol} = 0.3\text{pmol}$ 。
目标DNA需要无外源核酸污染。

3) 混匀后37℃孵育2小时。

4) 加入2 μl 5×Stop Buffer(室温放置解冻)，混匀后 55℃反应 10min 以终止反应。

2. 构建2. 二代测序所需的转座复合体和片段化

1) 构建转座复合体

①ME和接头(Adapters)的序列。

Adapter 1: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

Adapter 2: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG -3'

ME: 5'-pCTGTCTTATACACATCT-NH₂-3'

②制备两种接头

100μM/LME和100μM/L Adapter 1等体积混合、100μM/L ME和100μM/L Adapter 2等体积混合，PCR仪慢速降温退火，得到浓度均为 50μmol 的接头1和接头 2。

PCR 设置为：95℃ 3min；95℃到 25℃，45min；4℃ Hold.

③复合体制备

将接头1和接头2等体积混合，得到混合接头；酶与接头吹打混合均匀，室温孵育1h，即可。通常酶与接头混合的摩尔比例为1：1，亦可根据需要提高接头的孵育比例。

如果酶与接头摩尔比例 1：1 的话，如下配置：

双链接头混合物 (50pmol/μl)	4 μl
Tn5 Transposase (10pmol/μl)	20 μl

制备好的转座体可用于片段化实验，也可-20℃保存。

2) 片段化效果测试配置 20μl 片段化体系：

5× Reaction buffer	4 μl
DNA	50-100ng
转座复合体	1 μl
ddH ₂ O	To 20 μl

3) 体系吹打混匀后 55℃反应 10min，需要热盖。

4) 反应结束后加入5μl 5×Stop Buffer(室温放置解冻)，混匀后 55℃反应 5min 以终止反应。

片段化产物可用于检测或纯化后建库。如果打断片段过长，可以增加转座复合体用量，从而降低片段大小，反之，则减少转座复合体用量。

■ 常见问题解答

1) 问：片段化大小分布不理想，片段过大或过小？

答：通过测试不同梯度的酶量和时间，确定最佳反应酶量和时间。

2) 问：转座效率低，文库产量不足？

答：Tn5保存不当或者反复冻融，导致活性降低，因此建议分装保存和避免反复冻融；或者样品中存在抑制剂（如SDS、EDTA、高盐浓度等），将样品进行纯化后再进行实验。

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。



地址：广州高新技术产业开发区广州科学城揽月路 3 号 F 区 F801
电话：020-28069288 / 020-28069233

邮编：510663
网址：www.igenebio.com