

TaKaRa Code: D316

Genome Walking Kit (10 次量)

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保 存	1
●试剂盒原理	2
●特异性引物的设计	3
●实验时需要自备的其他主要试剂	3
●实验操作流程	3
●实验操作方法	4
●注意事项	6
●使用 Control Template 时的实验例	6
●使用小麦基因组 DNA 时的实验例	8
●Q&A	10
●参考文献	11

●制品说明

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。染色体步移技术主要有以下几方面的应用:

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。

以 PCR 技术为基础的染色体步移的主要问题是在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。

本试剂盒是一种根据已知基因组 DNA 序列, 高效获取侧翼未知序列的试剂盒。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。其主要原理是根据已知 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), 与试剂盒中提供的四种经过独特设计的退火温度较低的兼并引物, 即 AP1、AP2、AP3、AP4 进行热不对称 PCR 反应。通常情况下, 其中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。

●制品内容 (10 次量)

1. AP1 Primer (100 pmol/μl)	30 μl
2. AP2 Primer (100 pmol/μl)	30 μl
3. AP3 Primer (100 pmol/μl)	30 μl
4. AP4 Primer (100 pmol/μl)	50 μl
5. Control Template (100 ng/μl) *1	10 μl
6. Control Specific Primer SP1 (10 pmol/μl) *2	10 μl
7. Control Specific Primer SP2 (10 pmol/μl) *2	10 μl
8. Control Specific Primer SP3 (10 pmol/μl) *2	10 μl
9. TaKaRa LA Taq [®] (5 U/μl)	25 μl
10. 10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	1 ml
11. dNTP Mixture (2.5 mM each)	400 μl
12. 6×Loading Buffer	1 ml

*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 SP1	AAATGCTGCAGCCTCCCTCTCACCC
Control Specific Primer SP2	AATACCAGAAATGTGCCCTCCCGTG
Control Specific Primer SP3	TGAGCTGGCAGGTTGTAGTCTCTGT

●保 存: -20℃

●试剂盒原理：以使用兼并引物 AP1 为例。

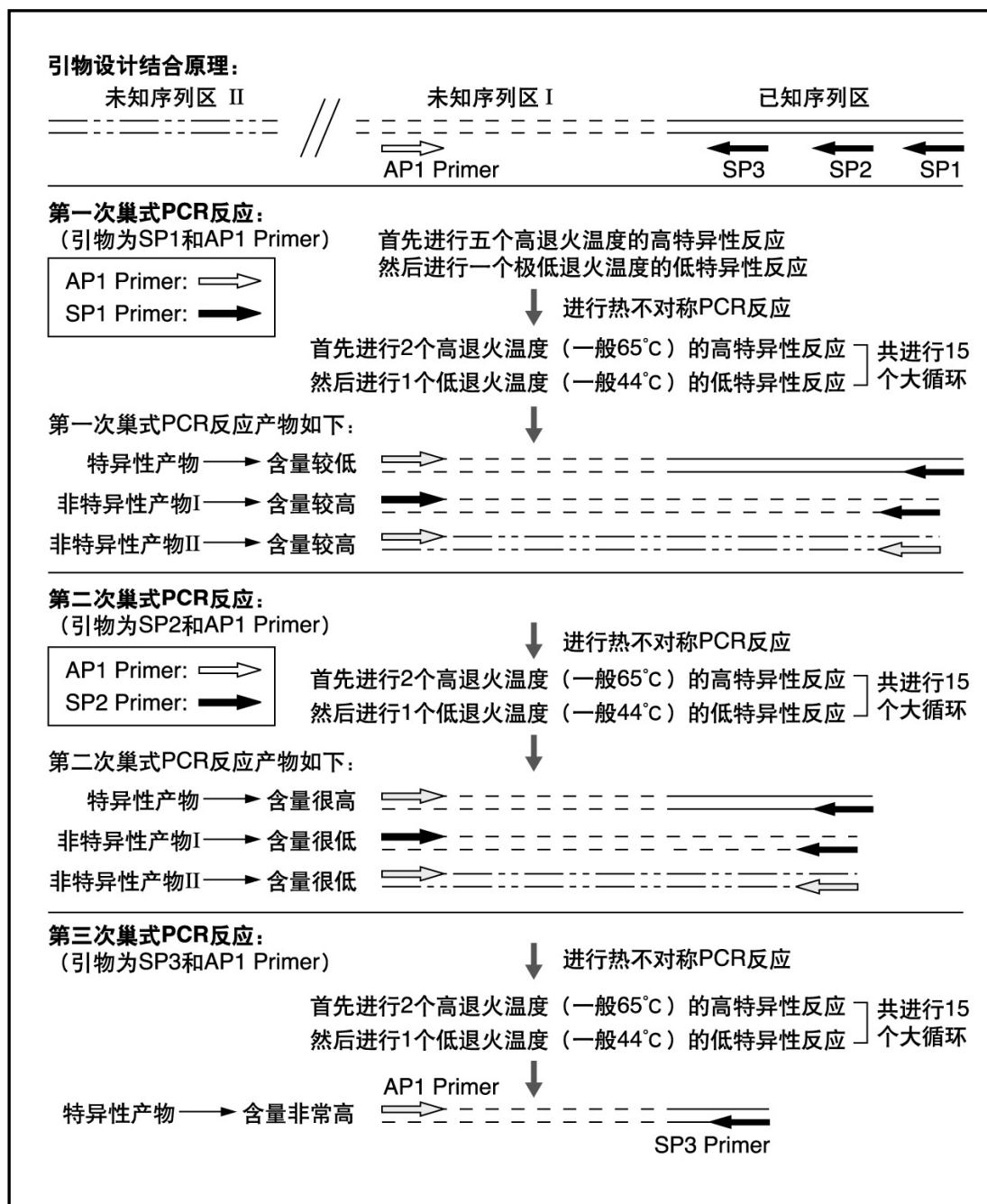


图 1. Genome Walking Kit 的实验原理图

●特异性引物的设计

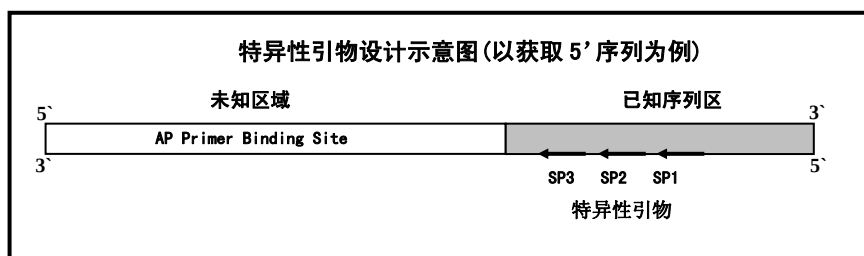


图 2. Genome Walking Kit 特异性引物设计示意图

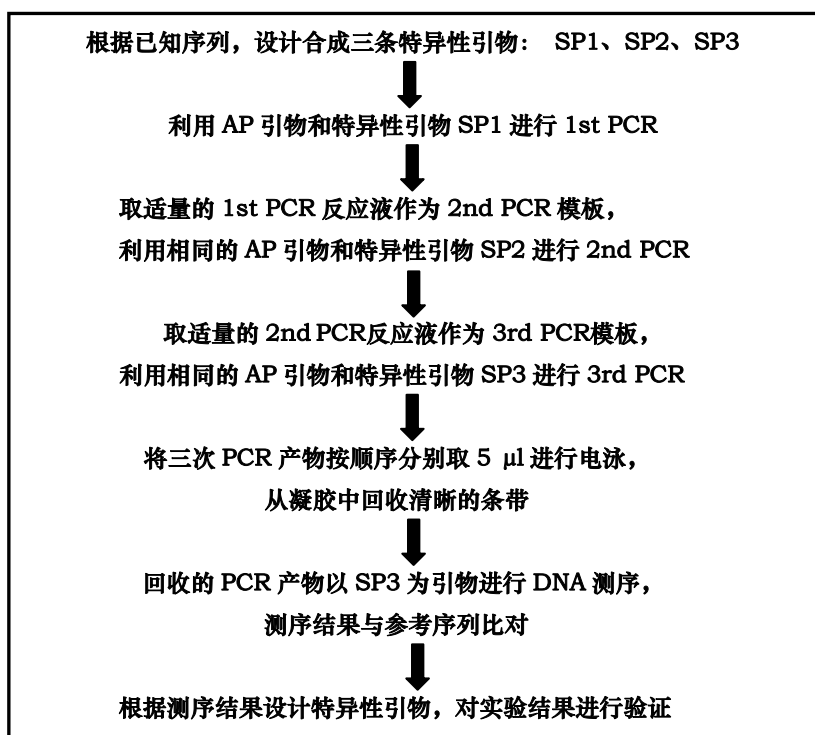
特异性引物设计原则:

根据经过验证的已知序列区（最好不少于 500 bp）设计三个特异性引物（见上图）：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 60~100 bp 为宜。引物设计原则：引物的长度为 22~26 nt，GC 含量 45~55%， T_m 值 60~70℃，引物 T_m 值计算公式： $T_m = 69.3 + 0.41 (G/C) \% \times 100 - 650/L$ （引物碱基数）。其他要求和普通 PCR 反应应用引物相同。

●实验时需要自备的其他主要试剂

- ◆ 基因组 DNA 提取试剂，如：Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 (TaKaRa Code: DV811A)。
- ◆ PCR 产物凝胶回收试剂，如：TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 (TaKaRa Code: DV805A)。

●实验操作流程



●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 (例如: 只进行细胞热处理或蛋白酶处理) 作为模板, 而要使用经过充分纯化的完整的基因组 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 μg 。

2. 已知序列的验证。

在进行 PCR 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 500 bp), 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 AP Primer (四种中的任意一种, 以下以 AP1 Primer 为例) 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)	x ng *1
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus)	5 μl
TaKaRa LA Taq [®] (5 U/ μl)	0.5 μl
AP1 Primer (100 pmol/ μl)	1 μl
SP1 Primer (10 pmol/ μl)	1 μl
dH ₂ O	up to 50 μl

② 1st PCR 反应条件如下:

94 $^{\circ}\text{C}$	1 min			
98 $^{\circ}\text{C}$	1 min			
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	} 5 Cycles		
60~68 $^{\circ}\text{C}$ *2	1 min			
72 $^{\circ}\text{C}$	2~4 min*3			
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	25 $^{\circ}\text{C}$	3 min;	72 $^{\circ}\text{C}$ 2~4 min*3
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	60~68 $^{\circ}\text{C}$ *2	1 min;	72 $^{\circ}\text{C}$ 2~4 min*3
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	60~68 $^{\circ}\text{C}$ *2	1 min;	72 $^{\circ}\text{C}$ 2~4 min*3
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	44 $^{\circ}\text{C}$	1 min;	72 $^{\circ}\text{C}$ 2~4 min*3
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min			} 15 Cycles

5. 2nd PCR 反应。

将 1st PCR反应液稀释 1~1000 倍后，取 1 μl 作为 2nd PCR反应的模板，以AP1 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。

Template (1st PCR反应液)	1 μl *4
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus)	5 μl
<i>TaKaRa LA Taq</i> [®] (5 U/ μl)	0.5 μl
AP1 Primer (100 pmol/ μl)	1 μl
SP2 Primer (10 pmol/ μl)	1 μl
dH ₂ O	up to 50 μl

② 2nd PCR 反应条件如下：

94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	60~68 $^{\circ}\text{C}$	1 min*2;	72 $^{\circ}\text{C}$	2~4 min*3	} 15 Cycles
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	60~68 $^{\circ}\text{C}$	1 min*2;	72 $^{\circ}\text{C}$	2~4 min*3	
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	44 $^{\circ}\text{C}$	1 min ;	72 $^{\circ}\text{C}$	2~4 min*3	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min					

6. 3rd PCR 反应。

将 2nd PCR反应液稀释 1~1000 倍后，取 1 μl 作为 3rd PCR反应的模板，以AP1 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。

Template (2nd PCR 反应液)	1 μl *4
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus)	5 μl
<i>TaKaRa LA Taq</i> [®] (5 U/ μl)	0.5 μl
AP1 Primer (100 pmol/ μl)	1 μl
SP3 Primer (10 pmol/ μl)	1 μl
dH ₂ O	up to 50 μl

② 3rd PCR 反应条件如下：

94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	60~68 $^{\circ}\text{C}$ *2	1 min;	72 $^{\circ}\text{C}$	2~4 min*3	} 15 Cycles
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	60~68 $^{\circ}\text{C}$ *2	1 min;	72 $^{\circ}\text{C}$	2~4 min*3	
94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec;	44 $^{\circ}\text{C}$	1 min;	72 $^{\circ}\text{C}$	2~4 min*3	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min					

7. 取 1st, 2nd, 3rd PCR反应液各 5 μl ，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。

*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：

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℃之间，推荐使用 65℃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 2 min。

*4 根据需要将上一步 PCR 反应液稀释 1~1000 倍后，取 1 μl 作为模板。此时首先建议使用 PCR 反应原液 1 μl 作为模板进行 PCR 反应。如果 PCR 扩增效果不理想，可以适当稀释 PCR 反应原液，再取 1 μl 进行 PCR 反应。

●注意事项

1. 使用本试剂盒时，进行三次PCR反应时使用的AP引物必须是同种AP引物，即：1st PCR反应时使用的是AP1，则2nd和3rd PCR反应都必须使用AP1。对于不同物种，各条AP引物的扩增效率各不相同。
2. 在设计特异性引物时，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。

●使用 Control Template 时的实验例

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。

1. 1st PCR 反应。

① 按下列组份配制 1st PCR 反应液。

Control Template (100 ng/ μl)	1 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
10×LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus)	5 μl
TaKaRa LA Taq® (5 U/ μl)	0.5 μl
AP4 Primer (100 pmol/ μl)	1 μl
Control Specific Primer SP1 (10 pmol/ μl)	1 μl
dH ₂ O	33.5 μl
Total	50 μl

② 1st PCR 反应条件如下：

94°C	1 min				
98°C	1 min				
94°C	30 sec	} 5 Cycles			
65°C	1 min				
72°C	2 min				
94°C	30 sec;	25°C	3 min;	72°C	2 min
94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min
94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min
94°C	30 sec;	44°C	1 min;	72°C	2 min
72°C	10 min				} 15 Cycles

2. 2nd PCR 反应。

① 按下列组份配制 2nd PCR 反应液。

1st PCR 反应产物	1 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μ l
10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i> [®] (5 U/ μ l)	0.5 μ l
AP4 Primer (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Control Specific Primer SP2 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
dH ₂ O	33.5 μ l
Total	50 μ l

② 2nd PCR 反应条件如下:

94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min	} 15 Cycles
94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min	
94°C	30 sec;	44°C	1 min;	72°C	2 min	
72°C	10 min					

3. 3rd PCR 反应。

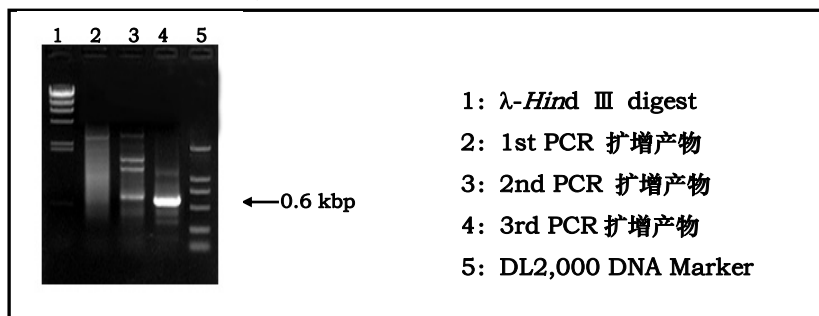
① 按下列组份配制 3rd PCR 反应液。

2nd PCR 反应液	1 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μ l
10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i> [®] (5 U/ μ l)	0.5 μ l
AP4 Primer (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Control Specific Primer SP3 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
dH ₂ O	33.5 μ l
Total	50 μ l

② 3rd PCR 反应条件如下:

94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min	} 15 Cycles
94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min	
94°C	30 sec;	44°C	1 min;	72°C	2 min	
72°C	10 min					

4. 取上述各步 PCR 反应液 5 μ l 进行 1% 的 Agarose 凝胶电泳, 结果如下:



5. 使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 (TaKaRa Code: DV805A), 切胶回收 3rd PCR 扩增产物, 然后使用 Control Specific Primer SP3 进行 DNA 测序。测序结果显示, 获取的 0.6 kbp DNA 片段为人基因组中的 ALDOA 基因 5' 端序列。

●使用小麦基因组 DNA 时的实验例

使用本试剂盒, 以小麦基因组 DNA 为模板, 获取小麦 *Triticum aestivum* subsp. *compactum* y-type HMW glutenin subunit gene 5' 端序列的实验例。

1. 1st PCR 反应。

① 按下列组份配制 1st PCR 反应液。

小麦 Genomic DNA (100 ng/μl)	1 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μl
TaKaRa LA Taq® (5 U/μl)	0.5 μl
AP3 Primer (100 pmol/μl) *	1 μl
Specific Primer SP1 (10 pmol/μl)	1 μl
dH ₂ O	33.5 μl
Total	50 μl

* 结果证明, 本实验中使用 AP3 Primer 扩增效果最佳。

② 1st PCR 反应条件如下:

94℃	1 min				
98℃	1 min				
94℃	30 sec	} 5 Cycles			
65℃	1 min				
72℃	2 min				
94℃	30 sec;	25℃	3 min;	72℃	2 min
94℃	30 sec;	65℃	1 min;	72℃	2 min
94℃	30 sec;	65℃	1 min;	72℃	2 min
94℃	30 sec;	44℃	1 min;	72℃	2 min
72℃	10 min				} 15 Cycles

2. 2nd PCR 反应。

① 按下列组份配制 2nd PCR 反应液。

1st PCR 反应产物	1 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μl
TaKaRa LA Taq® (5 U/μl)	0.5 μl
AP3 Primer (100 pmol/μl)	1 μl
Specific Primer SP2 (10 pmol/μl)	1 μl
dH ₂ O	33.5 μl
Total	50 μl

② 2nd PCR 反应条件如下:

94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min	} 15 Cycles
94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min	
94°C	30 sec;	44°C	1 min;	72°C	2 min	
72°C	10 min					

3. 3rd PCR 反应。

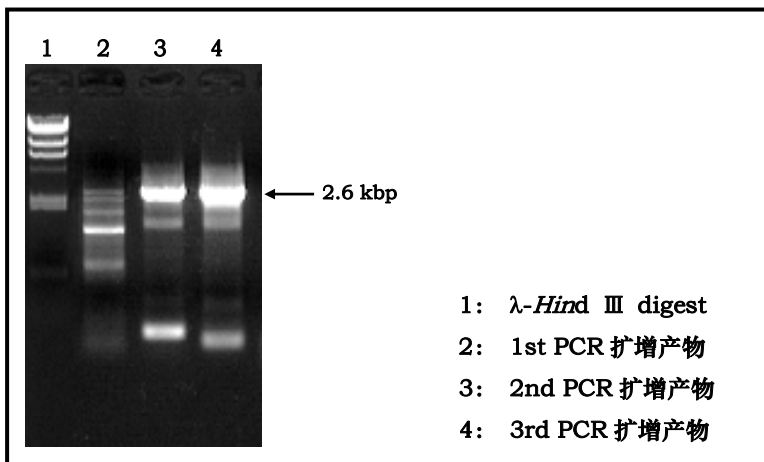
① 按下列组份配制 3rd PCR 反应液。

2nd PCR 反应产物	1 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μl
TaKaRa LA Taq® (5 U/μl)	0.5 μl
AP3 primer (100 pmol/μl)	1 μl
Specific Primer SP3 (10 pmol/μl)	1 μl
dH ₂ O	33.5 μl
Total	50 μl

② 3rd PCR 反应条件如下:

94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min	} 15 Cycles
94°C	30 sec;	65°C	1 min;	72°C	2 min	
94°C	30 sec;	44°C	1 min;	72°C	2 min	
72°C	10 min					

4. 取上述各步 PCR 反应液 5 μl 进行 1% 的 Agarose 凝胶电泳, 结果如下:



5. 使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 (TaKaRa Code: DV805A), 切胶回收 3rd PCR 扩增产物, 并用 Specific Primer SP3 进行 DNA 测序。

6. 根据测序结果设计特异性引物, 然后进行 PCR 反应, 并对获得的 PCR 产物进行 DNA 测序。测序结果显示: 获取的 2.6 kbp DNA 片段是 Triticum aestivum subsp. compactum y-type HMW glutenin subunit gene 5' 端序列。

●Q&A

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。后一个特异性产物要比前一个短 60~100 bp，当 3rd PCR 产物比 2nd PCR 产物稍短时，可以只回收 3rd PCR 产物。1st PCR 产物基本上是 AP 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 利用普通的 PCR 扩增仪能否完成本实验？

A-2 TaKaRa Genome Walking Kit 在进行 PCR 反应时的反应条件比较复杂，我们使用的是 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa Code: TP600) PCR 扩增仪。使用其他 PCR 扩增仪（一个程序内不能设定 9 个温度梯度的 PCR 仪）时，可采用手动重复操作来完成实验。具体可参考以下条件设定。

对于以下的循环条件：

94℃	30 sec;	65℃	1 min;	72℃	2 min	} 15 Cycles
94℃	30 sec;	65℃	1 min;	72℃	2 min	
94℃	30 sec;	44℃	1 min;	72℃	2 min	

可以设定为：

94℃	30 sec
65℃	1 min
72℃	2 min
94℃	30 sec
65℃	1 min
72℃	2 min
94℃	30 sec
44℃	1 min
72℃	2 min

将以上循环条件，用手动重复操作 15 次即可完成反应。

Q-3 TaKaRa Genome Walking Kit 的反应体系及反应条件是否具有物种通用性？

A-3 TaKaRa Genome Walking Kit 的反应体系及反应条件经过对典型物种的研讨，可以适用于多种物种。一般情况下，四种 AP 引物中至少会有一种可以扩增出目的 DNA 片段。

Q-4 如果四种 AP 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-4 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有至关重要的作用。当使用四条 AP 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-5 是否可以只使用一种 AP 引物进行实验？

A-5 可以首先使用一种 AP 引物进行实验。但为了提高实验成功率，我们建议使用四种 AP 引物同时进行实验，理论上至少会有一种以上的 AP 引物能够得到理想结果。

Q-6 获取的侧翼序列测序有套峰，是什么原因？

A-6 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。

Q-7 第一次和第二次反应能否使用 25 μ l 体系？

A-7 我们曾尝试使用过 25 μ l 反应体系，但结果并不如 50 μ l 体系理想，所以我们推荐使用 50 μ l 反应体系。

Q-8 是否可以使用一般的 *Taq* 酶代替 *TaKaRa LA Taq*®？

A-8 我们曾使用过其它 *Taq* 酶，但结果不如 *TaKaRa LA Taq*® 理想。我们推荐使用 *TaKaRa LA Taq*®。

●参考文献

[1] Tomohiro Nakayama, Masayoshi Soma, Dolkun Rahmutula, Yukio Ozawa, Katsuo Kanmatsuse (2001)

Med Sci Monit, 7(3): 345~349.

[2] Z.T. Li, D.J. Gray (2005) *Genome*, 48: 312~320.

[3] R. Terauchi, G. Kahl (2000) *Mol Gen Genet*, 263: 554~560.

[4] 刘博，苏乔，汤敏谦，袁晓东，安利佳(2006) *遗传*, 28 (5): 587~595.

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.03

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂