

## BeyoNGS™ Tn5 Transposase

产品编号	产品名称	包装
D7102S	BeyoNGS™ Tn5 Transposase	800pmol
D7102M	BeyoNGS™ Tn5 Transposase	4000pmol

### 产品简介:

- 碧云天生产的BeyoNGS™ Tn5 Transposase, 中文名为BeyoNGS™ Tn5转座酶, 是一种来源于*E.coli*、经过改造具有极高活性的Tn5转座酶突变体, 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都有极高的转座插入效率。本产品可以特异性识别两端含有嵌合末端序列(Mosaic End sequence, ME)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(外源基因整合到宿主细胞)和二代测序(Next Generation Sequencing, NGS)建库等领域。
- 转座子(Transposon), 也称为转座元件(Transposable elements, TEs)、跳跃基因(Jumping genes), 是一种可以在基因组中“跳跃”到不同位置的遗传元件(Genetic elements)。尽管转座子经常被被称为跳跃基因, 转座子还是会相对比较稳定地存在于相应的整合位点, 并且大部分转座子最终会变得没有跳跃活性。转座子最早由Barbara McClintock在玉米中发现, 并在1983年获得了诺贝尔生理医学奖。后续研究发现转座子系统广泛存在于生物界, 并逐渐研究开发成为基因分析的有效工具。
- BeyoNGS™ Tn5转座酶是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的重组蛋白, 与野生型Tn5转座酶相比, 其插入效率至少提升1000倍, 具有转座随机性好、稳定性高、插入位点易测序等特点。

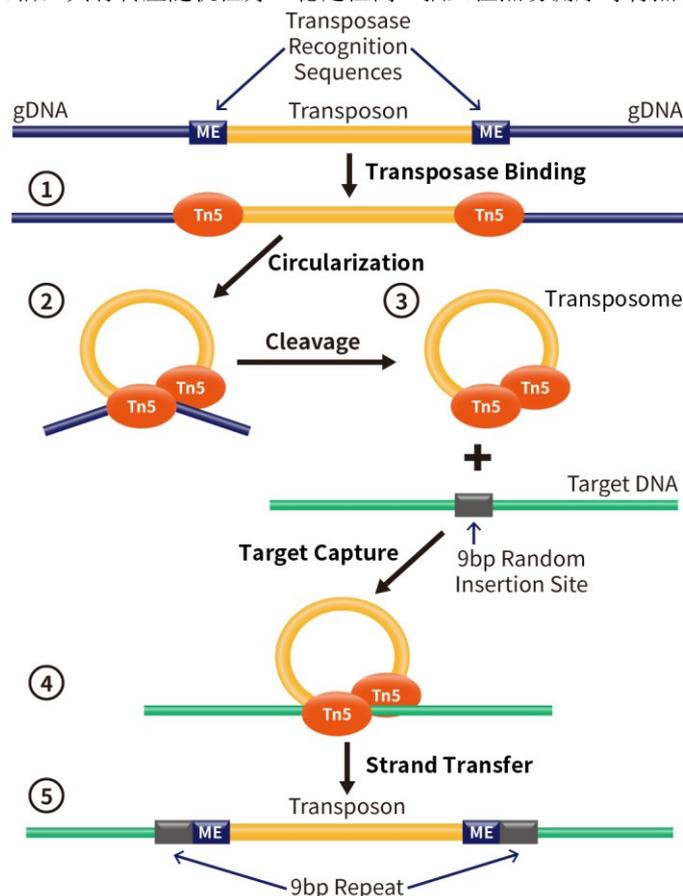


图1. 碧云天的BeyoNGS™ Tn5 Transposase的工作原理图。

- BeyoNGS™ Tn5 Transposase与Tn5 Transposase的工作原理相同。Tn5转座酶的工作原理如图1所示。当转座事件发生时, 两个Tn5转座酶分子结合到供体DNA (Donor DNA)的转座子的ME序列, 形成两个Tn5转座酶分子与供体DNA的复合物①, 随后两个Tn5转座酶分子通过C末端相互作用进行联会并环化(Circularization)转座子, 形成一个Tn5转座酶二聚体复合物(Transposase dimer complex)②, 在Mg<sup>2+</sup>存在的条件下, Tn5转座酶切割供体DNA, 并携带供体DNA片段离开供体链形成转座体(Transposome)③, 当Tn5转座体识别靶点DNA (Target DNA), 也称受体DNA (acceptor DNA), 并结合到随机靶序列(Target

site)上形成转座体与靶序列的复合物④，在Mg<sup>2+</sup>存在条件下，会对靶序列进行切割，将其携带的供体DNA片段插入靶序列中，形成转座后的DNA序列(Transposed DNA)⑤，切割形成的9bp粘性末端可以通过DNA聚合酶、连接酶作用进行填补，最终两端形成9bp正向重复序列。基因从供体DNA通过Tn5转座酶“剪切”之后“粘贴”到另一受体DNA，实现了基因片段在基因组中的“跳跃”。

- **产品用途:** 本产品可用于二代测序(NGS)文库构建时的片段化和加接头；将测序引物引入克隆DNA或质粒；细菌基因敲除库的建立；新型细菌菌株工程改造；目的基因的插入失活；将T7转录启动子、抗性标记等插入靶DNA等。
- **酶储存溶液:** 50mM HEPES (pH7.2), 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% Triton X-100, 50% (v/v) Glycerol。
- **Reaction Buffer (5X):** 50mM HEPES (pH7.2), 500mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>。
- **Stop Buffer (5X):** 50mM EDTA (pH8.0)。
- 用于体外转座子插入反应时，按每次使用1μl BeyoNGS™ Tn5 Transposase (40μM)，本产品小包装D7102S可以进行20次反应，中包装D7102M可以进行100次反应。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7102S-1	BeyoNGS™ Tn5 Transposase (40μM)	20μl
D7102S-2	Reaction Buffer (5X)	200μl
D7102S-3	Stop Buffer (5X)	300μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7102M-1	BeyoNGS™ Tn5 Transposase (40μM)	100μl
D7102M-2	Reaction Buffer (5X)	1ml
D7102M-3	Stop Buffer (5X)	1.5ml
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20°C保存，一年有效。

#### 注意事项:

- BeyoNGS™ Tn5 Transposase (40μM)含50%甘油，在-20°C保存不会冻结。须避免-80°C保存，否则会冻结，反复冻融可能会影响Tn5转座酶的活性。
- BeyoNGS™ Tn5 Transposase (40μM)较为粘稠，吸取时注意取样量准确，加样后请注意充分吹打混匀，避免产生气泡。
- BeyoNGS™ Tn5 Transposase催化的底物为DNA，不能用于RNA实验。
- 本产品用于转座子插入时只适用于细菌，真核细胞由于核膜的阻挡导致转座子难以插入。具体的反应条件请根据相关文献自行设计和调整。
- 用于细菌相关研究时，请勿使用化学感受态细胞，化学转化的成功率极低。推荐使用电转化效率不低于10<sup>6</sup>cfu/μg的电感受态细胞。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 1. 体外转座子插入反应和转化。

- Tn5转座子的设计。Tn5转座子是两侧带有19bp ME序列的DNA片段，可以使用含有ME序列的上下游引物进行PCR合成。为了获得最佳的转座效率，在两端的PCR引物中需要添加一个5'磷酸基团。典型的Tn5转座子参考图2。

ME序列: 5'-[phos]CTGTCTCTTATACACATCT-3'

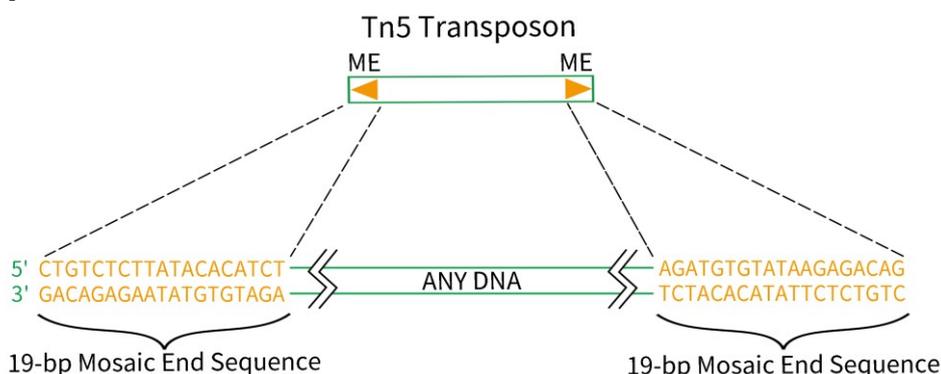


图2. Tn5转座子示意图。Tn5转座子其两端为19bp ME序列，ME序列可被BeyoNGS™ Tn5转座酶特异性识别。

- b. 按照下表制备转座子插入混合物。配制过程中需要注意目标DNA纯度，确保无外源核酸污染。

Component	Volume
Reaction Buffer (5X)	2μl
Target DNA*	0.2μg
molar equivalent Tn5 Transposon	x μl
BeyoNGS™ Tn5 Transposase (40μM)	1μl
ddH <sub>2</sub> O	To 10μl

\*注：为了避免多余片段的插入，需要计算反应中使用的目标DNA摩尔数，并加入等摩尔量的Tn5转座子片段以减少产生过多插入的可能性。 $\mu\text{mol target DNA} = \mu\text{g target DNA} / [(\text{base pairs in target DNA}) \times 660]$ ，例如： $0.2\mu\text{g } 5000\text{bp}$ 的目标DNA =  $0.2\mu\text{g} / [5000\text{bp} \times 660] = 0.06 \times 10^{-6} \mu\text{mol} = 0.06\text{pmol}$ 。

- c. 混匀后37°C孵育2小时。  
d. 加入2μl Stop Buffer (5X)，混匀后55°C孵育10分钟终止反应。  
e. 取1μl混合物电击转化到感受态细胞中，根据抗性标记筛选阳性菌株。未使用的混合物可以-20°C保存。推荐的电击转化条件：50μl感受态细胞，1μl混合物，2毫米电击杯，2500V，电击时间5毫秒。转化条件可根据该条件的转化效果进行优化。转座的克隆数主要取决于所转化的宿主细胞、内源性的限制修饰系统及感受态细胞的转化效率。

## 2. BeyoNGS™ Tn5转座体复合物(BeyoNGS™ Tn5 Transposome complex)的构建和转化后的体内插入。

- a. 按照下表依次加入相应试剂，制备Tn5转座体复合物混合物。

Component	Volume
Tn5 Transposon DNA (100μg/ml in TE Buffer)	2μl
BeyoNGS™ Tn5 Transposase (40μM)	4μl
Glycerol (100%)	2μl
Total Reaction Volume	8μl

注1：本反应无须Mg<sup>2+</sup>催化，请勿使用D7102-2 Reaction Buffer (5X)。

注2：参考1a中Tn5的转座子设计，Tn5 Transposon DNA为含选择标记(如抗性标记)、成对识别序列(如ME序列)和目标基因的双链DNA，可通过PCR等方法获得。

注3：本反应体系可根据实际需要进行放大或缩小。

- b. 混匀后室温孵育0.5-1小时。  
c. 取1μl的转座体复合物电击转化到感受态细胞中，在体内进行插入，并根据抗性标记筛选阳性菌株。推荐的电击转化条件：50μl感受态细胞，1μl转座体复合物，2毫米电击杯，2500V，电击时间5毫秒。转化条件可根据该条件的转化效果进行优化。转座的克隆数主要取决于所转化的宿主细胞、内源性的限制修饰系统及感受态细胞的转化效率。  
d. 构建好的转座体复合物-20°C可以保存1年。

## 3. 构建二代测序所需的BeyoNGS™ Tn5转座体(BeyoNGS™ Tn5 Transposome)。

- a. ME和接头(Adapters)的序列。

ME: 5'-[phos]CTGTCTCTTATAACACATCT-3'

Primer 1: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

Primer 2: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

注：本接头序列参考Nextera® DNA Sample Preparation Kit (Illumina, FC-121-1030)，也可按照不同高通量测序的要求进行设计。

- b. 制备Adapter 1和Adapter 2。

按照下表分别配制Adapter 1和Adapter 2退火反应体系。退火反应后Adapter 1或Adapter 2的终浓度为200μM。

Component	Volume
Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)	10μl
ME (500μM)	20μl
Primer-1 or 2 (500μM)	20μl
Total Reaction Volume	50μl

在PCR仪设置退火反应程序：

Step	Temperature
1	95°C, 2min
2	95°C, 8s, -0.1°C per cycle
3	GOTO step 2, 700 cycles
4	4°C forever

- c. BeyoNGS™ Tn5转座体的制备。

按照下表，将BeyoNGS™ Tn5转座酶、Adapter 1和Adapter 2按摩尔比1:0.5:0.5混合，吹打混匀，室温孵育1小时。注：可根据实验需要适当提高Tn5转座酶的混合比例，但Adapter 1和Adapter 2的浓度需要保持一致。制备好Tn5转座体可直接用于DNA片段化实验，也可以-20°C保存。

Component	Volume
BeyoNGS™ Tn5 Transposase	10µl
Adapter 1 (200µM)	1µl
Adapter 2 (200µM)	1µl

**d. 片段化(Tagmentation)效果测试。**

按照下表配制反应体系，轻轻吹打混匀后，55°C孵育5-10分钟。随后加入5µl Stop Buffer (5X)，混匀后55°C孵育5分钟终止反应，片段化的产物可用于检测或纯化后建库，效果参考图3。根据打断片段的大小调整复合体用量，如果片段过长，增加转座体的使用量；如果片段过短，则减少转座体的使用量。

Component	Volume
DNA	50-100ng
Tn5转座体	0.5-2µl
Reaction Buffer (5X)	4µl
ddH <sub>2</sub> O	To 20µl

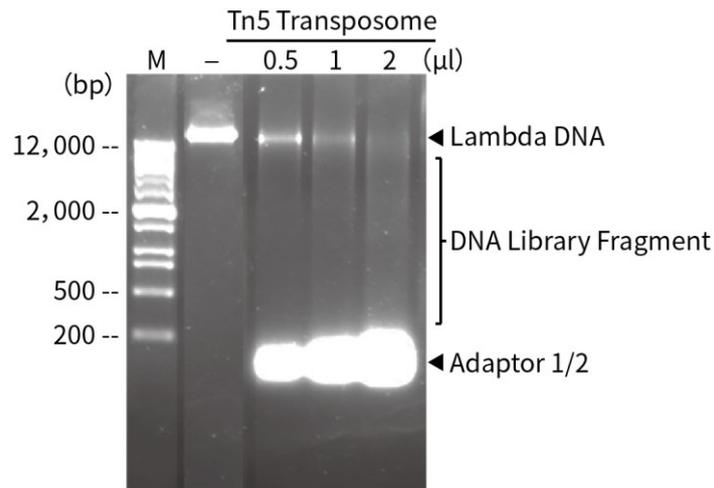


图3. 使用碧云天的BeyoNGS™ Tn5 Transposase制备的Tn5转座体用于DNA随机片段化的效果测试图。在20µl反应体系中，加入100ng Lambda DNA及相应量的Tn5转座体，55°C孵育10分钟，反应完毕加入5µl Stop Buffer (5X)，混匀后55°C孵育5分钟终止反应，加入5µl DNA上样缓冲液(6X) (D0071)，使用BeyoGel™琼脂糖预制胶(D0161)进行电泳检测。实际效果会因样品种类、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

**相关产品：**

产品编号	产品名称	包装
D0251	Annealing Buffer for DNA Oligos (5X)	1ml
D7102S	BeyoNGS™ Tn5 Transposase	20µl
D7102M	BeyoNGS™ Tn5 Transposase	100µl

Version 2021.10.27