



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

版本号:2018-09-05

# 模板锁定染色体步移试剂盒

## KX Genome Walking Kit

(产品编号: ZT601-1 规格: 10次)

·高效 ·简便 ·特异性高 ·灵敏度高 ·一次性获得的未知序列较长

实验室使用，仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

## ■ 染色体步移技术简介与应用

染色体步移技术 (Genome Walking) 是一种重要的分子生物学研究技术, 使用这种技术可以有效获取与已知序列相邻的未知序列。

1. 根据已知的基因或分子标记连续步移, 获取人、动物和植物的重要调控基因, 可以用于研究结构基因的表达调控。如分离克隆启动子并对其功能进行研究;

2. 步查获取新物种中基因的非保守区域, 从而获得完整的基因序列;

3. 鉴定T-DNA或转座子的插入位点, 鉴定基因枪转基因法等转基因技术所导致的外源基因的插入位点等;

4. 用于染色体测序工作中的空隙填补, 获得完整的基因组序列;

5. 用于人工染色体PAC、YAC和BAC的片段搭接。

对于基因组测序已经完成的少数物种 (如人、小鼠、线虫、水稻、拟南芥等) 来说, 可以轻松地从数据库中找到某物种已知序列的侧翼序列。但是, 对于大多数生物而言, 在不了解它们的基因组序列以前, 想要知道一个已知区域两侧的 DNA 序列, 只能采用染色体步移技术。

## ■ 产品说明

以PCR技术为基础的染色体步移的主要问题是预先不了解未知区域序列信息的情况下, 如何设计两个特异性引物来扩增未知区域。而传统的染色体步移方法, 如: 反向PCR法、连接接头法等, 都有操作复杂、非特异性扩增、连接效率低等弊端。

相对于其它传统方法, 本试剂盒具有高效、简便、特异性高、灵敏度高、一次性获得的未知序列较长等特点。主要原理是客户根据已知DNA序列, 分别设计三条同向且退火温度较高的特异性引物 (SP Primer), 与试剂盒中提供的九种经过独特设计的退火温度较低的兼并引物 (即ZFP1、ZFP2、ZFP3、ZFP4、ZFP5、ZFP6、ZFP7、ZFP8、ZFP9) 进行热不对称PCR反应。通常情况下, 其中随机选四种至少有一种兼并引物可以与特异性引物之间利用退火温度的差异进行热不对称PCR反应, 通过三次巢式PCR反应即可获取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。

此外, 本试剂盒中还含有 Control DNA 及 Control Primer, 可以方便进行 Control 实验。

## ■ 产品内容 (10 次量)

1. ZFP1 Primer (10 pmol/μl)	100μl
2. ZFP2 Primer (10 pmol/μl)	100μl
3. ZFP3 Primer (10 pmol/μl)	100μl
4. ZFP4 Primer (10 pmol/μl)	100μl
5. ZFP5 Primer (10 pmol/μl)	100μl
6. ZFP6 Primer (10 pmol/μl)	100μl
7. ZFP7 Primer (10 pmol/μl)	100μl
8. ZFP8 Primer (10 pmol/μl)	100μl
9. ZFP9 Primer (10 pmol/μl)	100μl
10. ZSP1 Primer (10 pmol/μl)	60μl

11. ZSP2 Primer (10 pmol/μl)	60μl
12. Control Template (50 ng/μl) ※1	10μl
13. Control Specific Primer CSP1 (10 pmol/μl) ※2	20μl
14. Control Specific Primer CSP2 (10 pmol/μl) ※2	20μl
15. Control Specific Primer CSP3 (10 pmol/μl) ※2	20μl
16. Kx Pfu DNA Polymerase (1U/ul)	60μl
17. 2×KxPCR Buffer	1.5ml
18. dNTPs-GW (2.5mM each)	600μl
19. 6×Loading Buffer	1ml
20. ddH <sub>2</sub> O	1.2ml

※1 Control Template 是 Human HL60 来源的基因组 DNA。

※2 Control Specific Primers 是根据人基因组中的 ALDOA 基因设计的特异性引物。

#### 【引物序列】

引物名称	引物序列 (5' →3' )
Control Specific Primer CSP1	AAATGCTGCAGCCTCCCTCTCACCC
Control Specific Primer CSP2	AATACCAGAAATGTGCCCTCCCGTG
Control Specific Primer CSP3	TGAGCTGGCAGTTGTAGTCTCTGT

●保存: -20°C。

## ■ 实验时需要自备的其他主要试剂

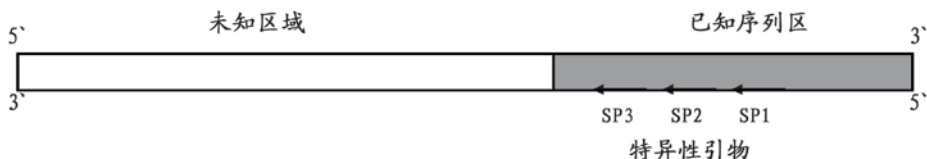
- 1、PCR模板--基因组DNA。(我公司提供各种基因组DNA提取纯化试剂盒。)
- 2、特异性引物 SP1、SP2、SP3。

## ■ 特异性引物的设计要求

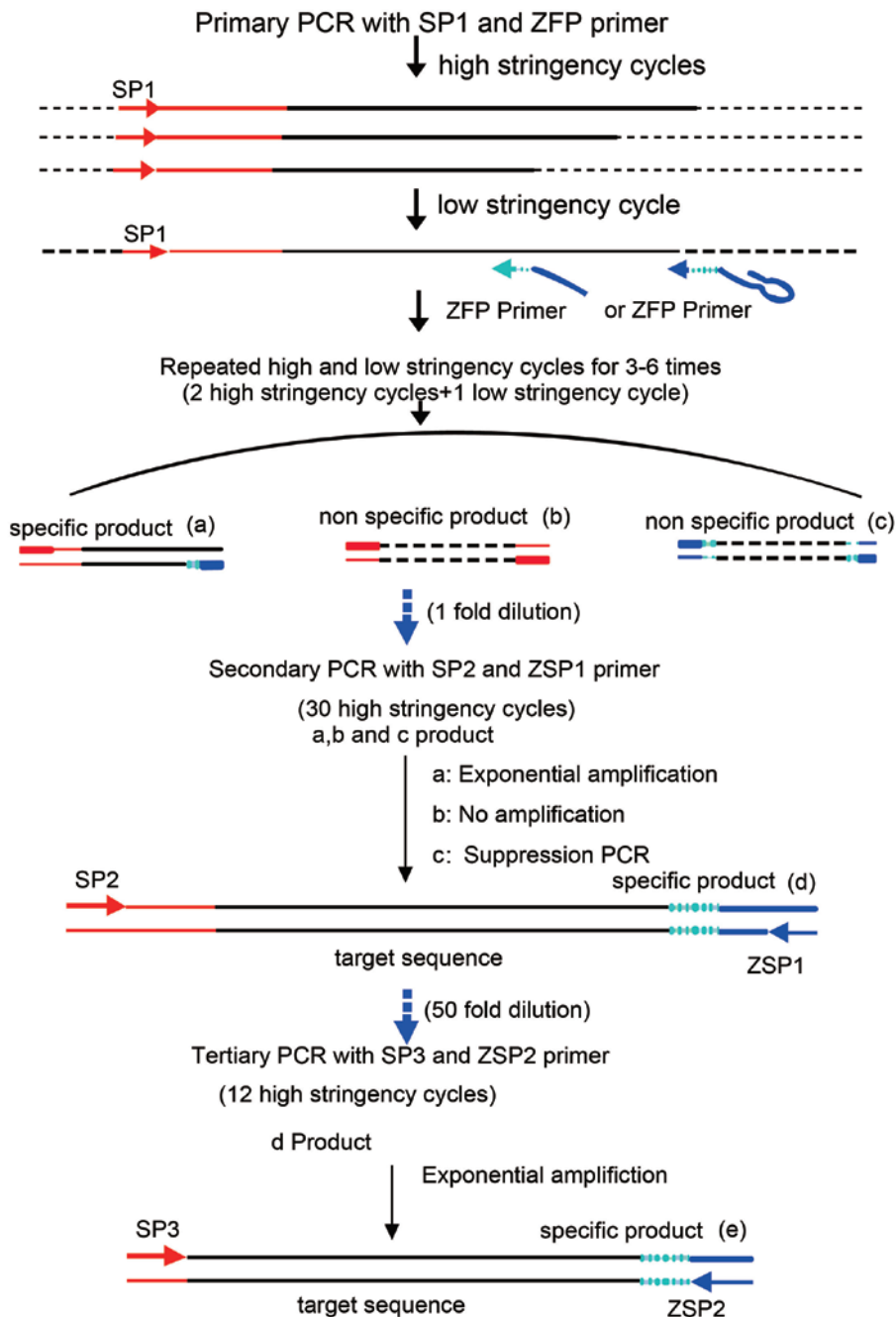
根据经过验证的已知序列区(最好不少于500 bp)设计三个同向特异性引物(见下面的示意图):设计方向为需要扩增的未知区域方向,SP2的位置应设计在SP1的内侧,SP3位于SP2的内侧。每两个引物之间的距离没有严格规定,一般以60~100bp为宜。SP3 Primer 不要距离未知序列区域太远,一般以100~200 bp为宜,以增加获取未知序列的有效长度。

引物设计原则:引物的长度为23~28nt,GC含量45~55%,Tm值60~70°C,引物Tm值计算公式: $Tm=69.3+0.41(G/C)\% \times 100-650/L$ (引物碱基数)。其他要求和普通PCR反应应用引物相同。

### 特异性引物设计示意图(以获取5'序列为例)



■ 试剂盒原理简图(热不对称PCR)



## ■ 实验操作流程

- (1) 基因组DNA的获取;
- (2) 已知序列的验证;
- (3) 根据已知序列,设计合成三条特异性引物: SP1、SP2、SP3;
- (4) 利用 ZFP随机引物和特异性引物 SP1 进行第一次PCR(1st PCR);
- (5) 取适量的1st PCR 反应产物作为2nd PCR 模板,利用ZSP1引物和特异性引物 SP2 进行 2nd PCR;
- (6) 取适量的2nd PCR 反应产物作为3rd PCR 模板,利用ZSP2引物和特异性引物 SP3 进行 3rd PCR;
- (7) 将三次 PCR 产物按顺序分别取 5 $\mu$ l 进行电泳,从凝胶中回收清晰的条带;
- (8) 回收的 PCR 产物以 SP3 为引物进行 DNA 测序,测序结果与参考序列比对;
- (9) 根据测序结果设计特异性引物,对实验结果进行验证;

## ■ 实验操作方法

### 1. 基因组DNA的获取。

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。建议不要使用只经过简单处理的基因组DNA作为模板,而要使用经过充分纯化的完整基因组DNA。此外,由于本方法灵敏度极高,模板DNA一定不要污染,所需的DNA量不要少于3 $\mu$ g。

### 2. 已知序列的验证。(验证序列的同时也验证模板的好坏。)

在进行实验之前必须对已知序列进行验证,以确认已知序列的正确性。具体方法为:根据已知序列设计特异性引物(扩增长度最好不少于500bp),对模板进行PCR扩增,然后对PCR产物进行测序,再与参考序列比较确认已知序列的正确性。

### 3. 特异性引物的设计。

根据验证的已知序列,按照前述的特异性引物设计原则设计三条特异性引物,即:SP1、SP2、SP3。

### 4. 1st PCR反应。

基因组DNA经OD测定准确定量后,取适量作为模板(不同物种的最佳反应DNA量并不相同,实际用量参考下面的注※1),以 ZFP Primer (九种中的任意一种)作为上游引物,SP1 Primer 为下游引物,进行1st PCR反应。

#### (1) 按下列组份配制1st PCR反应液。

Template (基因组 DNA)	约200ng
dNTPs-GW (2.5 mM each)	10 $\mu$ l
2 $\times$ KxPCR Buffer	25 $\mu$ l
Kx Pfu DNA Polymerase (1U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
ZFP (1-9) Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	7.5 $\mu$ l
SP1 Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	补足至50.0 $\mu$ l
Total Volume	50.0 $\mu$ l

(2) 1st PCR反应条件如下:(如果PCR仪不支持一次编程完成,可分段编程PCR处理。)

94°C	2 min		
98°C	10 sec	}	2 Cycles
60~68°C ※2	30 sec		
68°C	2~4 min(※3)		
98°C	10 sec;	}	1 Cycles
25°C	2 min;		
25°C-68°C	0.2°C/sec		
68°C	2~4 min(※3)		
98°C 10 sec; 60~68°C ※2	30 sec; 68°C	}	3-6 Cycles
98°C 10 sec; 60~68°C ※2	30 sec; 68°C		
98°C 10 sec; 44°C	30 sec; 68°C		
68°C	5 min	4°C	∞

注1: ※2和※3为参见“注意事项”中的※2和※3项。

注2: 0.2°C/sec为设置PCR仪25 - 68°C之间缓慢升温的速度, 也可26°C 5 sec、27°C 5 sec、28°C 5 sec、29°C 5 sec、30°C 5 sec... 66°C 5 sec、67°C 5 sec代替。

注3: 如一次编程不了; 可程序A:26°C 5 sec、27°C 5 sec、28°C 5 sec; 紧接着进入程序B:29°C 5 sec、30°C 5 sec、31°C 5 sec。复杂的第三组程序亦可如此操作。

### 5. 2nd PCR 反应。

取1μl 1st PCR反应液作为2nd PCR反应的模板, 以ZSP1 Primer为上游引物, SP2 Primer为下游引物, 进行2nd PCR反应。

#### (1) 按下列组份配制 2nd PCR 反应液。

1st PCR反应液	1.0μl
dNTPs-GW (2.5 mM each)	10μl
2×KxPCR Buffer	25μl
Kx Pfu DNA Polymerase (1U/ul)	1.0μl
ZSP1 Primer (10 pmol/μl)	1.5μl
SP2 Primer (10 pmol/μl)	1.5μl
ddH <sub>2</sub> O	补足至50.0μl
Total Volume	50.0μl

#### (2) 2nd PCR 反应条件如下:

94°C	2 min		
98°C	10 sec	}	30Cycles
60~68°C ※2	30 sec		
68°C	2~4 min		
68°C	5 min	4°C	∞

### 6. 3rd PCR 反应。

将 2nd PCR 反应液或其稀释液※4, 取 1μl作为 3rd PCR 反应的模板, 以ZSP2 Primer 为上游引物, SP3 Primer 为下游引物, 进行 3rd PCR反应。

① 按下列组份配制 3rd PCR 反应液。

2nd PCR反应液 ※4	1.0μl
dNTPs-GW (2.5 mM each)	10μl
2×KxPCR Buffer	25μl
Kx Pfu DNA Polymerase (1U/ul)	1.0μl
ZSP2 Primer (10 pmol/μl)	1.5μl
SP3 Primer (10 pmol/μl)	1.5μl
ddH <sub>2</sub> O	补足至50.0μl
Total Volume	50.0μl

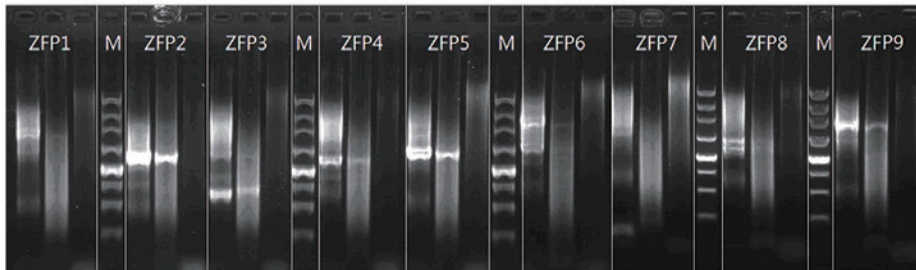
(3) 3rd PCR 反应条件如下:

94°C	2 min	} 12Cycles
98°C	10 sec	
60~68°C ※2	30 sec	
68°C	2~4 min	
68°C	5 min	4°C ∞

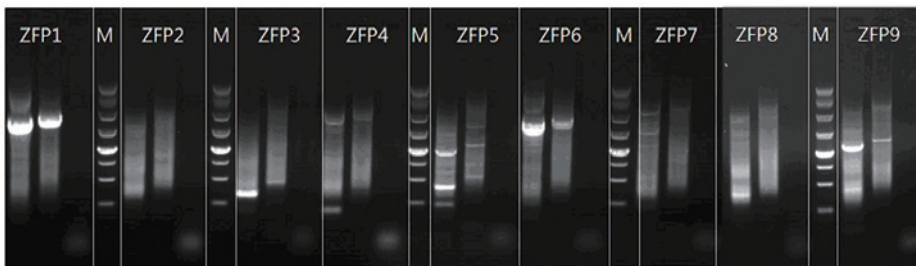
7. 取 1st, 2nd, 3rd PCR 反应液各 5μl, 使用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳。

8. 切胶回收清晰的电泳条带, 以 SP3 Primer 为引物对 PCR 产物进行 DNA 测序。

## ■ 实验举例



使用本试剂盒中的Control Template, 获取人基因组中的ALDOA基因5'端序列'的实验。



使用ZFP1-9随机引物, 扩增落叶松的实验图例。

## ■ 注意事项

※1 不同物种基因组DNA模板的使用量有不同的要求，具体见下表：(表中值为推荐使用量，实际操作中好些基因在50ng也有良好扩增，可能与基因丰度及质量有关。)

动物	植物	微生物
0.1~1	μg 0.1~1	μg 10~100 ng

※2 特异性引物不同，退火温度也有差异。一般在60~68°C之间，推荐使用62°C退火。

※3 可根据需要选择延伸时间，延伸时间长可以获取较长的DNA片段，但是容易产生非特异性PCR扩增。推荐延伸时间为2min。

※4 通常来说稀释倍数高，杂带会少些；用原反应液扩增出正确的条带后，可以稀释50倍或其他适当的稀释倍数来优化PCR。

※5 此PCR产物无多聚A的尾巴，不可直接进行TA克隆。要么进行平末端克隆，要么加A后克隆。由于Kx Pfu DNA Polymerase具有强烈的校正功能，所以需要纯化PCR产物后，进行加A反应。

## ■ 常见问题

Q-1 若三次 PCR 扩增结果均显示清晰条带，是否要将三次的清晰条带都进行DNA的回收测序？

A-1 不需要。由特异性引物设计可知。后一个特异性产物都要比前一个短60~100bp，当电泳显示3rd PCR产物比2nd PCR产物稍短时，说明PCR真实可用，可以只回收3rd PCR产物。1st PCR产物基本上是 ZFP引物的自扩产物或SP1引物的非特异性扩增结果，不需要回收测序。

Q-2 KX Genome Walking Kit 的反应体系及反应条件是否具有物种通用性？

A-2 此试剂盒的反应体系及反应条件经过对多种典型物种的实验验证，可以适用于多种物种。

Q-3 如果九种ZFP引物都没有扩增得到清晰条带，原因是什么？应采取什么解决措施？

A-3 ①如果后两次PCR扩增都没有得到清晰条带，可以尝试将上一步的PCR反应液进行适当倍数稀释，然后再进行PCR反应；

②可能是起始基因组DNA模板中存在有抑制PCR反应的物质，此时可以尝试降低基因组DNA的用量或重新纯化基因组 DNA；

③特异性引物的设计对侧翼序列的获取起至关重要的作用。当使用9条ZFP引物均无理想结果时，应考虑重新设计特异性引物。特异性引物设计时应严格遵守说明书中关于特异性引物设计的原则；

④可以尝试适当增加3rd PCR反应的循环圈数。

Q-4 是否可以只使用一种ZFP引物进行实验？

A-4 可以首先使用一种ZFP引物进行实验。但为了提高实验成功率，我们建议同时先使用四种ZFP引物同时进行实验，理论上至少会有一种以上的ZFP引物能够得到理想结果。如果效果不理想可以尝试下其余几种引物。

Q-5 获取的侧翼序列测序有套峰，是什么原因？

A-5 原因可能是非特异性扩增，或PCR产物不纯，也有可能是 DNA 本身结构复杂。可以重新设计测序引物，或考虑克隆测序。参见“注意事项 ※5”。

Q-6 第一次和第二次反应能否使用20μl体系？

A-6 我们建议第一次PCR反应使用20μl反应体系，第二次和第三次PCR采用50μl反应体系。

Q-7 是否可以使用一般的Taq酶和dNTPs替代dNTPs-GW (2.5mM each) 和Kx Pfu DNA Polymerase？

A-7 我们曾使用过其他试剂，但结果都不如试剂盒所配试剂理想。