

Version 1

Code No. AG11515

# *InMap* 染色体步移试剂盒

# *InMap* Genome Walking Kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

本产品是根据基因组 DNA 上已知序列获得其侧翼未知序列的试剂盒，在 TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR, 热不对称交错 PCR) 原理的基础上进行改进。该方法相对其他传统染色体步移的方法 (如反向 PCR、连接接头法等) 具备高效、高特异性、高灵敏度、操作简便等特点。

分别使用试剂盒中提供的 4 条兼并引物，即 TP Primer 1 ( TP1 )、TP Primer 2 ( TP2 )、TP Primer 3 ( TP3 )、TP Primer 4 ( TP4 )，搭配根据已知序列设计出的特异性引物 Specific Primer 1 ( SP1 )、Specific Primer 2 ( SP2 )、Specific Primer 3 ( SP3 ) 进行热不对称 PCR 扩增，经过三轮 PCR 扩增后便可获得已知序列的侧翼序列，如果一次实验获取的长度不能满足实验要求时，还可以根据第一次步移获取的序列信息，继续进行侧翼序列获取。

本产品搭配具有性能优越的 *L-Exp Taq* HS DNA Polymerase，具有扩增长片段或高 GC 含量等复杂片段扩增能力，该酶搭配精心优化的 Buffer 体系，使反应具有较高的特异性，同时在保证扩增成功率的情况下又能获得较长的目的序列。

本产品提供了 Control Template 及 Control Specific Primer，方便进行对照实验。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG11515 ( 10 rxns / 50 $\mu$ l )
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/ $\mu$ l )	25 $\mu$ l
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	500 $\mu$ l
dNTP Mix ( 10 mM each )	100 $\mu$ l
TP Primer 1 ( 100 $\mu$ M )	30 $\mu$ l
TP Primer 2 ( 100 $\mu$ M )	30 $\mu$ l
TP Primer 3 ( 100 $\mu$ M )	30 $\mu$ l
TP Primer 4 ( 100 $\mu$ M )	60 $\mu$ l
Control Template ( 200 ng/ $\mu$ l )	10 $\mu$ l
Control Specific Primer 1 ( 10 $\mu$ M )	10 $\mu$ l
Control Specific Primer 2 ( 10 $\mu$ M )	10 $\mu$ l
Control Specific Primer 3 ( 10 $\mu$ M )	10 $\mu$ l

## ➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

运输温度：干冰运输或 -20°C 冰袋运输

## ➤ 产品优势

1. 本产品采用的 *L-Exp Taq* HS DNA Polymerase 具有扩增效率高、错配率低等优点；采用优化的 PCR 反应体系，非常适合长片段和复杂模板的 PCR 扩增，使其适合于染色体步移。
2. 本产品包含四条兼并引物，至少有一条兼并引物能和特异性引物搭配，经三轮 PCR 扩增后可获得侧翼序列，成功率高。

## ➤ 实验原理

本产品 TAIL-PCR 的原理上进行改进：根据已知 DNA 序列设计出三条同向嵌套且退火温度较高（一般  $>60^{\circ}\text{C}$ ）的特异性引物（SP1、SP2、SP3），其中 SP2 位于 SP1 内侧、SP3 位于 SP2 内侧。通过将特异性引物和兼并引物（TP1、TP2、TP3、TP4）组合，经三轮热不对称的分级反应来进行 PCR 扩增，从而获得已知序列侧翼的未知 DNA 序列。

在第一轮 PCR 中，模板一般为基因组 DNA、载体或 T-DNA，SP1 作为特异性引物，兼并引物选用 TP1-TP4 中的任一条；反应由 5 次高特异性反应、1 次低特异性反应和 15 次热不对称的超级循环（包括 2 个高退火温度（一般  $65^{\circ}\text{C}$ ）的高特异性反应和 1 个低退火温度（一般  $44^{\circ}\text{C}$ ）的低特异性反应）构成（见“操作方法”中第一轮 PCR 反应条件）。通过 5 次高特异性反应，SP1 与模板上的已知序列退火并延伸，提高目的序列浓度；接下来的 1 次低特异性反应，使兼并引物尽可能的结合到目的序列上；最后的 15 次超级循环使目的序列呈指数型扩增。经过第一轮反应得到了不同浓度的 3 种类型的产物：特异性产物和 I 型、II 型非特异性产物（见原理图）。

第二轮 PCR 反应由 15 次超级循环构成，模板为适量的第一轮扩增产物，特异性引物 SP2 为 SP1 的嵌套引物，兼并引物和第一轮 PCR 中选用的引物一致；在此轮 PCR 中，特异性产物被选择性扩增，I 型非特异性产物不再扩增，II 型非特异性产物因为超级循环中只有一个低特异性反应所以产量相对特异性产物进一步降低。经第二次 PCR 反应后，特异性产物含量很高，非特异性产物（I 型和 II 型）含量低。

第三轮 PCR 中，模板为适量的第二轮扩增产物，SP3 作为特异性引物。第三轮 PCR 和第二轮 PCR 反应一致，特异性产物被选择性扩增，产物含量相对进一步增加，而非特异性产物相对进一步降低。

使用本试剂盒经以上三轮 PCR 反应后，即可获得高含量的目的序列。

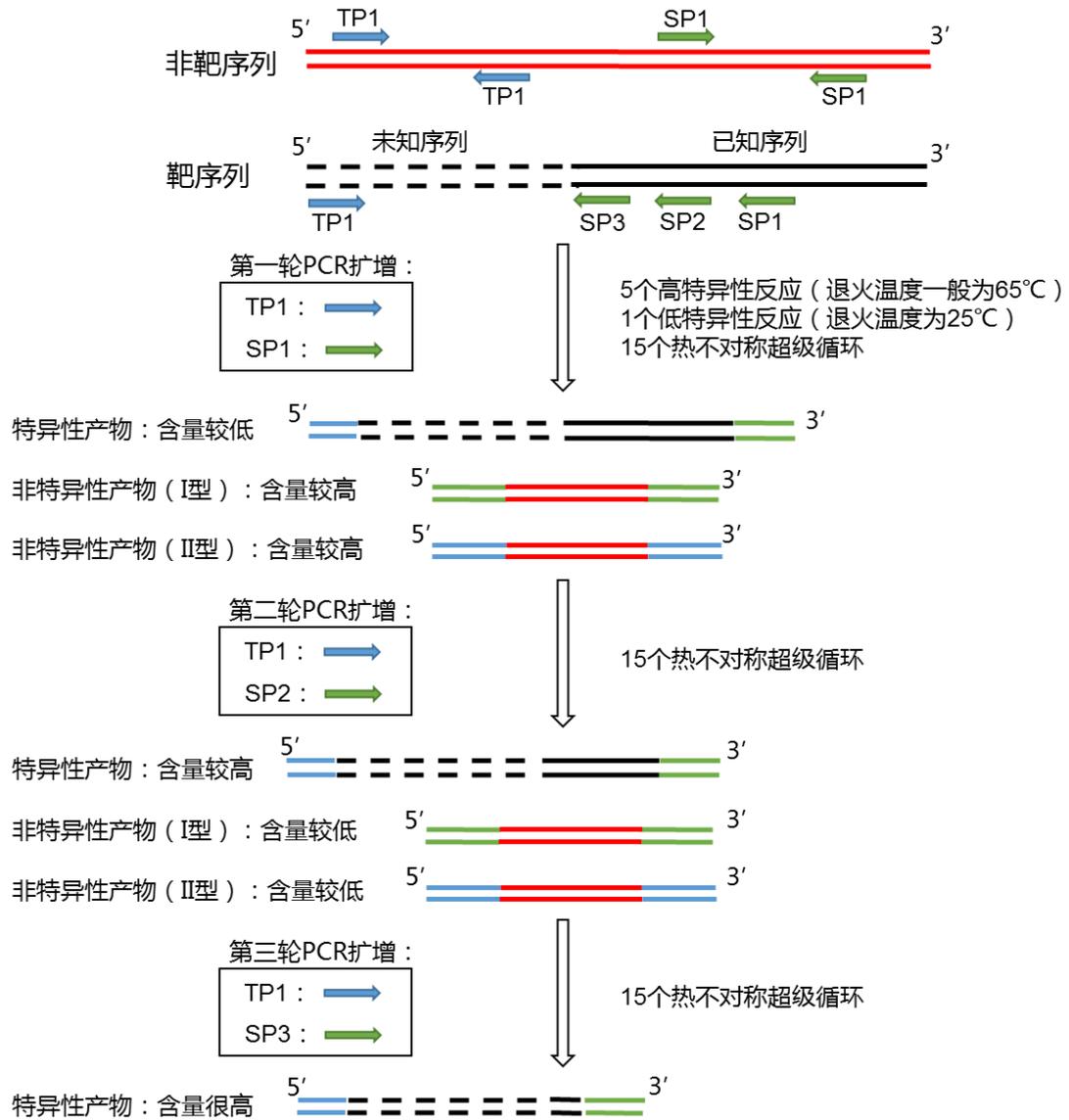


图 1: 以使用 TP1 扩增已知序列 5' 侧翼未知序列为例

## ➤ 特异性引物 (SP) 设计

1. 根据已知序列的区域 (最好不低于 500 bp), 设计三条同向嵌套引物, 见上述原理图, 引物方向需朝向未知序列, 并且 SP2 位于 SP1 内侧, SP3 位于 SP2 内侧。
2. 每两个引物间距一般为 60~100 bp, 不要重叠, SP3 与未知序列距离一般为 100~200 bp, 以增加获取未知序列的有效长度。
3. 设计引物的长度为 23~30 nt, GC 含量为 40~60%, T<sub>m</sub> 值在 60~70 °C。
4. 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀, 避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
5. 引物 3' 端避免出现发夹结构。

## ➤ 使用注意事项

1. 三轮 PCR 反应中使用的兼并引物均要保持一致，如在第一轮 PCR 中使用了兼并引物 TP1，则第二轮、第三轮 PCR 均要使用兼并引物 TP1。
2. 每种兼并引物对于不同物种甚至不同基因的扩增效率不同，因此当使用一种兼并引物未扩增出目的序列时，可更换兼并引物再次扩增，或者同时使用四种兼并引物分别和特异性引物扩增，但不推荐将四种兼并引物混合到一个 PCR 反应中使用。
3. 后两轮 PCR 反应均使用前一轮 PCR 产物作为模板，操作过程中注意避免造成污染；若浓度过高，可对产物进行适当稀释。
4. 第三轮 PCR 有时会产生多个条带，这些条带并非都是目的条带，应结合第二轮 PCR 扩增结果判断，若第三轮 PCR 产物比第二轮产物稍短，则此条带可视为候选目的条带，可回收后送测序进一步验证。

## ➤ 实验前准备

1. **试剂 & 耗材：**  
SP1、SP2、SP3、DNA 模板、PCR 管（RNase free）、枪头（RNase free）。
2. **仪器：**  
PCR 仪、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

## ➤ 操作方法

### 1. 第一轮 PCR 反应

1) 按照下表在冰上配制第一轮 PCR 反应液：

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/ $\mu$ l ) *1	2.5 U	0.5 $\mu$ l
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 $\mu$ l
dNTP Mix ( 10mM each )	0.4 mM	2 $\mu$ l
TP Primer ( 100 $\mu$ M ) *2	2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Specific Primer 1 ( 10 $\mu$ M )	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Template*3	-	-
RNase free water	-	Up to 50 $\mu$ l

\*1: 使用前可短暂离心，将试剂收集至离心管底部，减少损失；

\*2: 可选择 TP1、TP2、TP3、TP4 中的任一条，三轮 PCR 反应中使用同一条 TP Primer；

\*3: 动物以及植物基因组 DNA 推荐用量为 0.1  $\mu$ g~1  $\mu$ g，微生物基因组 DNA 推荐用量为 10 ng~100 ng。

## 2) 第一轮 PCR 反应条件:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
预变性	98°C	1 min	1
变性	94°C	30 sec	} 5
退火	60-68°C <sup>*1</sup>	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
变性	94°C	30 sec	} 1
退火	25°C	3 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
变性	94°C	30 sec	} 15
退火	60-68°C <sup>*1</sup>	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
变性	94°C	30 sec	
退火	60-68°C <sup>*1</sup>	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
变性	94°C	30 sec	
退火	44°C	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
最终延伸	72°C	10 min	1

\*1: 特异性引物不同, 退火温度也不同。一般在 60 ~ 68°C 之间, 推荐使用 65°C 退火。

\*2: 推荐延伸时间为 2 min, 可根据需要选择; 延伸时间长可获取较长片段, 但特异性可能较差。

## 2. 第二轮 PCR 反应

## 1) 按照下表在冰上配制第二轮 PCR 反应液:

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/μl ) <sup>*1</sup>	2.5 U	0.5 μl
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 μl
dNTP Mix ( 10mM each )	0.4 mM	2 μl
TP Primer ( 100 μM ) <sup>*2</sup>	2 μM	1 μl
Specific Primer 2 ( 10 μM )	0.2 μM	1 μl
Template <sup>*3</sup>	-	5 μl
RNase free water	-	Up to 50 μl

\*1: 使用前可短暂离心, 将试剂收集至离心管底部, 减少损失。

\*2: TP Primer 保证与第一轮 PCR 反应使用的 TP Primer 相同。

\*3: 由于产物较粘稠, 建议将上一轮 PCR 产物原液稀释 5 倍后添加 5  $\mu$ l 作为模板; 若效果不理想, 可以在 5-1000 倍范围内适当稀释上一轮 PCR 产物, 再取 5  $\mu$ l 进行 PCR 反应。

## 2) 第二轮 PCR 反应条件:

步骤	温度	时间	循环数
变性	94°C	30 sec	15
退火	60-68°C <sup>*1</sup>	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
变性	94°C	30 sec	
退火	60-68°C <sup>*1</sup>	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
变性	94°C	30 sec	
退火	44°C	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
最终延伸	72°C	10 min	1

\*1: 特异性引物不同, 退火温度也不同。一般在 60~68°C 之间, 推荐使用 65°C 退火。

\*2: 推荐延伸时间为 2 min, 可根据需要选择; 延伸时间长可获取较长片段, 但特异性可能较差。

## 3. 第三轮 PCR 反应

### 1) 按照下表在冰上配制第三轮 PCR 反应液:

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/ $\mu$ l ) <sup>*1</sup>	2.5 U	0.5 $\mu$ l
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 $\mu$ l
dNTP Mix ( 10mM each )	0.4 mM	2 $\mu$ l
TP Primer ( 100 $\mu$ M ) <sup>*2</sup>	2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Specific Primer 3 ( 10 $\mu$ M )	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Template <sup>*3</sup>	-	5 $\mu$ l
RNase free water	-	Up to 50 $\mu$ l

\*1: 使用前可短暂离心, 将试剂收集至离心管底部, 减少损失。

\*2: TP Primer 保证与前两轮 PCR 反应使用的 TP Primer 相同。

\*3: 由于产物较粘稠, 建议将上一轮 PCR 产物原液稀释 5 倍后添加 5  $\mu$ l 作为模板; 若效果不理想, 可以在 5-1000 倍范围内适当稀释上一轮 PCR 产物, 再取 5  $\mu$ l 进行 PCR 反应。

## 2) 第三轮 PCR 反应条件:

步骤	温度	时间	循环数
变性	94°C	30 sec	} 15
退火	60-68°C <sup>*1</sup>	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
变性	94°C	30 sec	
退火	60-68°C <sup>*1</sup>	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
变性	94°C	30 sec	
退火	44°C	1 min	
延伸	72°C	2-4 min <sup>*2</sup>	
最终延伸	72°C	10 min	1

\*1: 特异性引物不同, 退火温度也不同。一般在 60 ~ 68°C 之间, 推荐使用 65°C 退火。

\*2: 推荐延伸时间为 2 min, 可根据需要选择; 延伸时间长可获取较长片段, 但特异性可能较差。

#### 4. 结果检测

1) 反应结束后, 取三轮 PCR 产物各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳。

2) 对单一条带进行切胶回收, 建议使用本公司 *SteadyPure* DNA 凝胶回收试剂盒 (Code No. AG21005), 以 SP3 引物对 PCR 产物进行 DNA 测序。

#### ➤ 实验例

1. 以 Control Template 为模板, 利用本产品中 TP Primer 4 获取鼠基因组中的 *ApoE* 基因 5' 序列, 电泳结果显示经三轮 PCR 后, 扩增得到相对较为单一的目的条带。

##### 1) 第一轮 PCR

###### ① 配制反应液:

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/μl )	2.5 U	0.5 μl
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 μl
dNTP Mix ( 10mM each )	0.4 mM	2 μl
TP Primer 4 ( 100 μM )	2 μM	1 μl
Control Specific Primer 1 ( 10 μM )	0.2 μM	1 μl
Control Template ( 200 ng/μl )	4 ng	1 μl
RNase free water	-	34.5 μl

## ②反应条件:

参考“操作方法”中的 1. 第一轮 PCR 反应程序, 其中退火温度选择 65°C, 延伸时间选择 2 min。

## 2) 第二轮 PCR

## ①配制反应液:

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/μl )	2.5 U	0.5 μl
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 μl
dNTP Mix ( 10 mM each )	0.4 mM	2 μl
TP Primer 4 ( 100 μM )	2 μM	1 μl
Control Specific Primer 2 ( 10 μM )	0.2 μM	1 μl
第一轮 PCR 产物 <sup>*1</sup>	-	5 μl
RNase free water	-	30.5 μl

\*1: 将第一轮产物稀释 5 倍后, 添加 5 μl 作为第二轮 PCR 模板。

## ②反应条件:

参考“操作方法”中的 2. 第二轮 PCR 反应程序, 其中退火温度选择 65°C, 延伸时间选择 2 min。

## 3) 第三轮 PCR

## ①配制反应液:

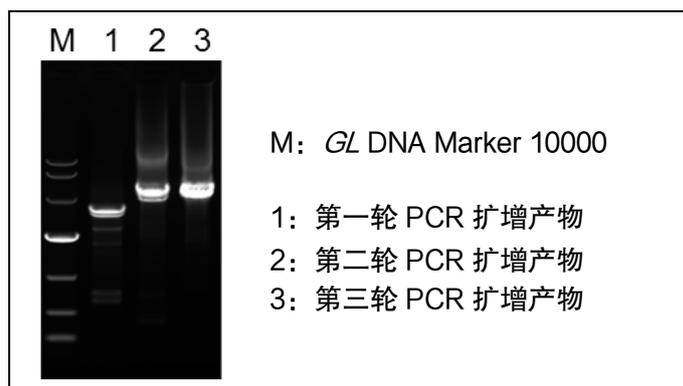
组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/μl )	2.5 U	0.5 μl
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 μl
dNTP Mix ( 10mM each )	0.4 mM	2 μl
TP Primer 4 ( 100 μM )	2 μM	1 μl
Control Specific Primer 3 ( 10 μM )	0.2 μM	1 μl
第二轮 PCR 产物 <sup>*1</sup>	-	5 μl
RNase free water	-	30.5 μl

\*1: 将第二轮产物稀释 5 倍后, 添加 5 μl 作为第三轮 PCR 模板。

## ②反应条件:

参考“操作方法”中的 3. 第三轮 PCR 反应程序, 其中退火温度选择 65°C, 延伸时间选择 2 min。

电泳结果如下图所示：



#### 4) 产物分析及回收

使用 *SteadyPure* DNA 凝胶回收试剂盒 (Code No.AG21005) 对第三轮 PCR 扩增产物进行切胶回收，然后使用 Control Specific Primer 3 进行 DNA 测序；

测序结果显示，获取的 5 kb DNA 片段包含鼠基因组中的 *ApoE* 基因 5'端序列。

2. 以水稻 gDNA 为模板，利用本产品 TP Primer 2 获取水稻基因组上的 *GAP1* 基因 5'序列，电泳结果显示经三轮 PCR 后，扩增得到相对较为单一的目的条带。

#### 1) 第一轮 PCR

##### ① 配制反应液：

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/ $\mu$ l )	2.5 U	0.5 $\mu$ l
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 $\mu$ l
dNTP Mix ( 10mM each )	0.4 mM	2 $\mu$ l
TP Primer 2 ( 100 $\mu$ M )	2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Specific Primer 1 ( 10 $\mu$ M )	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
水稻 gDNA ( 100 ng/ $\mu$ l )	100 ng	1 $\mu$ l
RNase free water	-	34.5 $\mu$ l

##### ② 反应条件：

参考“操作方法”中的 1. 第一轮 PCR 反应程序，其中退火温度选择 65°C，延伸时间选择 2 min。

## 2) 第二轮 PCR

### ① 配制反应液:

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/ $\mu$ l )	2.5 U	0.5 $\mu$ l
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 $\mu$ l
dNTP Mix ( 10mM each )	0.4 mM	2 $\mu$ l
TP Primer 2 ( 100 $\mu$ M )	2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Specific Primer 2 ( 10 $\mu$ M )	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
第一轮 PCR 产物 <sup>*1</sup>	-	5 $\mu$ l
RNase free water	-	30.5 $\mu$ l

\*1: 将第一轮产物稀释 5 倍后, 添加 5  $\mu$ l 作为第二轮 PCR 模板。

### ② 反应条件:

参考“操作方法”中的 2. 第二轮 PCR 反应程序, 其中退火温度选择 65°C, 延伸时间选择 2 min。

## 3) 第三轮 PCR

### ① 配制反应液:

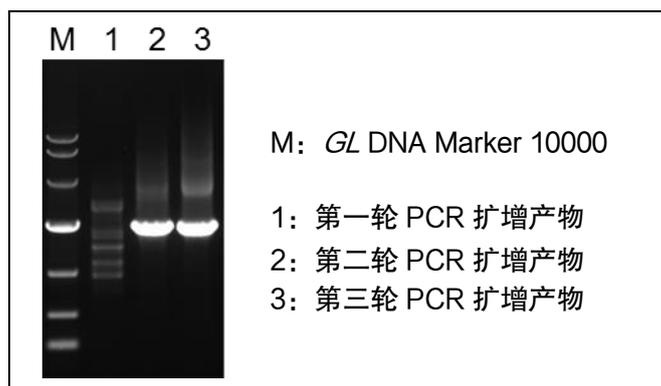
组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U/ $\mu$ l )	2.5 U	0.5 $\mu$ l
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1X	10 $\mu$ l
dNTP Mix ( 10 mM each )	0.4 mM	2 $\mu$ l
TP Primer 2 ( 100 $\mu$ M )	2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Specific Primer 3 ( 10 $\mu$ M )	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
第二轮 PCR 产物 <sup>*1</sup>	-	5 $\mu$ l
RNase free water	-	30.5 $\mu$ l

\*1: 将第二轮产物稀释 5 倍后, 添加 5  $\mu$ l 作为第三轮 PCR 模板。

### ② 反应条件:

参考“操作方法”中的 3. 第三轮 PCR 反应程序, 其中退火温度选择 65°C, 延伸时间选择 2 min。

电泳结果如下图所示：



#### 4) PCR 产物分析及回收

使用 *SteadyPure* DNA 凝胶回收试剂盒 (Code No. AG21005) 对第三轮 PCR 扩增产物进行切胶回收，然后使用 Specific Primer 3 进行 DNA 测序，测序结果显示，获取的 4 kb DNA 片段包含水稻基因组中的 *GAP1* 基因 5'端序列。

## ➤ 产品注意事项

### 1. 合适的模板

- ❖ 基因组 DNA 的质量是侧翼序列获取成功与否的关键因素之一。推荐使用经过充分纯化的完整的基因组 DNA，提取模板过程中要避免污染。
- ❖ 模板的纯度及完整性影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率，降低外源污染。
- ❖ 动物以及植物基因组 DNA 推荐用量为 0.1  $\mu\text{g}$ ~1  $\mu\text{g}$ ，微生物基因组 DNA 推荐用量为 10 ng~100 ng；可根据实际情况调整模板加入量。

### 2. 已知序列的验证

- ❖ 建议实验之前对已知序列进行验证，以确认已知序列的正确性。可根据已知序列设计特异性引物（扩增长度建议不少于 500 bp），对模板进行 PCR 扩增，进行产物测序后与参考序列比较确认其准确性。

### 3. 防止污染措施

- ❖ 建议配制反应液与添加 DNA 模板的区域分开，避免造成交叉污染。
- ❖ 第二轮及第三轮 PCR 扩增需使用前一轮的产物，由于扩增产物量较大，开盖时要轻柔避免液体飞溅产生气溶胶污染。

- ❖ 每次实验设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

#### 4. 如果四种兼并引物均未扩出条带，可能原因及解决方法

- ❖ 反应体系配制可能存在问题，需检查体系配制是否准确，包括引物浓度及用量是否错误、引物是否混用、组分是否遗漏等。
- ❖ 反应程序设置错误，上机后仔细与说明书中程序进行核对，确保准确无误。
- ❖ 特异性引物（SP）设计存在问题，可考虑重新设计，设计时严格遵守说明书中关于特异性引物设计的原则。

#### 5. 如果四种兼并引物均出现 Smear 条带，可能原因及解决方法

- ❖ 可能由于产物浓度较高，可将上一轮的 PCR 产物进行适当倍数稀释，再进行 PCR 扩增。
- ❖ 可能起始模板基因组 DNA 中存在 PCR 抑制物，可适当降低模板用量或重新提取基因组 DNA 再进行实验。
- ❖ 可能是特异性引物的原因，应严格按照特异性引物设计原则重新设计 SP 引物。
- ❖ 如果有目的条带但不清晰，可以适当增加第三轮 PCR 反应程序的循环数。